

(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2020-510406

(P2020-510406A)

(43) 公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 9/50 (2006.01)	C 1 2 N 9/50	4 B O 5 0
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-524990 (P2019-524990)	(71) 出願人	317002869
(86) (22) 出願日	平成29年11月13日 (2017.11.13)		コモンウェルス サイエンティフィック
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月12日 (2019.7.12)		アンド インダストリアル リサーチ オ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2017/051237		ーガナイゼーション
(87) 国際公開番号	W02018/085895		オーストラリア国オーストラリアン・キャ
(87) 国際公開日	平成30年5月17日 (2018.5.17)		ピタル・テリトリー 2 6 0 1, アクトン
(31) 優先権主張番号	2016904639		, クルニーズ・ロス・ストリート
(32) 優先日	平成28年11月14日 (2016.11.14)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	2017900161	(74) 代理人	100123582
(32) 優先日	平成29年1月19日 (2017.1.19)		弁理士 三橋 真二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼセンサー分子

(57) 【要約】

本発明は、試料中の細菌プロテアーゼを検出するためのセンサー及び方法に関する。特に、本発明は、試料中の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ活性を検出するためのセンサー及び方法に関する。センサー及び方法は、乳製品の腐敗を検出または予測するために使用されてもよい。本発明はまた、プロテアーゼアッセイ用の試料を調製するための方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Pseudomonas spp. プロテアーゼセンサー分子であって、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位、ならびに以下の特徴：

(i) 前記標的配列の長さが、約50アミノ酸未満である、

(ii) 検出可能な標識、及び／または

(iii) 前記プロテアーゼ切断部位のうちの2つ以上、

のうちの1つ以上を有する標的配列を含み、

前記*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断が、検出可能な変化を生じる、前記*Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子。

【請求項 2】

前記標的配列が、3、4、5、6、または7つのプロテアーゼ切断部位を含む、請求項1に記載のセンサー。

【請求項 3】

前記標的配列が、SFM（配列番号37）、SKMXXPP（式中、Xは、任意のアミノ酸（配列番号40）である）、及び／またはKKNQ（配列番号24）を少なくとも含む、請求項1または請求項2に記載のセンサー。

【請求項 4】

前記標的配列が、

SFMKKNQNT EI（配列番号45）、

SFMNQNT EI（配列番号57）、

LSFMAIP（配列番号70）、

LQGSFMKKNQNT EIGSFE（配列番号72）、

LQGSFMNQNT EIGSFE（配列番号73）、

LQGSLSFMAIPGSFE（配列番号74）、及び

LQGSKKQKQKQKQGSFE（配列番号112）、

から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1または請求項2に記載のセンサー。

【請求項 5】

前記標的配列が、検出可能な標識に結合されているN末端及び／またはC末端にアミノ酸リンカーを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 6】

前記検出可能な変化が、共鳴エネルギー移動、音響、電気化学ポテンシャル、蛍光、化学発光、燐光、吸光度、抗体結合、BRET比、FRET効率、または質量の変化である、請求項1～5のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 7】

前記検出可能な標識が、発色団、ナノ粒子、量子ドット、ビオロゲン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 8】

Pseudomonas spp. プロテアーゼによる前記標的配列の切断が、共鳴エネルギー移動（RET）の検出可能な変化をもたらす、請求項1～7のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 9】

前記検出可能な標識が、2つの以上の構成要素を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 10】

前記検出可能な標識が、

i) 前記標的配列に共有結合されている化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメイン、または

10

20

30

40

50

i i) 蛍光団ドメイン及びアクセプタードメイン、
含む、請求項 9 に記載のセンサー。

【請求項 11】

1 つのドメインが、前記標的配列の N 末端に共有結合しており、前記他のドメインが、
前記標的配列の C 末端に共有結合している、請求項 10 に記載のセンサー。

【請求項 12】

前記アクセプタードメインが、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、Venus、mOrange、またはそれらのうちのいずれか 1 つの生物学的に活性な多様体もしくはフラグメントであり、

前記化学発光ドナードメインが、ルシフェラーゼまたは生物学的に活性な多様体もしくは
はフラグメントであり、

前記標的配列が、SFMKKKNQNT E I (配列番号 45)、SFMNQNT E I (配
列番号 57)、またはLSFMAIP (配列番号 70) を含む、請求項 10 または請求項
11 に記載のセンサー。

【請求項 13】

i) Pseudomonas spp. プロテアーゼの場合、0.1~10 nM、もし
くは 0.1~100 nM の EC₅₀ を有し、及び／または

i i) ウシプラスミンと比較して、Pseudomonas spp. プロテアーゼへ
の感度が、少なくとも 20 倍、または少なくとも 100 倍高い、
請求項 1~12 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 14】

請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサーもしくはその標的配列をコードする単
離核酸、または請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサーもしくはその標的配列を
コードする核酸を含むベクター。

【請求項 15】

i) 試料中の Pseudomonas spp. プロテアーゼを検出するための、

i i) 乳製品の腐敗を検出するための、または

i i i) Pseudomonas spp. 感染を検出するための、

請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサーの使用。

【請求項 16】

試料中の Pseudomonas spp. プロテアーゼを検出する方法であって、前
記方法が、

i) 請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサーと、試料を接触させること、及び

i i) 前記センサーの変化を検出すること、

を含み、前記変化が、前記試料中の Pseudomonas spp. プロテアーゼの存在
に対応する、前記方法。

【請求項 17】

乳製品の腐敗を検出する方法であって、前記方法が、

i) 請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサーと、試料を接触させること、及び

i i) 前記センサーの変化を検出すること、

を含み、前記変化が、前記乳製品が腐敗しているか、腐敗し始めているか、または腐敗す
る可能性があることを示す、前記方法。

【請求項 18】

i) 少なくとも 1 pM、もしくは少なくとも 10 pM、もしくは少なくとも 100 pM
の Pseudomonas spp. プロテアーゼを検出し、及び／または

i i) 1 時間未満、30 分未満、または 15 分未満で実施される、

請求項 16 または請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載のセンサー及び 1 つ以上の許容される担体 (複数
可) を含む組成物。

【請求項 20】

カゼインミセルからプロテアーゼを解離する方法であって、前記方法が、カゼインに結合している前記プロテアーゼと競合する化合物の存在下で、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物を超音波処理することを含む、前記方法。

【請求項 21】

以下の特徴：

i) 前記組成物が、カゼインに結合しているプロテアーゼを含む乳製品またはその抽出物の試料である、

ii) 前記プロテアーゼが、少なくとも部分的には乳汁腐敗を引き起こす、

iii) 前記プロテアーゼが、プラスミンである、

iv) 前記化合物が、アミノカプロン酸である、

v) 前記組成物が、カルシウムキレート剤を含む、

vi) 前記超音波処理が、15分未満、10分未満、5分未満、または2分未満実施される、及び

vii) 前記超音波処理が、約50℃未満、または40℃未満、または30℃未満の温度で実施される、

のうちの1つ以上が、適用される、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

乳製品中のプロテアーゼの濃度を決定する方法であって、前記方法が、

(i) 請求項20または請求項21のいずれか1項に記載の方法を使用して、前記乳製品の試料を処理すること、

(ii) 前記加工乳製品中のプロテアーゼ活性を測定すること、及び

(iii) 前記プロテアーゼ活性に基づいて前記乳製品のプロテアーゼの濃度を決定すること、

を含む、前記方法。

【請求項 23】

ステップ(ii)が、

少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位を有する標的配列及び任意に検出可能な標識を含むセンサー分子と、前記加工乳製品を混合すること、

を含み、前記プロテアーゼによる前記標的配列の切断が、検出可能な変化を生じ、さらに前記ステップ(ii)が、

前記検出可能な変化を測定すること、

を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記センサー分子が、請求項1～13のいずれか1項に規定の通りである、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の細菌プロテアーゼを検出するためのセンサー及び方法に関する。特に、本発明は、試料中の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ活性を検出するためのセンサー及び方法に関する。センサー及び方法は、乳製品の腐敗を検出または予測するために使用されてもよい。

【背景技術】

【0002】

乳汁は、急速に腐敗する傾向がある。腐敗は、内因性因子、例えば、乳汁中に天然に存在する酵素（例えば、プラスミン）及び、外因性因子、例えば、乳汁中に存在する微生物により産生される酵素、の双方の結果として起こる可能性がある。適切に貯蔵された冷蔵乳汁中に存在する最も一般的で豊富な腐敗微生物は、*Pseudomonas* 種であり、これは、低温細菌として分類され、低温条件下で選択的利点を有する。低温細菌は、低い

10

20

30

40

50

貯蔵温度、例えば、4℃、で比較的急速に増殖する能力を有する。細菌の成長は、*Pseudomonas* の培養物の分布密度が約 10^6 cfu/ml を超える時、周囲の培地への、プロテアーゼを含む酵素の産生及び分泌を伴う。これらのプロテアーゼは、攻撃的で比較的熱安定性がある。それらは、カゼインなどの乳タンパク質を分解することができ、貯蔵中の UHT 全乳及び脱脂乳中の粘度、ゲル化、及び苦味の増加をもたらし、それにより、貯蔵寿命の低下をもたらし得る。低温殺菌及び超高温 (UHT) 処理などの技術が腐敗を防止するのに役立ち、且つ、乳汁の貯蔵寿命を延長することに役立ち得るが、いくつかの細菌酵素は、熱処理に耐性がある。十分な酵素が、熱処理前にバクテリアにより産生される場合、UHT 乳は、処理された後でさえも腐敗し得る。これらの酵素のうち、プロテアーゼは、非常に低い濃度で存在していても、乳汁腐敗を引き起こし得るので、特に重要なものである。さらに、乳汁中のプロテアーゼは、フレーバー乳、変性乳、及び強化乳を含む幅広い他の乳製品、ならびに特殊調製粉乳、チーズ、及び超長寿命低温殺菌乳を含む乳汁から作製された粉末製品の収率、品質、及び／または貯蔵寿命に悪影響を与える可能性もある。

【0003】

乳汁などの乳製品中の細菌プロテアーゼを測定するために、幅広い方法が使用されている。フルオレセインイソチオシアナート (FITC) カゼインプロテアーゼアッセイなどの、乳汁試料中の細菌プロテアーゼを検出するために最も一般に使用される方法は、大規模な操作を必要とする。それらは、製造後 6～9 ヶ月の間に UHT ミルクの腐敗をもたらし得る非常に低レベルのプロテアーゼを検出するのに十分敏感ではないか、またはそれらを全く検出することができないかのいずれかである (Button et al., (2011))。さらに、これらの方法は一般に、遅く、数日から数週間中で結果をもたらす。それ故、それらは、製品破損の原因の事後決定に使用されてもよいが、それらは乳製品の製造、加工、及び流通のリアルタイム管理にはほとんど役に立たない。

【0004】

プラスミン由来の乳汁中の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼを識別する 2 つの方法、すなわち、HPLC 及び競合 ELISA アッセイが報告されている (Datta and Deeth, 2001; Dupont et al., 2007; Martins, 2015)。これらの方法は双方ともに、数時間から数日の長時間のインキュベーションを必要とし、その間に、プロテアーゼは、上清中に特異的ペプチドを放出する内因性 κ -カゼインを枯渇させる。HPLC に基づく方法は、特有の κ -カゼイン由来ペプチドを同定するために、示差酸沈殿、続いて、逆相分離を使用する (Datta 及び Deeth, 2001)。ELISA 法は、試料中の残留したインタクトなカップカゼイン (κ カゼイン) を測定するために、Pfl 10 プロテアーゼのインタクトな Met₁₀₅-Phe₁₀₆ 標的に特異的なモノクローナル抗体に依存する (Dupont et al., 2007)。アッセイ中の未消化 κ カゼインは、ELISA プレートの内壁上の一定量の精製 κ カゼインと競合する。これらの方法は、乳汁の腐敗前の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ活性を測定するのに適していない。

【0005】

それ故、試料中の細菌プロテアーゼを検出するために使用することができるセンサー及び方法、特に、迅速に及び／または感度を増加させて実施することができる方法、が必要とされている。プラスミンなどの内因性因子による腐敗と細菌プロテアーゼなどの外因性因子による腐敗とを区別する方法もまた必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本発明者らは、試料中の細菌プロテアーゼを検出するために使用することができるセンサーを特定している。本発明者らはまた、これらのセンサーを使用して試料中の細菌プロテアーゼの存在を検出する改良された方法を特定している。彼らはまた、これらのセンサーを使用して乳製品の腐敗を検出するための改良された方法も特定している。

【0007】

一態様では、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位、ならびに以下の特徴：

(i) 標的配列の長さが、約50アミノ酸未満である、

(ii) 検出可能な標識、及び／または

(iii) プロテアーゼ切断部位のうちの2つ以上、

のうちの1つ以上を有する標的配列を含む *Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子が提供される。

Pseudomonas spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、検出可能な変化を生じる。

10

【0008】

一部の実施形態では、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位、ならびに以下の特徴：

(i) 標的配列の長さが、約50アミノ酸未満である、

(ii) 検出可能な標識、及び／または

(iii) プロテアーゼ切断部位のうちの2つ以上、

のうちの1つ以上を有する標的配列を含む *Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子が提供される。

Pseudomonas spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、検出可能な変化を生じる。

20

【0009】

一部の実施形態では、標的配列は、2つ以上のプロテアーゼ切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、3、4、5、6、または7つのプロテアーゼ切断部位を含む。

【0010】

一部の実施形態では、標的配列は、KQ、SFM（配列番号37）、KKNQ（配列番号24）、NT、及びEI、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、SFM（配列番号37）及び／またはKKNQ（配列番号24）を少なくとも含む。さらなる実施形態では、標的配列は、SKMXXPP（配列番号40）を含み、Xは、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、標的配列は、SFMKKKNQNT EI（配列番号45）；SFMNQNT EI（配列番号57）；及びLSFMAIP（配列番号70）から選択されるアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、標的配列は、LQGSFMKKKNQNT EIGSFE（配列番号72）、LQGSFMNQNT EIGSFE（配列番号73）、LQGSLSFMAIPGSFE（配列番号74）、及びLQGSKKQKQKQKQGSFE（配列番号112）から選択されるアミノ酸配列を含む。他の例としては、LQGSPPPLKQPPPGSFE（配列番号113）、LQGSPPPLQQPQP GSFE（配列番号114）、及びLQGGSGGSLKQQGGSGGSGSFE（配列番号115）が挙げられる。

30

【0011】

一部の実施形態では、標的配列は、検出可能な標識に結合しているN末端及び／またはC末端にアミノ酸リンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、1つ以上のグリシン、セリン、及び／またはプロリン残基を含む。例えば、一部の実施形態では、リンカーは、LQG（配列番号95）、GSFE（配列番号96）、GSSGGS（配列番号97）、GSPPL（配列番号98）、PPPGS（配列番号99）、GSGGGS（配列番号100）、GSGGGS L（配列番号101）、及びPPVKQPPP（配列番号44）から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0012】

Pseudomonas spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、検出可能な変化をもたらす。一部の実施形態では、検出可能な変化は、共鳴エネルギー移動、音響、

50

電気化学ポテンシャル、蛍光、化学発光、燐光、吸光度、抗体結合、BRET比、FRET効率、または質量の変化である。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、共鳴エネルギー移動 (RET) に検出可能な変化をもたらす。

【0013】

一部の好ましい実施態様では、センサー分子は、検出可能な標識を含む。好ましくは、検出可能な標識は、発色団、ナノ粒子、量子ドット、ビオロゲン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0014】

一部の実施形態では、検出可能な標識は、発色団である。好ましい実施形態では、発色団は、蛍光団、発光団、有機染料、無機染料、ホスホフォア (phosphores)、光吸収ナノ粒子、それらの組み合わせ、及びそれらの金属化錯体からなる群より選択される。

【0015】

一部の実施形態では、検出可能な標識は、2つ以上の構成要素を含む。例えば、検出可能な標識は、2つの構成要素を含んでもよい。一部の実施形態では、検出可能な標識は、i) 標的配列に共有結合している化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメイン、または、ii) 蛍光団ドメイン及びアクセプタードメインを含む。一部の実施形態では、1つのドメインは、標的配列のN末端に共有結合しており、他のドメインは、標的配列のC末端に共有結合している。例えば、化学発光ドナードメインは、標的配列のN末端に共有結合していてもよく、アクセプタードメインは、標的配列のC末端に共有結合していてもよい。あるいは、アクセプタードメインは、標的配列のN末端に共有結合していてもよく、化学発光ドナードメインは、標的配列のC末端に結合していてもよい。

【0016】

一部の好ましい実施態様では、検出可能な標識は、標的配列に共有結合している化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインを含む。一部の実施形態では、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び／または双極子配向は、標的配列が *Pseudomonas* spp. プロテアーゼにより切断される場合に変更される。アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び／または双極子配向の変更は、検出可能な変化を生じ得る。

【0017】

一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、BRET比の変化をもたらす。一部の実施形態では、BRET比の変化は、観察された最大BRET比の約2%～約95%である。一部の実施形態では、BRET比の変化は、観察された最大BRET比の約5%～約90%である。

【0018】

一部の実施形態では、化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、または β -グルコシダーゼからなる群より選択される。

【0019】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼである。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、*Renilla* ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、*Coelenterate* ルシフェラーゼ、北米グロウワームルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レーンロードワームルシフェラーゼ、バクテリアルシフェラーゼ、*Gaussia* ルシフェラーゼ、エクオリン、*Arachnocampa* ルシフェラーゼ、もしくは生物学的に活性な多様体、またはそれらのうちのいずれか1つのフラグメント、もしくは2つ以上のキメラからなる群より選択される。

【0020】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラ

10

20

30

40

50

ジン、セレンテラジンの誘導体もしくはアナログ、またはルシフェリンの誘導体もしくはアナログから選択される基質を有する。

【0021】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、補因子を必要とする。例えば、補因子は、ATP、マグネシウム、酸素、FMNH₂、カルシウム、またはそれらのうちの任意の2つ以上の組み合わせとしてもよい。

【0022】

一部の実施形態では、アクセプタードメインは、蛍光アクセプタードメインである。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、タンパク質である。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、GFPの青色蛍光多様体 (BFP)、GFPのシアン蛍光多様体 (CFP)、GFPの黄色蛍光多様体 (YFP)、増強GFP (EGFP)、増強CFP (ECFP)、増強YFP (EYFP)、GFP S65T、エメラルド、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化したEGFP (dEGFP)、不安定化したECFP (dECFP)、不安定化したEYFP (dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、tダイマー2、tダイマー2 (12)、mRFP1、ポシロポリン (pocilloporin)、Renilla GFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurboFB、及びフィコビリントタンパク質、ならびにそれらのうちのいずれか1つの生物学的に活性な多様体またはフラグメントからなる群より選択される。

【0023】

あるいは、蛍光アクセプタードメインは、非タンパク質である。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、Alexa Fluor色素、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光マイクロスフェア、発光マイクロスフェア、蛍光ナノ結晶、マリーナブルー、カスケードブルー、カスケードイエロー、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、及び希土類元素キレート、ならびにそれらの任意の組み合わせまたは誘導体からなる群より選択される。

【0024】

一部の実施形態では、アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、Venus及びmOrange、ならびにそれらの任意の1つの生物学的に活性な多様体またはフラグメントからなる群より選択され、化学発光ドナードメインは、ルシフェラーゼまたは生物学的に活性な多様体もしくはフラグメントであり、標的配列は、SFMKKKNQNTETI (配列番号45)、SFMNQNTETI (配列番号57)、またはLSFMAIP (配列番号70)を含む。

【0025】

一部の実施形態では、i) アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼであり、標的配列は、SFMKKKNQNTETI (配列番号45)を含むか、ii) アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ2であり、標的配列は、SFMKKKNQNTETI (配列番号45)を含むか、iii) アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8であり、標的配列は、SFMKKKNQNTETI (配列番号45)を含むか、または、iv) アクセプタードメインは、mOrangeであり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8.6-535であり、標的配列は、SFMKKKNQNTETI (配列番号45)を含む。

【0026】

一部の実施形態では、i) アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼであり、標的配列は、SFMNQNTETI (配列番号57)を含むか、ii) アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ド

ナードメインは、Renillaルシフェラーゼ2であり、標的配列は、SFMNQNT E I（配列番号57）を含むか、iii）アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8であり、標的配列は、SFMNQNT E I（配列番号57）を含むか、または、iv）アクセプタードメインは、mOrangeであり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8.6-535であり、標的配列は、SFMNQNT E I（配列番号57）を含む。

【0027】

一部の実施形態では、i）アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼであり、標的配列は、LSFMAIP（配列番号70）を含むか、ii）アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ2であり、標的配列は、LSFMAIP（配列番号70）を含むか、iii）アクセプタードメインは、GFP²であり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8であり、標的配列は、LSFMAIP（配列番号70）を含むか、または、iv）アクセプタードメインは、mOrangeであり、化学発光ドナードメインは、Renillaルシフェラーゼ8.6-535であり、標的配列は、LSFMAIP（配列番号70）を含む。

【0028】

当業者が理解するように、EC₅₀及びセンサーの感度は、使用される検出方法に応じて変動し得る。一実施形態では、センサー切断は、実施例2及び10に規定されるような方法を使用して検出される。この実施形態では、一例では、センサーは、Pseudomonas spp. プロテアーゼに対して、0.1~10nMのEC₅₀を有し、及び／または、センサーは、ウシプラスミンと比較して、Pseudomonas spp. プロテアーゼへの感度が少なくとも100倍高い。代替的实施形態では、センサー切断は、実施例12に規定されているような方法を使用して検出される。この実施形態では、一例では、センサーは、Pseudomonas spp. プロテアーゼに対して、0.1~100nMのEC₅₀を有し、及び／または、センサーは、ウシプラスミンと比較して、Pseudomonas spp. プロテアーゼへの感度が少なくとも20倍高い。

【0029】

一部の実施形態では、Pseudomonas spp. は、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas fragi、Pseudomonas ludensis、Pseudomonas putida、Pseudomonas LBSA1、またはPseudomonas aureofaciensである。

【0030】

一部の実施形態では、センサーは、連続する一連のアミノ酸である。

【0031】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のセンサーまたはその標的配列をコードする単離核酸を提供する。

【0032】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に記載のセンサーまたはその標的配列をコードする単離核酸を含むベクターも提供する。

【0033】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載のセンサーをコードする核酸、もしくはその標的配列を含むベクター、または本明細書に記載のセンサーをコードする核酸、もしくはその標的配列を含む宿主細胞も提供し、核酸は、細胞内でセンサーまたはその標的配列を発現可能なプロモーターに作動可能に連結されている。

【0034】

さらに別の態様では、本発明は、試料中のPseudomonas spp. プロテアーゼを検出する、本明細書に記載のセンサーの使用も提供する。

【0035】

さらに別の態様では、本発明は、乳製品の腐敗を検出する、本明細書に記載のセンサー

10

20

30

40

50

の使用も提供する。

【0036】

さらに別の態様では、本発明は、*Pseudomonas spp.* 感染を検出する、本明細書に記載のセンサーの使用も提供する。

【0037】

さらに別の態様では、本発明は、試料中の *Pseudomonas spp.* プロテアーゼを検出する方法も提供し、方法は、

i) 本明細書に記載のセンサーと、試料を接触させること、及び

ii) センサーの変化を検出すること、

を含み、該変化は、試料中の *Pseudomonas spp.* プロテアーゼの存在に対応する。

10

【0038】

一部の実施形態では、試料は、乳製品またはその抽出物、土またはその抽出物、臨床試料またはその抽出物、医療機器の試料、食品加工機器の試料、及び植物材料またはその抽出物からなる群より選択される。一部の実施形態では、臨床試料としては、血液、血清、痰、粘液、膿、腹腔液、及び他の体液が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、医療機器としては、カテーテル、静脈内ライン、人工呼吸器、透析機器などが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、食品加工機器としては、輸送用タンカー、保管タンク、加工機械、ライン、コネクタ、バルブなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0039】

さらに別の態様において、本発明は、乳製品の腐敗を検出する方法も提供し、この方法は、

i) 本明細書に記載のセンサーと、試料を接触させること、及び

ii) センサーの変化を検出すること、

を含み、該変化は、乳製品が腐敗するか、腐敗し始めるか、または腐敗する可能性があることを示す。

【0040】

一部の実施形態では、乳製品は、未殺菌乳、低脂肪乳、無脂肪乳、低温殺菌乳、UHT乳、ラクトース変性UHT乳、強化UHT乳、フレーバーUHT乳、及びこれらの製品の組み合わせ、ならびにUHT特殊調製粉乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バターミルク、クリーム、粉乳、乳児用調製粉乳、及びバターからなる群より選択される。

30

【0041】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、共鳴エネルギー移動、音響、電気化学ポテンシャル、蛍光、燐光、吸光度、抗体結合、BRET比、FRET効率、または質量の変化である。

【0042】

一部の実施形態では、センサーは、化学発光ドナードメインを含み、方法は、化学発光ドナードメインのための基質を提供することをさらに含む。一部の実施形態では、基質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、セレンテラジンの誘導体もしくはアナログ、またはルシフェリンの誘導体もしくはアナログである。

40

【0043】

一部の実施形態では、方法は、化学発光ドナードメインの補因子を提供することをさらに含む。一部の実施形態では、補因子は、ATP、マグネシウム、酸素、FMNH₂、カルシウム、またはそれらのうちの任意の2つ以上の組み合わせである。

【0044】

一部の実施形態では、方法は、少なくとも10 pMの *Pseudomonas spp.* プロテアーゼを検出可能である。一部の実施形態では、方法は、少なくとも1 pMの *Pseudomonas spp.* プロテアーゼを検出可能である。別の実施形態では、方法は、少なくとも100 pMの *Pseudomonas spp.* プロテアーゼを検出可

50

能である。

【0045】

一部の実施形態では、方法は、1時間未満、30分未満、または15分未満で実施される。

【0046】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のセンサー及び1つ以上の許容される担体（複数可）を含む組成物を提供する。

【0047】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のセンサーを含むキットを提供する。

【0048】

カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物の存在下で組成物を超音波処理すると、試料調製に必要な時間が低減することを、本発明者らは見出している。この方法を使用して調製された試料は、本出願の方法及び／または使用に使用することができる。

【0049】

従って、別の態様において、本発明は、カゼインミセルからプロテアーゼを解離させる方法も提供し、方法は、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物を、カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物の存在下で超音波処理することを含む。

【0050】

一部の実施形態では、本発明は、カゼインミセルからプロテアーゼを解離させる方法も提供し、この方法は、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物を、カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物及びカルシウムキレート剤の存在下で超音波処理することを含む。

【0051】

一部の実施形態では、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物は、カゼインに結合しているプロテアーゼを含む乳製品またはその抽出物の試料である。

【0052】

好ましくは、プロテアーゼは、少なくとも部分的に乳汁腐敗を引き起こす。一部の実施形態では、プロテアーゼは、プラスミンである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、細菌プロテアーゼである。一部の実施形態では、細菌プロテアーゼは、*Pseudomonas* spp. により産生される。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. は、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas fragi*、*Pseudomonas ludensis*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas* LBSA1、または*Pseudomonas aureofaciens*である。

【0053】

一部の実施形態では、カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物は、リシンの誘導体またはアナログである。好ましい実施形態では、リシンの誘導体またはアナログは、アミノカプロン酸である。

【0054】

一部の実施形態では、カルシウムキレート剤は、ヘキサメタリン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、フィチン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、及びエチレングリコールビス（ β -アミノエチルエーテル）-N, N, N', N'-四酢酸からなる群より選択される。好ましい実施態様では、カルシウムキレート剤は、クエン酸三ナトリウムである。

【0055】

一部の実施形態では、超音波処理は、15分間以下、10分間以下、5分間以下、または2分間以下実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約10 μm ～約300 μm 、または約15 μm ～約300 μm 、好ましくは、約15 μm ～約25 μm の超音波処理デバイス変位振幅で実施される。

10

20

30

40

50

【0056】

一部の実施形態では、超音波処理は、約11mm～約2mmのプロブ径で実施される。

【0057】

一部の実施形態では、超音波処理は、約10kHz～約60kHzの、好ましくは、約28kHz～約40kHzの、周波数で実施される。

【0058】

一部の実施形態では、超音波処理は、約55ワット未満、好ましくは、約25ワット未満、最も好ましくは、約5ワット～約8ワット、の電力で実施される。一部の実施形態では、試料が約1ml体積未満である場合、超音波処理は、約1ワット未満の音響出力レベルで実施される。

10

【0059】

一部の実施形態では、超音波処理は、約50℃未満、好ましくは、約40℃未満、最も好ましくは、約30℃未満、の温度で実施される。

【0060】

さらに別の態様では、本発明は、乳製品中のプロテアーゼの濃度を決定する方法を提供し、方法は、

(i) 記載の超音波処理方法を使用して乳製品の試料を加工すること、

(ii) 加工乳製品中のプロテアーゼ活性を測定すること、及び

(iii) プロテアーゼ活性に基づいて乳製品のプロテアーゼ濃度を決定すること、を含む。

20

【0061】

一部の実施形態では、乳製品は、未殺菌乳、低脂肪乳、無脂肪乳、低温殺菌乳、UHT乳、ラクトース修飾UHT乳、強化UHT乳、フレーバーUHT乳、UHT特殊調製粉乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バターミルク、クリーム、粉乳、乳児用調製粉乳、及びバター、ならびにそれらの組み合わせ、及び／またはカゼインに結合しているプロテアーゼを含む、それらのうちの1つ以上の抽出物からなる群より選択される。

【0062】

一部の実施形態では、ステップ(ii)は、少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位を有する標的配列及び任意に検出可能な標識を含むセンサー分子と、加工乳製品を混合すること（プロテアーゼによる標的配列の切断は検出可能な変化を生じる）、ならびに、検出可能な変化を測定することを含む。

30

【0063】

一実施形態では、センサー分子は、本発明のセンサー分子である。

【0064】

一部の実施形態では、センサー分子は、本明細書に記載の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子である。一部の実施形態では、センサー分子は、検出可能な標識を含み、検出可能な標識は、化学発光ドナードメイン及び標的配列に共有結合しているアクセプタードメインを含む。

【0065】

一部の実施形態では、プロテアーゼは、SF、FM、NQ、NT、EI、QQ、またはKZ（Zは、Q、N、K、Y、VもしくはEである）、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される切断部位を有する。

40

【0066】

一部の実施形態では、プロテアーゼは、SF、FM、NQ、NT、EI、またはKZ（Zは、Q、N、K、Y、V、もしくはEである）、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される切断部位を有する。

【0067】

本明細書の任意の実施形態は、別途具体的な記載のない限り、他の任意の実施形態に準用すると解釈されるべきである。

50

【0068】

本発明は、本明細書に記載の具体的な実施形態により範囲が限定されるべきではなく、これは、例示のみを目的とするものである。機能的に等価な製品、組成物、及び方法は、本明細書に記載されるように、明らかに本発明の範囲内である。

【0069】

本明細書を通して、別途具体的な記載のない限り、または、文脈が別途必要としない限り、単一のステップ、物質の組成物、ステップ群、または物質の組成物群への言及は、それらのステップ、物質の組成物、ステップ群、または物質の組成物群の1つ及び複数（すなわち、1つ以上）を包含すると解釈されるべきである。

【0070】

本発明は、以下の非限定的により、且つ、添付に関して、以下に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】一実施形態による細菌プロテアーゼ活性を検出するためのBRET²センサー。センサーは、Phe-Met切断部位を組み込む。

【図2】本開示の実施形態による未殺菌乳の前処理。（A）4mmのプロブ先端直径、40kHzの周波数、16μmの振幅、ならびに0秒、30秒、1分、及び2分の場合5Wの消費電力を有するように改良されたHonda ZO41超音波カッターを使用して、1.5mLの試料を超音波処理し、（B）4mmのプロブ先端直径、40kHzの周波数、19μmの振幅、ならびに0秒、30秒、1分、及び2分の場合8Wの消費電力を有するように改良されたHonda ZO41超音波カッターを使用して、1.5mLの試料を超音波処理した。超音波処理後、試料を均質化する際に、超音波処理ステップがいかに有効であったかを判定するために、全ての試料を約12,000gで2分間遠心分離した。

【図3】P. fluorescens株65（レーン2）または対照（レーン1）と共にインキュベートした脱脂乳から調製した粗抽出物のSDS-PAGE。

【図4】種々の濃度のヒトプラスミン及びウシプラスミンと共にセンサーを10分間インキュベートした後のプラスミンセンサーのBRET²応答。

【図5】0、1、10、及び100nMのヒトプラスミン、ウシプラスミン、及び粗細菌プロテアーゼと共にセンサーを10分間インキュベートした後のプラスミンセンサーのBRET²応答。

【図6】28℃で10分間インキュベーションした後の未殺菌乳中の、プラスミンのセンサーを使用した細菌プロテアーゼの較正。

【図7】50%の全脂肪UHT乳中の種々の濃度のウシプラスミン及び粗製細菌プロテアーゼと共にセンサーを10分間インキュベートした後のPflセンサー1のBRET²応答。

【図8】50%の全脂肪UHT乳中の種々の濃度のヒトプラスミン及び粗製細菌プロテアーゼと共にセンサーを10分間インキュベートした後のPflセンサー1のBRET²応答。

【図9】50%の全脂肪UHT乳中の種々の濃度のヒトプラスミン及び粗製細菌プロテアーゼと共にセンサーを10分間インキュベートした後のPflセンサー2のBRET²応答。

【図10】50%の全脂肪UHT乳中の種々の濃度のヒトプラスミン及び粗製細菌プロテアーゼと共にセンサーを10分間インキュベートした後のPflセンサー3のBRET²応答。

【図11】Rauhet al.の前処理プロトコール（2014）後に、熱処理した未殺菌乳に添加したヒトプラスミンを使用したBRET²プラスミンセンサーの較正。

【図12】Rauhet al.の前処理プロトコール（2014）後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用したD-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩の較正。

10

20

30

40

50

【図 1 3】2 ステップ前処理プロトコル後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用した B R E T² プラスミンセンサーの較正。

【図 1 4】2 ステップ前処理プロトコル後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用した D - V a l - L e u - L y s - 4 - ニトロアニリド二塩酸塩の較正。

【図 1 5】1 ステップ前処理プロトコル後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用した B R E T² プラスミンセンサーの較正。

【図 1 6】1 ステップ前処理プロトコル後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用した D - V a l - L e u - L y s - 4 - ニトロアニリド二塩酸塩の較正。

【図 1 7】低出力超音波処理を含む 1 ステップ前処理プロトコル後に、熱処理した未殺菌乳試料に添加したヒトプラスミンを使用した B R E T² プラスミンセンサーの較正。

【図 1 8】低出力超音波処理を含む 1 ステップ前処理プロトコル後に、未殺菌乳中の P f l u 1 センサーを使用した細菌プロテアーゼの較正。

【図 1 9】低出力超音波処理を含む 1 ステップ前処理プロトコル後に、P f l u バイオセンサーを使用した未殺菌乳試料中で測定した細菌プロテアーゼレベル。試料 1 ~ 2 0 は、独立した未殺菌乳試料である。

【図 2 0】2 8 °C で 1 0 分間インキュベーションした後の前処理なしの未殺菌乳中の、P f l u 1 センサーを使用した細菌プロテアーゼの較正。

【図 2 1】2 8 °C で 2 時間インキュベーションした後の前処理なしの未殺菌乳中の、P f l u 1 センサーを使用した細菌プロテアーゼの較正。

【図 2 2】2 8 °C で 2 時間インキュベートした後に低出力超音波処理を用いる 1 ステップの前処理プロトコルを用いた未殺菌乳中の、P f l u 1 センサーを使用した細菌プロテアーゼの較正。

【図 2 3】P . f l u o r e s c e n s 株 1 1 7 (レーン 2) または対照 (レーン 1) と共にインキュベートした脱脂乳から調製した粗抽出物の S D S - P A G E 。

【図 2 4】緩衝液及び U H T ミルク中で、0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 及び 1 1 7 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼと共に、センサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u 1 センサーの B R E T² 応答。

【図 2 5】2 8 °C で 2 時間インキュベーションした後の未殺菌乳中の、P f l u 1 センサーを使用した粗細菌プロテアーゼ P . f l u o r e s c e n s 株 1 1 7 の較正。

【図 2 6】0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼと共に緩衝液中でセンサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H センサーシリーズの B R E T² 応答。

【図 2 7】0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼまたは 1 n M のウシプラスミンを混ぜた U H T 乳と共に、緩衝液中でセンサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H 1 センサーの B R E T² 応答。

【図 2 8】0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼまたは 1 n M のウシプラスミンを混ぜた U H T 乳と共に、緩衝液中でセンサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H 2 センサーの B R E T² 応答。

【図 2 9】0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼまたは 1 n M のウシプラスミンを混ぜた U H T 乳と共に、緩衝液中でセンサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H 3 センサーの B R E T² 応答。

【図 3 0】0 (対照) または P . f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼまたは 1 n M のウシプラスミンを混ぜた U H T 乳と共に、緩衝液中でセンサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H 4 センサーの B R E T² 応答。

【図 3 1】5 0 % の未殺菌乳中の種々の濃度のウシプラスミン及び粗細菌プロテアーゼと共に、センサーを 1 0 分間インキュベートした後の P f l u - H 1 センサーの B R E T² 応答。

【図 3 2】P . f l u o r e s c e n s とインキュベートした脱脂乳から調製した粗抽出

10

20

30

40

50

物の SDS-PAGE。マーカー（レーン 1）、株 65-1（レーン 2）、65-2（レーン 3）、117（レーン 4）、100 ng の BSA（レーン 5）、200 ng の BSA（レーン 6）、400 ng の BSA（レーン 7）、600 ng の BSA（レーン 8）、800 ng の BSA（レーン 9）、及び 1000 ng の BSA（レーン 10）。

【図 33】Image Quant TL を使用したデンシトメトリー分析により決定した SDS-PAGE ゲル上の異なる BSA 濃度（ng）の場合のバンドに対する、計算した体積。

【図 34】50% の全脂肪 UHT 乳中の種々の濃度のウシプラスミン及び粗製細菌プロテアーゼと共にセンサーを 10 分間インキュベートした後の Pflus 1 の BRET² 応答。BSA 標準との比較により決定した細菌プロテアーゼ。

【0072】

配列表のキー

配列番号 1～94 及び 112～115 — プロテアーゼセンサー分子の標的配列。

配列番号 95～101 — リンカー配列。

配列番号 102 — GFP²-Pflus1-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 103 — GFP²-Pflus2-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 104 — GFP²-Pflus3-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 105 — GFP²-Pflus1-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 106 — GFP²-Pflus2-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 107 — GFP²-Pflus3-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 108 — GFP²-plas1-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 109 — GFP²-plas1-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 110 — プラスミン標的配列。

配列番号 111 — Plas1 標的配列。

配列番号 116 — GFP²-Pflus-H1-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 117 — GFP²-Pflus-H2-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 118 — GFP²-Pflus-H3-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 119 — GFP²-Pflus-H4-RLuc2 をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 120 — GFP²-Pflus-H1-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 121 — GFP²-Pflus-H2-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 122 — GFP²-Pflus-H3-RLuc2 融合タンパク質。

配列番号 123 — GFP²-Pflus-H4-RLuc2 融合タンパク質。

【発明を実施するための形態】

【0073】

一般的な技術及び定義

別途具体的な明示のない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、（例えば、タンパク質化学、プロテアーゼ生物学、乳製品科学、乳製品技術、及び生化学などにおける）当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0074】

別途指示のない限り、本発明に利用される組み換えタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技術は、当業者らに既知の標準的な手順である。このような技術は、J. Perbal

10

20

30

40

50

, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、及び F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの更新を全て含む)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、ならびに J. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までの更新を全て含む) などの出典の文献を通して記載及び説明される。

10

【0075】

「及び／または」、例えば、「X及び／またはY」という用語は、「X及びY」または「XまたはY」のいずれかを意味すると理解されるべきであり、双方の意味またはいずれかの意味に明示的なサポートを提供すると解釈されるべきである。

20

【0076】

文脈が別途示唆しない限り、センサー及び基質などの単数形の用語の言及は、明らかに複数形も意味する。例えば、単一分子ではなく論理的に多数の個々のセンサー分子は、デバイスを通して流れるか、またはウェル内に含有されるであろう。

【0077】

本明細書で使用される場合、約という用語は、反対の記載がない限り、所定の値の±10%、より好ましくは、±5%、さらにより好ましくは、±1%を指す。

【0078】

本明細書を通して、「含む (comprise)」という単語、または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などの変形形態は、記載の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群を含むが、他の任意の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群を含まないことを意味すると理解されるであろう。

30

【0079】

センサー

本明細書を通して、「センサー」、「細菌プロテアーゼセンサー」、及び「センサー分子」は、互換的に使用される。

【0080】

一態様では、本出願は、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位、ならびに以下の特徴：(i) 標的配列は、長さが約50アミノ酸未満である；(ii) 検出可能な標識；及び／または、(iii) プロテアーゼ切断部位のうちの2つ以上、のうちの1つ以上を有する標的配列を含む *Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子を提供し、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、検出可能な変化を生じる。

40

【0081】

一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. は、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas fragi*、*Pseudomon*

50

as ludensis、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas* LBSA1、または*Pseudomonas aureofaciens*である。好ましくは、*Pseudomonas* spp. は、*Pseudomonas fluorescens*である。

【0082】

一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼは、細胞外プロテアーゼである。好ましくは、プロテアーゼは、比較的熱安定性である。本明細書で 사용되는場合、「比較的熱安定性である」は、プロテアーゼが、95℃に少なくとも8分間熱処理した後に、もしくは140℃に3秒間熱処理した後に、元の活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%もしくは80%を、または類似した時間／温度曲線下面積をもたらし熱処理レジメンを保持することを意味する。好ましくは、プロテアーゼは、95℃に少なくとも8分間の熱処理後の、もしくは140℃に3秒間熱処理後の元の活性の少なくとも20%、または類似した時間／温度曲線下面積をもたらし熱処理レジメンを保持する。一部の実施形態では、プロテアーゼは、アルカリメタロプロテアーゼである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、セラリシンファミリーのプロテアーゼに属する。一部の実施形態では、プロテアーゼは、AprXプロテアーゼである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、*P. fluorescens* n° 114 (NCBI GenPept ID BAA28268) と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する。

【0083】

一部の実施形態では、センサーは、連続する一連のアミノ酸である。例えば、標的配列及び検出可能な標識は、限定されないが、標的配列のN末端に共有結合している化学発光ドナータンパク質ドメイン及び標的配列のC末端に共有結合しているアクセプタータンパク質ドメイン、または標的配列のN末端に共有結合しているアクセプタータンパク質ドメイン及び標的配列のC末端に共有結合している化学発光ドナータンパク質ドメイン、または標的配列のN末端に共有結合している蛍光団タンパク質ドメイン及び標的配列のC末端に結合しているアクセプタータンパク質ドメイン、または標的配列のN末端に共有結合しているアクセプタータンパク質ドメイン及び標的配列のC末端に共有結合している蛍光団タンパク質ドメインなどの単一の連続のアミノ酸配列である。

【0084】

一部の実施形態では、本明細書で定義されるようなセンサーまたは標的配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離核酸も提供される。例えば、一実施形態では、核酸分子は、配列番号81、配列番号82、または配列番号83のポリペプチド配列をコードする配列を含む。本発明のセンサーをコードする配列に加えて、核酸分子は、プライマー部位、転写因子結合部位、ベクター挿入部位、及び核酸分解を阻止する配列（例えば、ポリアデノシンテール）などの他の配列を含有してもよい。核酸分子は、DNAまたはRNAであってよく、合成ヌクレオチドを含んでもよい。但し、ポリヌクレオチドは依然として、本発明のタンパク質を合成するために翻訳されることが可能である。

【0085】

一部の実施形態では、核酸は、プラスミドなどのベクターの一部を形成する。上記の核酸配列に加えて、プラスミドは、原核生物の複製起点（例えば、*E. coli* OR1複製起点）、自律複製配列、セントロメア配列；核酸に作動可能に連結されている宿主細胞中で核酸を発現可能なプロモーター配列、核酸配列の下流に位置するターミネーター配列、抗生物質耐性遺伝子、及び／または分泌シグナル配列などの他の要素を含む。自律複製配列を含むベクターはまた、酵母人工染色体である。一部の代替実施形態では、ベクターは、バクテリオファージなどのウイルスであり、本発明の核酸配列に加えて、バクテリオファージの複製のための核酸配列、例えば、構造タンパク質、プロモーター、転写アクチベーターなど、を含む。

【0086】

本発明のセンサーまたは標的配列を合成するために、本発明の核酸またはベクターを使用して、宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換してもよい。好適な宿主細胞としては、*E. coli*などの原核細胞及び酵母細胞などの真核細胞、または哺乳動物もしくは植物細胞株が挙げられる。宿主細胞は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムベースの方法、微粒子銃法などの当該技術分野において既知の技術を使用して、またはウイルスベクターの使用により、トランスフェクトまたは形質転換される。

【0087】

トランスフェクション／形質転換の後、本発明の核酸またはベクターは、必要に応じて転写及び翻訳される。一部の実施形態では、合成タンパク質は、例えば、ベクター中の分泌シグナルの存在による細胞からの分泌、または宿主細胞の溶解及びそこからのタンパク質の精製のいずれかにより、宿主細胞から抽出される。

10

【0088】

一部の実施形態では、センサーは、無細胞組成物として提供される。本明細書で 사용되는場合、「無細胞組成物」という用語は、もしあれば、極少ないインタクトな細胞を含有し、且つセンサーを含む単離組成物を指す。無細胞組成物の例としては、細胞（例えば、酵母細胞）抽出物、ならびに単離及び／または組み換えセンサー分子（例えば、タンパク質）を含有する組成物が挙げられる。細胞から無細胞組成物を調製する方法は、当該技術分野で周知である。

【0089】

標的配列

20

本出願のセンサーは、少なくとも1つの *Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位を有する標的配列を含む。*Pseudomonas* spp. プロテアーゼ切断部位は、少なくとも、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼにより切断されるジペプチド配列である。通常は、ジペプチド配列中の最初のアミノ酸は、P1残基と呼ばれ、2番目のアミノ酸は、P1'残基と呼ばれる。プロテアーゼは、P1及びP1'残基間のペプチド結合を切断する。当業者により理解されるように、プロテアーゼ切断部位を囲む残基は、切断部位のプロテアーゼ認識、特異性、及び切断効率の認識を支援し得る。

【0090】

一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KQである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SFである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、FMである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KKである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KNである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、NQである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、NTである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、EIである。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、QQである。

30

40

【0091】

一部の実施形態では、標的配列は、少なくとも2つのプロテアーゼ切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つのプロテアーゼ切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、2、3、4、5、6、または7つのプロテアーゼ切断部位を含む。プロテアーゼ切断部位は、同じ切断部位の複数の反復、例えば、 $(KQ)_n$ 、 $(FM)_n$ 、 $(FM)_n$ 、 $(KK)_n$ 、 $(KN)_n$ 、 $(NQ)_n$ 、 $(NT)_n$ 、 $(EI)_n$ 、 $(QQ)_n$

50

、及びそれらの組み合わせを含んでもよく、nは、2以上の整数、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、またはそれ以上である。プロテアーゼ切断部位は、任意の順序で標的配列に含まれ得る。例えば、標的配列は、KQKQ（配列番号1）、KQSF（配列番号2）、KQFM（配列番号3）、KQKK（配列番号4）、KQKN（配列番号5）、KQNT（配列番号6）、KQNT（配列番号7）、KQEI（配列番号8）、KQQQ（配列番号75）、SFSF（配列番号9）、SFFM（配列番号10）、SFKK（配列番号11）、SFKN（配列番号12）、SFNQ（配列番号13）、SFNT（配列番号14）、SFEI（配列番号15）、SFQQ（配列番号76）、FMFM（配列番号16）、FMKK（配列番号17）、FMKN（配列番号18）、FMNQ（配列番号19）、FMNT（配列番号20）、FMEI（配列番号21）、FMQQ（配列番号77）、KKKK（配列番号22）、KKKN（配列番号23）、KKNQ（配列番号24）、KKNT（配列番号25）、KKEI（配列番号26）、KKQQ（配列番号78）、KNKN（配列番号27）、KNNQ（配列番号28）、KNNT（配列番号29）、KNEI（配列番号30）、KNQQ（配列番号79）、KNFM（配列番号31）、KNKK（配列番号32）、NQNQ（配列番号33）、NQQQ（配列番号80）、NTNT（配列番号34）、NTEI（配列番号35）、NTQQ（配列番号81）、EIEI（配列番号36）、EIQQ（配列番号82）、QQQQ（配列番号83）、QQKQ（配列番号84）、QQSF（配列番号85）、QQFM（配列番号86）、QQKK（配列番号87）、QQKN（配列番号88）、QQNQ（配列番号89）、QQNT（配列番号90）、QQEI（配列番号91）、KQQ（配列番号92）、及びそれらの任意の組み合わせを含む。

10

20

【0092】

一部の実施形態では、標的配列は、KQ、SFM（配列番号37）、KKNQ（配列番号24）、NT、KQQ（配列番号92）、及びEI、ならびにそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、少なくとも、標的配列は、SFM（配列番号37）及び／またはKKNQ（配列番号24）を含む。例えば、標的配列は、SFMKKNQ（配列番号38）もしくはKKNQSF（配列番号39）またはその双方を含み得る。

【0093】

一部の実施形態では、標的配列は、SKMXXPP（配列番号40）を含み、Xは、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、標的配列は、PPXXXSKMXXPP（配列番号41）、PPXXSKMXXPP（配列番号42）、またはPPXSKMXXPP（配列番号43）を含み、Xは、任意のアミノ酸である。

30

【0094】

一部の実施形態では、標的配列は、PPVKQPPP（配列番号44）を含む。

【0095】

一部の実施形態では、標的配列は、ウシプラスミンにより切断され得るジペプチド配列を含まない。ウシプラスミンがKZ間のペプチド結合を切断することが開示されており、Zは、K、Y、V、またはEからなる群より選択されるアミノ酸である。それ故、一部の実施形態では、標的配列は、KK、KY、KV、またはKEを含まない。好ましくは、プロテアーゼ切断部位は、KQ、SF、FM、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、KN、NQ、NT、EI、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

40

【0096】

一部の実施形態では、標的配列は、SFMKKNQNT（配列番号45）、SFMNTKKNQEI（配列番号46）、SFMQNT（配列番号47）、SFMNQKKNT（配列番号48）、SFMNQNTKKKEI（配列番号49）、SFMNQNT（配列番号50）、KKNQSF（配列番号51）、KKNQNTSF（配列番号52）、KKNQNT（配列番号53）、KKSF（配列番号54）、KKNQSF（配列番号55）、KKN

50

Q E I S F M N T (配列番号 56)、S F M N Q N T E I (配列番号 57)、N Q S F M N T E I (配列番号 58)、N Q N T S F M E I (配列番号 59)、N Q N T E I S F M (配列番号 60)、S F M N T N Q E I (配列番号 61)、S F M N T E I N Q (配列番号 62)、S F M N Q E I N T (配列番号 63)、N Q S F M E I N T (配列番号 64)、N Q E I S F M N T (配列番号 65)、S F M E I N Q N T (配列番号 66)、E I S F M N T N Q (配列番号 67)、E I N T S F M N Q (配列番号 68)、E I N T N Q S F M (配列番号 69)、L S F M A I P (配列番号 70)、または L F M S F A I P (配列番号 71)を含む。好ましくは、標的配列は、S F M K K N Q N T E I (配列番号 45)、S F M N Q N T E I (配列番号 57)、または L S F M A I P (配列番号 70)を含む。

10

【0097】

一部の実施形態では、標的配列は、L Q G S F M K K N Q N T E I G S F E (配列番号 72)、L Q G S F M N Q N T E I G S F E (配列番号 73)、L Q G S L S F M A I P G S F E (配列番号 74)、または L Q G S K Q K Q K Q K Q G S F E (配列番号 112)を含む。他の例としては、L Q G S P P L K Q P P P G S F E (配列番号 113)、L Q Q G S P P L Q Q P Q P G S F E (配列番号 114)、及び L Q G G S G G S L K Q Q G G S G G S F E (配列番号 115)が挙げられる。

【0098】

一部の実施形態では、標的配列は、G S P P L Q Q P P P G S (配列番号 93)または G G S G G S L K Q Q G G S G G S (配列番号 94)を含む。

20

【0099】

標的配列は、検出可能な標識の一部を形成しないアミノ酸を含むか、またはそれからなる。それ故、標的配列は、検出可能な標識に結合しているアミノ酸リンカーを含んでもよい。一部の実施形態では、リンカーは、標的配列のN末端及び／またはC末端に位置し得る。一部の実施形態では、リンカーは、1つ以上のグリシン、セリン、及び／またはプロリン残基を含む。例えば、一部の実施形態では、リンカーは、L Q G (配列番号 95)、G S F E (配列番号 96)、G S S G G S (配列番号 97)、G S P P L (配列番号 98)、P P P G S (配列番号 99)、G G S G G S (配列番号 100)、G G S G G S L (配列番号 101)、及び P P V K Q P P P (配列番号 44)から選択されるアミノ酸配列を含む。リンカー配列は、標的配列のN末端、標的配列のC末端、またはその双方に位置し得る。リンカーが標的配列のN末端及びC末端の双方に位置する場合、リンカー配列は、同じか、または異なっている可能性がある。理論に拘束されることを望むものではないが、リンカーは、以下の目的：(i) プロテアーゼ切断部位が切断に好ましい立体配座にあることを確実にするのを助ける；(ii) プロテアーゼ切断部位の接近性を改善する；(iii) 検出可能な変化の程度を増加させる（例えば、検出可能な標識が B R E T ペアである場合、リンカー配列は、B R E T 比を増加させるように機能し得る）；(iv) プロテアーゼによる標的配列の認識に寄与する；及び／または(v) ウシプラスミンを超える P s e u d o m o n a s s p p. プロテアーゼに対するセンサー（及び／または標的配列）の特異性に寄与する、のうちの1つ以上に役立ち得る。さらに理論に拘束されることを望むものではないが、標的配列中のプロリン残基は、ウシプラスミンを超える P s e u d o m o n a s s p p. プロテアーゼに対するセンサーの特異性に寄与し得る。

30

40

【0100】

一部の実施形態では、リンカーは、精製または検出可能な標識の結合に使用することができるアミノ酸または一連のアミノ酸を含む。例えば、リンカーは、精製のためのヒスチジンタグまたは検出可能な標識との自己組織化を含み得る。別の例では、リンカーは、検出可能な標識を付加するための反応基（例えば、システイン）を含み得る。

【0101】

好ましい実施態様では、標的配列は、約50アミノ酸未満である。例えば、標的配列は、約2～約50のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、標的配列は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20

50

、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸を含む。標的配列の長さ（アミノ酸単位）は、センサーの感度を増加させるように変動させることができる。

【0102】

検出可能な標識（複数可）

好ましくは、センサーは、検出可能な標識を含む。本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、共有結合または非共有相互作用により直接的または間接的のいずれかで、標的配列と特異的に結合する化合物または組成物を指す。好ましい実施態様では、標識は、共有結合、例えば、ペプチド、チオエーテル、またはエステル結合により標的に結合している。当業者は、標識を標的配列に共有結合させるために使用され得る技術を知っているだろう。視覚的にまたは装置デバイスにより検出可能であるシグナルを一般に生成可能な任意の物質を検出可能な標識として使用されてもよい。

【0103】

標識は、直接的に検出可能であっても、例えば、標識は、蛍光もしくは燐光分子（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）とし得る、または間接的に、例えば、酵素活性（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）により検出可能であってもよい。標識の組み込みは、例えば、2分子、例えば、酵素及びその基質（例えば、ATPアーゼ及びATP）、ストレプトアビジン及びビオチン、または、抗原もしくはエピトープ及び抗体間の高い結合親和性の使用により、当該技術分野において既知の様々な手段により達成することができる。他の手段としては、実例として、組み換え発現もしくは合成手段を介するポリメラーゼ媒介プライマー伸長反応またはエピトープタグ付けにおける放射性標識またはビオチン化ヌクレオチドの使用が挙げられる。標識は、種々の長さのスペーサーアームまたはリンカーを介して直接的または間接的に結合させることができる。検出可能な標識は、タンパク質または非タンパク質とし得る。例えば、標的配列を用いる検出可能な標識、及び存在する場合、任意のリンカーは、一連のアミノ酸を形成し得る。

【0104】

好ましい実施態様では、検出可能な標識は、2つ以上の構成要素を含む。2つ以上の構成要素は、同じであっても、異なってもよい。例えば、2つ以上の構成要素は、同じ発色団であってもよい、または2つ以上の構成要素は、i) 標的配列に共有結合している化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメイン、もしくは、ii) 蛍光団ドメイン及びアクセプタードメイン、とし得る。

【0105】

一部の実施形態では、センサーは、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼの場合、約0.01~約100nM、または約0.1~約10nM、または約0.2~約5nMのEC₅₀を有する。一部の実施形態では、センサーは、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼは、約0.4~約3nMのEC₅₀を有し、例えば、EC₅₀は、約0.1、0.2、1.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0nMとし得る。

【0106】

プラスミンなどの内因性因子による腐敗と細菌プロテアーゼなどの外因性因子による腐敗とを区別するセンサーもまた必要とされている。一部の実施形態では、本発明のセンサーは、プラスミンと比較して、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼへの感度が、少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、または400倍高い。好ましくは、センサーは、プラスミンと比較して、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼへの感度が、少なくとも100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、または4

10

20

30

40

50

00倍高い。本文脈中では、プラスミンと比較して、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼへの、センサーの感度は、プラスミン検量線から計算された EC_{50} の比をとり、それを細菌プロテアーゼ検量線から計算された EC_{50} で除することにより計算される。

【0107】

一部の実施形態では、検出可能な標識は、発色団、ナノ粒子、量子ドット、ビオロゲン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0108】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、共鳴エネルギー移動、音響、電気化学ポテンシャル、蛍光、化学発光、燐光、吸光度、抗体結合、BRET比、FRET効率、または質量の変化である。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、共鳴エネルギー移動 (RET) の検出可能な変化をもたらす。

【0109】

発色団

一部の実施形態では、検出可能な標識は、発色団を含む。本明細書を通して、発色団及び発光団は、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、発色団は、任意の光活性化化合物として広く定義され、任意の着色または非着色の光吸収種及び蛍光を発する任意の種を含む。任意の好適な発色団は、本出願のセンサーに使用することができる。好適な発色団としては、任意の有機もしくは無機染料、蛍光団、ホスホフォア、光吸収ナノ粒子、それらの組み合わせ、またはそれらの金属化錯体が挙げられるが、これらに限定されない。従って、一部の実施形態では、発色団は、有機染料、無機染料、ホスホフォア、光吸収ナノ粒子、それらの組み合わせ、及びそれらの金属化錯体からなる群より選択される。

【0110】

一部の実施形態では、有機染料は、クマリン、ピレン、シアニン、ベンゼン、N-メチルカルバゾール、エリトロシンB、N-アセチル-L-トリプトファンアミド、2,5-ジフェニルオキサゾール、ルブレン、及びN-(3-スルホプロピル)アクリジニウムからなる群より選択される。好ましいクマリンの例としては、7-アミノクマリン、7-ジアルキルアミノクマリン、及びクマリン153が挙げられる。好ましいベンゼンの例としては、1,4-ビス(5-フェニルオキサゾール-2-イル)ベンゼン及び1,4-ジフェニルベンゼンが挙げられる。好ましいシアニンの例としては、オキサシアニン、チアシアニン、インドシアニン、メロシアニン、及びカルボシアニンが挙げられる。他の例示的なシアニンとしては、ECL Plus、ECF、C3-オキサシアニン、C3-チアシアニンDye (EtOH)、C3-チアシアニンDye (PrOH)、C5-インドシアニン、C5-オキサシアニン、C5-チアシアニン、C7-インドシアニン、C7-オキサシアニン、CypHer5、Dye-33、Cy7、Cy5、Cy5.5を、Cy3Cy5 ET、Cy3B、Cy3、Cy3.5、Cy2、CBQCA₅NIR1、NIR2、NIR3、NIR4、NIR820、SNIR1、SNIR2、SNIR4、メロシアニン540、ピナシアノールヨウ化物1,1-ジエチル-4,4-カルボシアニンヨード、ステインズオール、Dye-1041、またはDye-304が挙げられる。

【0111】

一部の実施形態では、無機染料は、金属化及び非金属化ポルフィリン、フタロシアニン、クロリン (例えば、クロロフィルA及びB)、ならびに金属化発色団からなる群より選択される。好ましいポルフィリンは、テトラカルボキシーフェニルポルフィリン (TCPP)、及びZn-TCPPからなる群より選択される。好ましい金属化発色団は、イリジウム (III) のルテニウムポリピリジル錯体、オスミウムポリピリジル錯体、ロジウムポリピリジル錯体、3-(1-メチルベンゾイミダゾール-2-イル)-7-(ジエチルアミノ)-クマリン錯体、及びイリジウム (III) との3-(ベンゾチアゾール-2-イル)-7-(ジエチルアミノ)-クマリン錯体からなる群より選択される。

【0112】

一部の実施形態では、検出可能な標識は、燐光染料、フルオレセイン、ローダミン（例えば、ローダミン B、ローダミン 6 G）、及びアントラセン（例えば、9-シアノアントラセン、9, 10-ジフェニルアントラセン、1-クロロ-9, 10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン）からなる群より選択される蛍光団／ホスホフォアである。

【0113】

一部の実施形態では、光吸収ナノ粒子は、金、銀、白金、またはパラジウムを含む。

【0114】

一部の実施形態では、ホスホフォアは、燐光染料である。一部の実施形態では、ホスホフォアは、ルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、鉄、クロム、タングステン、亜鉛などの1つ以上の金属の金属錯体である。金属錯体は、水性または非水性環境における錯体の溶解性を促進する1つ以上のリガンドを含有してもよい。例えば、リガンドの一部の好適な例としては、ピリジン、ピラジン、イソニコチンアミド、イミダゾール、ビピリジン、テルピリジン、フェナントロリン、ジピリドフェナジン、ポルフィリン、ポルフィン、及びそれらの誘導体が挙げられる。このようなリガンドは、例えば、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、カルボキシラート、カルボキシアリド、カルボキサミド、シアノ、アミノ、ヒドロキシ、イミノ、ヒドロキシカルボニル、アミノカルボニル、アミジン、グアニジニウム、ウレイド、硫黄含有基、リン含有基、及びN-ヒドロキシスクシンイミドのカルボン酸エステルで置換されていてもよい。

【0115】

当業者は、検出可能な標識として発色団を使用するプロテアーゼアッセイを知っているであろう。

【0116】

ナノ粒子

一部の実施形態では、検出可能な標識は、ナノ粒子を含む。本明細書で使用される場合、「ナノ粒子」という用語は、任意に金属または非金属のナノ層シェルにより囲まれ得る金属ナノ結晶粒子を指す。好適なナノ粒子は、約1 nm～約100 nmの直径を有する。一部の実施形態では、直径は、好ましくは、約10 nm～約50 nm、より好ましくは、約5 nm～約20 nmである。ナノ粒子は、任意の種類の金属（元素金属を含む）または金属合金を含み得る。一部の実施形態では、金属または金属合金ナノ粒子は、金（Au）、銀（Ag）、銅（Cu）、ニッケル（Ni）、パラジウム（Pd）、白金（Pt）、コバルト（Co）、ロジウム（Rh）、イリジウム（Ir）、鉄（Fe）、ルテニウム（Ru）、オスミウム（Os）、マンガン（Mn）、レニウム（Re）、スカンジウム（Sc）、チタン（Ti）、バナジウム（V）、クロム（Cr）、亜鉛（Zn）、イットリウム（Y）、ジルコニウム（Zr）、ニオブ（Nb）、モリブデン（Mo）、テクネチウム（Tc）、カドミウム（Cd）、ランタン（La）、ルテチウム（Lu）、ハフニウム（Hf）、タンタル（Ta）、タングステン（W）、アクチニウム（Ac）、ローレンシウム（Lr）、ラウテルジウム（Rf）、ドブニウム（Db）、シーボリウム（Sg）、ボリウム（Bh）、ハッシウム（Hs）、マイトネリウム（Mt）、ダームスタチウム（Ds）、レントゲニウム（Rg）、ウンウンビウム（Uub）、セレン（Se）、及び酸化物（例えば、FeO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、Fe_xO_y（非化学量論的酸化鉄）、CuO、NiO、Ag₂O、Mn₂O₃）、上述の、水酸化物、硫化物、セレン化物、及びテルル化物、ならびにこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0117】

一部の実施形態では、コア／シェルナノ粒子は、金属または金属合金コア及び金属シェルを含む。好ましい実施形態では、コアは、Au、Ag、Cu、Co、Fe、及びPtからなる群より選択される。好ましい実施形態では、言及されるシェルは、Au、Ag、Cu、Co、Fe、Pt、それらの金属酸化物、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、金属コア／シェルの組み合わせは、Fe／Au、Fe／

10

20

30

40

50

Fe_3O_4 、及び $\text{Au}/\text{Fe}_2\text{O}_3$ からなる群より選択される。ナノ粒子のコアは、好ましくは、約 1 nm～約 25 nm、より好ましくは、約 3 nm～約 5 nm の直径を有する。コア／シェルナノ粒子の金属シェルは、好ましくは、約 0.5～約 10 nm、より好ましくは、約 0.5～約 2 nm の厚みを有する。

【0118】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、安定化させることができる。本明細書で使用される場合、「安定化した」は、ナノ粒子をコーティングし、保護し、またはこれに特性を付与するためのリガンドシェルまたは単層の使用を意味する。例えば、リガンドシェルまたは単層は、生物腐食からナノ粒子を保護するために使用することができる。別の例では、リガンドシェルまたは単層は、ナノ粒子を、水などの溶媒に多少可溶であるようにするために使用することができる。単層は、同じリガンド（すなわち、ホモリガンド）のいくつか、または異なるリガンドの混合物から構成され得る。当業者は、リガンドをナノ粒子の表面に結合させて、リガンドシェルを形成するために使用することができる技術を知っているであろう。例えば、ナノ粒子は、ナノ粒子のコーティングを促進するリガンドを含有する溶液中で混合されてもよい。別の例では、ナノ粒子は、リガンド及び／またはコーティング材料が、ナノ粒子に付着または結合するように、リガンド及び／またはコーティング材料の蒸気相にナノ粒子を曝露することにより、リガンド及び／またはコーティング材料でコーティングすることができる。一部の実施形態では、リガンド及び／またはコーティング材料は、共有結合によりナノ粒子に付着する。リガンドは、ナノ粒子の金属表面に結合している官能基を含む。一部の実施形態では、リガンドは、チオール、アルコール、ニトロ化合物、ホスフィン、ホスフィンオキシド、レゾルシナレン、セレニド、ホスフィン酸、ホスホン酸、スルホン酸、スルホナート、カルボン酸、ジスルフィド、過酸化物、アミン、ニトリル、イソニトリル、チオニトリル、オキシニトリル、オキシシラン、アルカン、アルケン、アルキン、芳香族化合物、及びセレノ部分からなる群より選択される少なくとも 1 つの基を含む。単層を形成するのに必要とされるリガンドの数は、ナノ粒子のサイズに依存するであろう。

【0119】

好ましい実施形態では、安定化したナノ粒子は、ナノ粒子コアを囲む有機単層を含む。当業者に既知の任意の有機単層が使用されてもよい。例えば、好適な有機単層は、アルカンチオラート単層、アミノアルキルチオラート単層、アルキルチオールサルファート単層、ならびに有機フェノール（例えば、ドーパミン及びその誘導体）からなる群より選択することができる。一部の実施形態では、有機単分子層の厚さは、約 10 nm 未満、好ましくは、約 5 nm 未満である。

【0120】

好ましい安定化したナノ粒子は、トリオクチルホスフィノオキシドで安定化したナノ粒子、アミンで安定化したナノ粒子、カルボン酸で安定化したナノ粒子、ホスフィンで安定化したナノ粒子、チオールで安定化したナノ粒子、アミノアルキルチオールで安定化したナノ粒子、及び有機フェノールで安定化したナノ粒子からなる群より選択される。

【0121】

非限定例として、検出可能な標識は、金ナノ粒子を含む。プロテアーゼアッセイへの金ナノ粒子の適用は、Guarise et al. (2006) で考察されている。

【0122】

量子ドット

一部の実施形態では、検出可能な標識は、量子ドットを含む。本明細書を通して、量子ドット及びナノ結晶は、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「量子ドット」は、周期表のⅢ-Ⅴ族またはⅢⅢ-Ⅴ族元素からの原子（例えば、 CdSe 、 CdTe 、及び InP ）からなる半導体である。同じ材料であるがサイズが異なる量子ドットは、異なる色の光を放出し得る。それらの明るさは、3 つ空間次元全てにおける電子の閉じ込めによるエネルギー準位の量子化に起因する。バルク半導体では、電子-正孔ペアは、Bohr 励起子半径内に束縛され、これは、各タイプの半導体に特徴的である。量子

ドットは、B o h r 励起子半径よりも小さく、これは、離散的なエネルギー準位の出現を引き起こす。半導体の価電子帯及び伝導帯間のバンドギャップ ΔE は、ナノ結晶のサイズ及び形状の関数である。従来の有機蛍光団と比較して、量子ドットは、わずかに低い発光量子収量を有するが、はるかに大きい吸収断面積及び非常に小さい光退色速度を有する。量子ドットのモル吸光係数は、約 $10^5 \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これは、染料よりも $10 \sim 100$ 倍大きい。本明細書で使用される場合、「量子収量」は、元のエネルギー提供の最終放出の尺度を指す。

【0123】

目的に適する任意の量子ドットを使用することができる。一部の実施形態では、量子ドットの光学特性は、シェルを合成することにより操作することができる。通常は、シェルは、安定化シェルである。このような量子ドットは、コア-シェル量子ドットとして既知であり、C d S e / Z n S、I n P / Z n S、I n P / C d S e を含むが、これらに限定されない。コア/シェル量子ドットは、低いバンドギャップコアの周りに、高いバンドギャップシェルを有し、これは、シェルによる吸収なしに光を放出する。シェルは、コアからの表面非放射放出を不動態化し、それにより、光発光量子収量を高め、自然分解を防止する。I 型量子ドット（例えば、C d S e / Z n S）のシェルは、コアよりも高いエネルギー伝導帯及び低いエネルギー価電子帯を有し、その結果、コア内に電子及び正孔の双方が閉じ込められる。I I 型量子ドット（例えば、C d T e / C d S e 及び C d S e / Z n T e）のシェルの伝導帯及び価電子帯は、コアのものよりも、双方ともエネルギーが低いかまたは双方ともエネルギーが高いかのいずれかである。従って、電子及び正孔の運動は、1次元に制限される。コア-シェル界面での励起子の放射再結合は、I I 型放出を引き起こす。I I 型量子ドットは、バンドエッジ付近では間接半導体として振る舞い、それ故、赤外及び近赤外に吸収テールを持っている。I 型及び I I 型が好ましいが、合金化半導体量子ドット（C d S e T e）を使用することもできる。変動させることができる合金組成及び内部構造は、粒子のサイズを変えことなく光学特性を調整することを可能にする。

【0124】

一部の実施形態では、量子ドットは、C d S e / Z n S コア/シェル量子ドット、C d T e / C d S e コア/シェル量子ドット、C d S e / Z n T e コア/シェル量子ドット、及び合金化半導体量子ドット（例えば、C d S e T e）からなる群より選択される。

【0125】

複数のセンサーを作成するために異なる色の放出が必要な場合（多重検出）、これは、異なる放出波長を生じる量子ドットコアのサイズを変えることにより達成することができる。量子ドットは、ナノ粒子に関して上述したように安定化または不安定化させることができる。量子ドットを安定化させるための好ましいリガンドは、レゾルシナレンである。

【0126】

非限定例として、検出可能な標識が共鳴エネルギー移動（R E T）に基づく場合、量子ドットを使用することができる。プロテアーゼアッセイにおける量子ドットの使用の概説については、K i m and K i m（2012）を参照のこと。

【0127】

バイオロゲン

一部の実施形態では、検出可能な標識は、バイオロゲンを含む。本明細書で使用される場合、「バイオロゲン」は、有機レドックス化合物である。好ましいバイオロゲンは、酸化及び還元の際に何度も可逆的に色を変えることができる。一部の実施形態では、バイオロゲンは、バイオロゲンメチル、プロピルバイオロゲンスルホナートまたはアミノプロピルバイオロゲンである。一部の実施形態では、バイオロゲンは、ポルフィリンなどの発色団の励起状態を消光することができるので、消光剤として使用することができる。

【0128】

共鳴エネルギー移動

一部の実施形態では、検出可能な標識は、F o r s t e r 共鳴エネルギー移動などの、

10

20

30

40

50

且つ限定されないが、生物発光共鳴エネルギー移動（「B R E T」）及び蛍光共鳴エネルギー移動（「F R E T」）を含む共鳴エネルギー移動（R E T）に基づく。

【0129】

本明細書で使用される場合、「B R E T」は、生物発光タンパク質ドナー及びアクセプター分子間の非放射性エネルギー移動に基づく近接アッセイである。「生物発光共鳴エネルギー移動」及び「B R E T」は、互換的に使用される。

【0130】

本明細書で使用される場合、「F R E T」は、2つの発色団または発色団と消光剤との間の非放射性エネルギー移動に基づく近接アッセイである。「F R E T」及び「蛍光共鳴エネルギー移動」は、互換的に使用される。

10

【0131】

一部の実施形態では、検出可能な標識は、i) 標的配列に共有結合している化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメイン、または、i i) ドナードメイン及びアクセプタードメインを含む。i i) の一部の実施形態では、ドナードメインは、蛍光団ドナーであり、及び／またはアクセプタードメインは、消光剤ドメインである。一部の実施形態では、1つのドメインは、標的配列のN末端に共有結合しており、他のドメインは、標的配列のC末端に共有結合している。好ましい実施形態では、検出可能な標識は、化学発光ドナードメイン及び標的配列に共有結合しているアクセプタードメインを含む。一例が図1に提示される。

【0132】

20

A. 化学発光ドナードメイン

化学発光は、化学反応の結果として、熱の放出が制限されたエネルギーの放出（発光）である。「化学発光」という用語は、本明細書では、酵素の活性に依存する生物発光を包含するため使用される。非酵素化学発光は、触媒の存在下での有機染料及び酸化剤間の化学反応の結果である。化学発光放出は、化学的に誘起される有機色素の励起状態からのエネルギーが基底状態に崩壊するにつれて発生する。化学発光放出の持続時間及び強度は、反応溶液中に存在する化学試薬の程度にほぼ依存している。

【0133】

好ましい実施態様では、化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である。本明細書で使用される場合、「生物発光タンパク質」という用語は、発光を生じるために、好適な基質に作用することが可能な任意のタンパク質を指す。

30

【0134】

生物発光タンパク質は、活性化された生成物に基質を変換する酵素であり、次に、活性化された生成物は、緩和するにつれてエネルギーを放出すると当該技術分野で理解されている。活性化された生成物（基質上の生物発光タンパク質の活性により生成される）は、アクセプター分子に移動する、生物発光タンパク質により生じた発光の供給源である。

【0135】

本発明に用いることができる多数の異なる生物発光タンパク質がある（例えば、表1を参照のこと）。光放出系は、知られており、細菌、原生動物、セレンテラート、軟体動物、魚、ヤスデ、ハエ、真菌、虫、C o e l e n t e r a t e、及び甲虫、特に、P y r o p h o r u s 属のコメツキムシ、ならびにP h o t i n u s 属、P h o t u r i s 属、及びL u c i o l a 属のホタル、を含む多くの発光生物から単離されている。生物発光を示す、さらなる生物は、W O 0 0 / 0 2 4 8 7 8、W O 9 9 / 0 4 9 0 1 9、及びV i v i a n i (2 0 0 2) に記載されている。

40

【0136】

任意の好適な生物発光タンパク質は、本出願のセンサーに使用することができる。1つの非常によく知られている例は、特定の生化学物質ルシフェリン（天然に存在する蛍光団）がルシフェラーゼ活性を有する酵素により酸化されるエネルギー生成化学反応を触媒するルシフェラーゼとして知られるタンパク質のクラスである（H a s t i n g s、1 9 9 6）。細菌、藻類、真菌、昆虫、魚、及び他の海洋生物の形態の種を含む、原核生物及び

50

真核生物の双方の生物の多様性は、このように光エネルギーを放出することができ、それぞれは、他の生物のものとは化学的に区別される特定のルシフェラーゼ活性及びルシフェリンを有する。ルシフェリン／ルシフェラーゼ系は、形態、化学、及び機能において非常に多様である。従って、ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質は、様々な供給源からまたは様々な手段により入手可能である。ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質の例は、米国特許第 5, 229, 285 号、第 5, 219, 737 号、第 5, 843, 746 号、第 5, 196, 524 号、及び第 5, 670, 356 号に見出され得る。最も広く使用されているルシフェラーゼのうちの 2 つは：(i) 基質としてセレンテラジンを使用し、且つ 480 nm の光を放出する 35 kDa のタンパク質である Renilla ルシフェラーゼ (R. reniformis 由来) (Lorenz et al.、1991)；及び、(ii) 基質としてルシフェリン使用し、且つ 560 nm の光を放出する 61 kDa のタンパク質であるホタルルシフェラーゼ (de Wet et al.、1987) である。

10

【0137】

Gaussia ルシフェラーゼ (Gaussia princeps 由来) は、生化学的アッセイに使用されている (Verhaegen et al.、2002)。Gaussia ルシフェラーゼは、迅速な反応でセレンテラジンを酸化する 20 kDa のタンパク質であり、470 nm の明るい光の放出をもたらす。

【0138】

Anachnoca mpa sp 由来の本発明に有用なルシフェラーゼは、特徴付けられている (WO2007/019634)。これらの酵素は、サイズが約 59 kDa であり、スペクトルの青色部分内の放出スペクトルを有する発光反応を触媒する ATP 依存性ルシフェラーゼである。

20

【0139】

天然に存在する生物発光タンパク質の生物学的に活性な多様体またはフラグメントは、当業者らが容易に製造することができる。本発明に有用なこのような多様体の 3 つの例は、Renilla ルシフェラーゼの各多様体である Rluc2 (Loening et al.、2006)、Rluc8 (Loening et al.、2006)、及び Rluc8.6-535 (Loening et al.、2007) である。さらに好ましい実施形態では、BRET 化学発光ドナーの配列は、天然の Renilla ルシフェラーゼセンサーを組み込むセンサー分子よりも高い熱安定性を有するように選択される。Rluc2 または Rluc8 は、好適な選択の便利な例であり、従って、これは、天然 Renilla ルシフェラーゼ配列を組み込むセンサーよりも 5 倍以上または 10 倍以上高い輝度を示す。このような輝度の向上は、所与のあらゆる時間分解能に対して試薬を経済的に使用することが可能になるので、大きな利点を有する。

30

表 1. 例示的な生物発光タンパク質

【表 1 - 1】

種	名称	生物	MW kDa $\times 10^{-3}$	放出 (nm)	基質の例
昆虫	FFluc	<i>Photinus pyralis</i> (北米ホタル)	約61	560	D-(1)-2-(6'-ヒドロキシベンゾチアゾリル)-D ² -チアゾリン-4-カルボン酸、HBTTCa (C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂) (ルシフェリン)
昆虫	FF' luc	<i>Luciola cruciata</i> (日本ホタル)		560 ~ 590 (多くの変異体)	ルシフェリン
昆虫		<i>Phengodid</i> 甲虫 (レーロードワーム)			
昆虫		<i>Arachnocampa</i> spp.			ルシフェリン
昆虫		<i>Orphelia fultoni</i> (北米ツチボタル)			
昆虫	Cluc	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> (コメツキムシ)		546、560、578、及び593	ルシフェリン
クラゲ	エクオリン	<i>Aequorea</i>	44.9	460 ~ 470	セレンテラジン
ウミシイタケ	Rluc	<i>Renilla reniformis</i>	36	480	セレンテラジン
ウミシイタケ (改変)	Rluc8	<i>Renilla reniformis</i> (改変)	36	487 (ピーク)	セレンテラジン / Deep Blue C
ウミシイタケ (改変)	Rluc2	<i>Renilla reniformis</i> (改変 M185V / Q235A)	36	480	セレンテラジン
ウミシイタケ (改変)	RLuc8.6-535	<i>Renilla reniformis</i> (改変)	36	535	セレンテラジン

10

20

30

40

【表 1 - 2】

種	名称	生物	MW kDa $\times 10^{-3}$	放出 (nm)	基質の例
ウミシイ タケ	Rmluc	Renilla mullerei	36.1	約480	セレンテラジン
ウミシイ タケ		Renilla kollikeri			
Crustacea (エビ)	Vluc	Vargula hilgendorffii	約62	約460	セレンテラジン
Crustacea	CLuc	Cypridina (ウミホタル)	75	465	セレンテラジン/Cypridinalシフエリン
Dinoflagellata (海藻)		Gonyaulax polyedra	130	約475	テトラピロール
軟体動物		Latia (淡水カサガイ)	170	500	エノールフォルマート、テルペン、アルデヒド
ヒドロポリプ		Obelia biscalpidata	約20	約470	セレンテラジン
エビ		Oplophorus gracilirostris	31	462	セレンテラジン
エビ		Oplophorus gracilirostris (NanoLuc)	19	約460	フリマジン
その他	Ptluc	Ptilosarcus		約490	セレンテラジン
	Gluc	Gaussia	約20	約475	セレンテラジン
	Pluc	Pleuromama	22.6	約475	セレンテラジン

【0140】

本発明に用いることができる代替の非ルシフェラーゼ生物発光タンパク質は、発光シグナルを生成するために好適な基質に作用し得る任意の酵素である。このような酵素の具体例は、 β -ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、及び β -グルコシダーゼである。これらの酵素のための合成発光基質は、当該技術分野で周知であり、Tropix Inc. (Bedford、米国マサチューセッツ州)などの企業から市販されている。

【0141】

本発明に有用なペルオキシダーゼの例は、Hushpuli et al. (20

07)により記載されている。

【0142】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、または β -グルコシダーゼである。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼである。好適なルシフェラーゼとしては、Renillaルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ（例えば、PpyRE8、PpyRE10）、Coelenterateルシフェラーゼ、北米グローワームルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レールロードワームルシフェラーゼ、バクテリアルシフェラーゼ、Gaussialルシフェラーゼ、エクオリン、Arachnocampaルシフェラーゼ、あるいは、それらのうちのいずれか1つの生物学的に活性な多様体もしくはフラグメント、またはそれらのうちの2つ以上のキメラが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0143】

本明細書で使用される場合、「生物学的に活性なフラグメント」は、全長ポリペプチドの規定の活性を維持する、本明細書に記載のポリペプチドの一部である。本明細書で使用される場合、「生物学的に活性な多様体」は、1つ以上のアミノ酸により天然に存在する分子及び／または規定の分子とは異なるが、生物学的に活性なフラグメントについて上で規定されるような規定の活性を維持する分子である。生物学的に活性な多様体は、天然に存在する分子及び／または規定の分子と、通常は、少なくとも50%、より好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、より好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも97%、さらにより好ましくは、少なくとも99%同一である。

20

【0144】

好ましい実施形態では、立体障害による相互作用の障害を防ぐために、低分子量の生物発光タンパク質が使用される。生物発光タンパク質は、単一のポリペプチド鎖からなることが好ましい。また、生物発光タンパク質は、オリゴマーまたはアグリゲートを形成しないことが好ましい。生物発光タンパク質のRenillaルシフェラーゼ、Gaussialルシフェラーゼ、及びホタルルシフェラーゼは、これらの基準の全てまたはほとんどを満たしている。

【0145】

本明細書で使用される場合、「基質」という用語は、発光を生じるか、または吸収するために、化学発光ドナーと併せて使用することができる任意の分子を指す。基質の選択は、化学発光ドナーにより生じる光の波長及び強度に影響を及ぼし得る。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、セレンテラジンの誘導体もしくはアナログ、またはルシフェリンの誘導体もしくはアナログから選択される基質を有する。

30

【0146】

セレンテラジンは、刺胞動物、カイアシ類、ヤムシ、クシクラゲ、十脚類のエビ、アメエビ、放散虫、及び一部の魚類分類群に発生する広く知られている基質である（Greer and Szalay, 2002）。Renillaルシフェラーゼでは、例えば、418~547nmの光放出をもたらすセレンテラジンアナログ／誘導体が入手可能である（Inouye et al., 1997、Loening et al., 2007）。Renillaルシフェラーゼを用いて400nmの光を放出するセレンテラジンアナログ／誘導体（400A、DeepBlueC）が記載されている（WO01/46691）。セレンテラジンアナログ／誘導体の他の例は、EnduRen、Prolume purple、Prolume purple II、Prolume purple III、ViviRen、及びフリマジンである。セレンテラジンアナログ／誘導体の他の例としては、PCT/US2013057660及びUS20140302539に開示の化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0147】

50

本明細書で使用される場合、「ルシフェリン」という用語は、広く定義され、生物発光が可能な生物に見出される光放生物学的色素のクラス、及び合成アナログまたは機能的に等価な化学物質を指し、これは、オキシルシフェリンを産生する酵素ルシフェラーゼ及び光の形態のエネルギーの存在下で酸化される。D-ルシフェリン、または2-(6-ヒドロキシベンゾチアゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸は、ホタルである *Photinus pyralis* から最初に単離された。それ以来、種々の異なる生物由来の、主に、海洋、例えば、魚及びイカ、由来のルシフェリンの種々の化学的に異なる形態が発見及び研究されているが、種々の異なる生物由来の、多くは、陸生成物、例えば、虫、甲虫、及び種々の他の昆虫、で確認されている (Day et al., 2004; Viviani, 2002)。本明細書で使用される場合、ルシフェリンは、ルシフェリンの誘導体またはアナログも含む。

10

【0148】

環状アルキルアミノルシフェリン (CycLuc1) などの完全な合成ルシフェリンに加えて、少なくとも5つの一般的な種類の生物学的に進化したルシフェリンがあり、これはそれぞれ、化学的に異なり、広範囲の異なる補因子を用いる化学的及び構造的に異なるルシフェラーゼにより触媒される。1つ目は、ホタルルシフェラーゼの基質であるホタルルシフェリンであり、これは、触媒反応のためにATPを必要とする (EC 1.13.12.7)。2つ目は、長鎖アルデヒド及び還元型のリボフラビンリン酸からなるイカ及び魚でも見られるバクテリアルシフェリンである。バクテリアルシフェラーゼは、FMNH依存性である。3つ目は、夜間の海洋燐光の原因となる生物である *Dinoflagellate* (海洋プランクトン) に見られるテトラピロールクロフィル誘導体である *Dinoflagellates* ルシフェリンである。 *Dinoflagellate* ルシフェラーゼは、 *Dinoflagellate* ルシフェリンの酸化を触媒し、3つの同一の触媒活性ドメインからなる。4つ目は、特定のオストラコッド及び深海魚、例えば、 *Porichthys* に見られるイミダゾロピラジンバルグリンである。最後は、放散虫、クシクラゲ、刺胞動物、イカ、カイアシ類、ヤムシ、魚、及びエビに見出されるタンパク質エクオリンの光放出があるコエレンテラジン (イミダゾールピラジン) である。

20

【0149】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、補因子を必要とする。補因子の例としては、ATP、マグネシウム、酸素、FMNH₂、カルシウム、またはそれらの任意の2つ以上の組み合わせが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

30

【0150】

B. アクセプタードメイン

本明細書で使用される場合、「アクセプタードメイン」は、化学発光ドナードメインの活性の結果として放出されるエネルギーを受容することが可能な任意の分子である。一部の実施形態では、アクセプタードメイン (本明細書では「アクセプター分子」とも呼ばれる) は、蛍光アクセプタードメインである。本明細書で使用される場合、「蛍光アクセプタードメイン」という用語 (本明細書では「蛍光アクセプター分子」とも呼ばれる) は、化学発光ドナーの活性の結果として放出されるエネルギーを受け入れて、光エネルギーとしてそれを再放出することができる任意の化合物を指す。

40

【0151】

本発明に用いることができる多数の異なるアクセプタードメインがある。好適なアクセプタードメインは、タンパク質または非タンパク質性であってよい。

【0152】

一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、タンパク質である。例としては、蛍光アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、GFPの青色蛍光多様体 (BFP)、GFPのシアン蛍光多様体 (CFP)、GFPの黄色蛍光多様体 (YFP)、増強GFP (EGFP)、増強CFP (ECFP)、増強YFP (EYFP)、GFP S65T、エメラルド、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化したEGFP (dEGFP)、不安定化したECFP (dECFP)、不安定化したE

50

YFP (dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、tダイマー2、tダイマー2 (12)、mRFP1、ポシロポリン、Renilla GFP、モンスターGFP、paGFP、TdTomato、mCherry、Kaedeタンパク質、TagRFP、TurboFB、もしくはフィコビリタンパク質、またはそれらのうちのいずれか1つの生物学的に活性な多様体もしくはフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0153】

一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、非タンパク質である。タンパク質ではないアクセプター分子の例としては、Alexa Fluor色素 (例えば、AF680、AF750)、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光マイクロスフェア、発光マイクロスフェア、蛍光ナノ結晶、マリーナブルー、カスケードブルー、カスケードイエロー、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、希土類元素キレート、またはそれらのうちの任意の組み合わせ、もしくは誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

1つの非常によく知られている例は、クラゲのAequorea victoria由来の緑色蛍光タンパク質及び分子生物学の適用、例えば、変異導入及びキメラタンパク質技術 (Tsien、1998)、から生じる多数の他の多様体 (GFP) を含む蛍光団の群である。GFPは、それらの発色団の特有の構成要素に基づいて分類され、各クラスは、異なる励起波長及び放出波長：クラス1、中性フェノール及びアニオン性フェノラートの野生型混合物：クラス2、フェノラートアニオン：クラス3、中性フェノール：クラス4、積層S電子系フェノラートアニオン：クラス5、インドール：クラス6、イミダゾール：及びクラス7、フェニルを有する。

【0155】

変異している天然に存在するアクセプター分子 (多様体) は、本発明に有用であり得る。BRETに適する操作系の一例は、媒介タンパク質 (複数可) の非存在下で、単独で互いに有意な程度に直接相互作用しないRenillaルシフェラーゼ及びGFPの増強された黄色変異体 (EYFP) のペアリングである (この場合、Gタンパク質結合受容体) (Xu et al.、1999)。

【0156】

別の実施形態では、アクセプタードメインは、蛍光ナノ結晶である。ナノ結晶、または「量子ドット」は、光分解への耐性、輝度の改善、非毒性、及びいくつかのプロセスの同時監視を可能にするサイズ依存性の狭い放出スペクトルを含む、蛍光標識として有機分子を超えるいくつかの利点を有する。さらに、ナノ結晶の吸収スペクトルは通常、非常に広く、全てのサイズ、従って、全ての色が単一の励起波長で励起されることを可能にする。この性質は、それらが多重化に適していることを意味する。ナノ結晶は、紫外及び可視領域の波長において非常に大きいモル吸光係数も有する。結果として、それらは、同じ励起光束で有機色素よりも10~50倍多い光子を吸収することができる。

【0157】

蛍光ナノ結晶は、様々な方法でタンパク質 (例えば、本出願のセンサーまたは標的配列) に付着しても、または「バイオコンジュゲート」されてもよい。例えば、「量子ドット」の表面キャップは、ジヒドロリボ酸 (DHLA) または両親媒性ポリマーのカルボキシラート基で負荷電であってよい。タンパク質は、直接的に、または組み換えタンパク質に融合している正荷電ロイシンジッパーペプチドからなるブリッジを介して、静電的にDHLAナノ結晶にコンジュゲートすることができる。後者は、意図する標的への特異性で、1次抗体に結合する。あるいは、抗体、スト렙トアビジン、または他のタンパク質は、従来のカルボジイミド化学を用いてナノ結晶のポリアクリレートキャップに共有結合により結合されている。

【0158】

セレン化カドミウム、硫化カドミウム、ヒ化インジウム、及びリン化インジウムを含む、ナノ結晶を製造するためのコロイド法がある。これらの量子ドットは、10～50原子の直径を有する、量子ドット体積内にわずか100～100,000原子を含み得る。一部の量子ドットは、より大きいバンドギャップを有する別の材料に埋め込まれている1つの材料の小さな領域である。これらは、例えば、コア内にCdSe及びシェル内にZnSを有するか、またはオルモシルと呼ばれるシリカの特別な形態に由来する、いわゆる、コア-シェル構造とし得る。ドットが大きいほど、蛍光スペクトルは、より赤く（エネルギーがより低く）なる。逆に、ドットが小さいほど、より青い（より高いエネルギー）光を放出する。呈色は、量子ドットのエネルギー準位と相関関係にある。定量的に言えば、蛍光を光のエネルギー（従って、色）を決定するバンドギャップエネルギーは、量子ドットのサイズの2乗に反比例する。量子ドットが大きいほど、より狭い間隙を介したより大きいエネルギー準位を有する。これにより、量子ドットが、より少ないエネルギーを含有する光子、すなわち、スペクトルの赤端により近い光子、を吸収可能になる。

10

【0159】

前述のようなナノ結晶は、有機分子及び／または巨大分子でコーティングすることができる。これらのコーティングは、ナノ結晶の特性を変更するために使用することができる。例えば、コーティングは、水性溶媒中のナノ結晶の溶解度を改善することができる。

【0160】

ナノ結晶または量子ドットのFRET及びBRETへの適用は、Kim and Kim (2012) に概説されている。

20

【0161】

代替的实施形態では、アクセプター分子は、蛍光マイクロスフェアである。これらは通常は、ポリマーから作製され、ポリマーマトリックス中に組み込まれている蛍光分子（例えば、フルオレセインGFPまたはYFP）を含有し、これは、様々な試薬にコンジュゲートすることができる。蛍光マイクロスフェアは、内部または表面上に標識されていてもよい。内部標識は通常、狭い蛍光放出スペクトルを有する非常に明るく安定した粒子を生成する。内部標識を用いて、表面基は依然として、リガンド（例えば、タンパク質）をビーズの表面にコンジュゲートするために利用可能である。内部標識ビーズは、光退色に対してより高い耐性を示すので、イメージング用途に広く使用される。

【0162】

カルボキシラート修飾蛍光マイクロスフェアは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDAC)などの水溶性カルボジイミド試薬を使用したタンパク質の共有結合に適する。硫酸蛍光マイクロスフェアは、比較的疎水性であり、受動的且つほぼ不可逆的にいかなるタンパク質も吸着するであろう。アルデヒド-硫酸蛍光マイクロスフェアは、表面アルデヒド基を付加して、タンパク質と反応するように修飾されている硫酸マイクロスフェアである。

30

【0163】

別の実施形態では、アクセプター分子は、発光マイクロスフェアである。これらは通常、ポリマーマトリックスに組み込まれている発光分子（例えば、ユーロピウムまたは白金の錯体）を含有するポリマーから作製され、これは、様々な試薬にコンジュゲートすることができる。

40

【0164】

本発明に有用な非蛍光アクセプタードメインの例としては、DABCYL [4-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)アゾ]安息香酸]、DABSYL (ジメチルアミノアズスルホン酸)、金及び銀などの金属ナノ粒子、ブラックホール消光剤(BHQ)、ならびにQXL消光剤などの消光剤が挙げられる。

【0165】

C. 化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインペア

任意の数のドナー-アクセプターの組み合わせは、本発明のセンサーに使用することができる。当業者は、効率的なエネルギー移動を許容するドナー及びアクセプターのペアを

50

選択することができるであろう。好ましい実施形態では、*Pseudomonas* sp. プロテアーゼの不存在下での化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインの分離及び相対的配向は、*Forster* 距離の $\pm 50\%$ 以内である。本明細書で使用される場合、「分析物の存在下及び／または不存在下での化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインの分離及び相対的配向は、*Forster* 距離の $\pm 50\%$ 以内である」という用語は、 R_0 の $\pm 50\%$ の範囲内で実施することができる定常状態のRET測定値を指す。この語句は、化学発光ドナードメインからアクセプタードメインへの $10\sim 90\%$ の範囲の発光エネルギー移動の効率を包含する。一部の実施形態では、化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインの*Forster* 距離は、少なくとも 4 nm である。一実施形態では、化学発光ドナードメイン及びアクセプタードメインの*Forster* 距離は、約 $4\text{ nm}\sim$ 約 10 nm 、または約 $6\text{ nm}\sim$ 約 10 nm である。

10

【0166】

好適なペアリングを決定する際に考慮されるべき基準は、ドナーのものと比較したアクセプター分子の相対放出／蛍光スペクトルである。ドナーの放出スペクトルは、ドナー発光放出の光エネルギーが、アクセプター分子を励起し、それにより、2つの分子が互いに関して適切な近接性及び配向性で存在する場合に、アクセプター分子の蛍光を促進することができる波長にあるように、アクセプターの吸収スペクトルと重なり合うはずである。例えば、*Renilla* ルシフェラーゼ／EGFP ペアリングは、観察可能な放出スペクトルピークに基づく*Renilla* ルシフェラーゼ／EYFP ペアリング程良好ではないことが実証されている (Xu、1999年; Wang et al.、1997年)。可能なペアリングを研究するために、選択された生物発光タンパク質及びアクセプター分子を含有するタンパク質融合 (例えば) が調製され、適切な基質の存在下で、試験される。

20

【0167】

ドナー及びアクセプター分子が誤って互いに結合していないことも確認されるべきである。これは、例えば、同じ細胞内で生物発光タンパク質及びアクセプター分子を別々に同時発現させて、次に、RETが起こるかどうかを決定するために発光スペクトルを監視することにより達成することができる。これは、例えば、Xu et al. (1999) の方法を使用して達成されてもよい。選択された生物発光タンパク質及びアクセプター分子は、RETペアがほとんどまたは全く観察されない場合、好適なRETペアを形成する。

30

【0168】

ドナー放出は、基質に対する修飾により操作することができる。*Renilla* ルシフェラーゼの場合、基質は、セレンテラジンである。ドナー放出を変更することの背後にある理論的根拠は、ドナー放出及びアクセプター放出間の分解能を改善することである。オリジナルのRETシステムは、ドナーとして*Renilla* ルシフェラーゼ、アクセプターとしてEYFP (またはTopaz)、及び基質としてセレンテラジン誘導体を使用する。これらの構成要素は、RETアッセイで組み合わせた場合、 $45\sim 55\text{ nm}$ のスペクトル分解能を与える、生物発光タンパク質の場合 $475\sim 480\text{ nm}$ の範囲の光及びアクセプター分子の場合 $525\sim 530\text{ nm}$ の範囲の光を生じる。

【0169】

残念ながら、*Renilla* ルシフェラーゼは、GFP放出と実質的に重なり合う広い放出ピークを生じ、それにより、これは、システムのノイズに対するシグナルを減少させるのに寄与する。本発明に使用される1つのRETシステムは、*Renilla* ルシフェラーゼ基質としてcoel400aを有し、ドナー及びアクセプター放出波長間の広いスペクトル分解能 (約 105 nm) を提供する。coel400aを有する*Renilla* ルシフェラーゼは、 $390\sim 400\text{ nm}$ の光を生じ、この範囲の光を吸収して、 $505\sim 508\text{ nm}$ の光を再放出するGFP誘導体 (GFP_2) を調製した。*Renilla* ルシフェラーゼ及びGFP放出間のスペクトル分解能のこの増加のために、このRETシステムは、細菌プロテアーゼである標的配列の切断を監視する優れた生物学的ツールを提供する。しかし、より小さいストークスシフトRETシステムもまた、プロテアーゼ活

40

50

性の高感度測定を可能にするであろう。

【0170】

R e n i l l a ルシフェラーゼ活性の結果として（野生型セレンテラジンにより生成されるものとは異なる）種々の波長の光を生成する、c o e l 4 0 0 aを含む種々のセレンテラジン誘導体が当該分野で既知である。当業者は、ドナーの光放出ピークが変化しているので、この波長の光を吸収し、それにより、効率的なエネルギー移動を許容するアクセプター分子を選択することが必要であることを理解するであろう。これは、例えば、クラス3または1のGFPになるように、GFPクラス4を変更することにより行うことができる。ドナーの光放出及びアクセプターの光吸収ピーク間のスペクトルの重なりは、とりわけ、効率的なエネルギー移動のための1つの条件である。クラス3及び1のGFPは、400nmの光を吸収して、505～511nmで再放出することが知られている。これにより、約111nmのドナー及びアクセプター放出間の波長差が生じる。

10

【0171】

さらなる生物発光タンパク質及びアクセプター分子のペアの例は、表2に提示される。
表2．例示的なBRET生物発光タンパク質及びアクセプター分子ペア

【表 2 - 1】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	Venus	515/528nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	mOrange	548/562nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	EYFP/Topaz	514/527nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	mCitrine	516/529nm
Rluc Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	YPet	517/530nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	フルオレセイン	495/519nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	アクリジンエロー	470/550nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	ナイルレッド	485/525nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	R-フィコエリスリン	480/578nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	Red 613	480/613nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	TruRed	490/695nm
RLuc8. 6 ~5. 35	天然セレンテラジン	535nm	mOrange	548/562nm
RLuc8. 6 ~5. 35	セレンテラジンh	535nm	TagRFP	555/584nm
RLuc8. 6 ~5. 35	セレンテラジンh	535nm	TurboRFP	588/635nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンv	515nm	mOrange	548/562nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンv	515nm	TagRFP	555/584nm
RLuc8. 6 ~5. 35	セレンテラジンv	570nm	TurboRFP	588/635nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	Venus	515/528nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	mOrange	548/528nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	EYFP/Topaz	514/527nm

10

20

30

40

【表 2 - 2】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	mCitrine	516/529nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	YPet	517/530nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	フルオレセイン	490/525nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	アクリジンエロー	470/550nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	ナイルレッド	485/525nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	R-フィコエリスリン	480/578nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	Red 613	480/613nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジンh	470nm	TruRed	490/695nm
RLuc8. 6 ~5. 35	セレンテラジンh	535nm	mOrange	548/562nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	GFP2	396/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	GFP10	400/510nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	野生型GFP	396 (475) /508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	TagBFP	402/457nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	Cerulean /mCFP	433/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	ECFP/CyPet	434/477nm

10

20

30

40

【表 2 - 3】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	Y66W	436/485nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	dKeima-Red	440/616nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	mKeima-Red	440/620nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	Quin-2	365/490nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400a	400nm	パシフィックブルー	403/551nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン400	400nm	ダンシルクロリド	380/475nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	シアニンCy3	575/605nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	テキサスレッド	590/615nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	TurboRed	553/574nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	tdTomato	554/581nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	TagRFP	555/584nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	DsRed	557/592nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	mRFP1	584/607nm
ホタル ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	mCherry	587/610nm
甲虫緑色 ルシフェラーゼ	ルシフェリン	560nm	tdTomato	554/581nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	ルシフェリン	560nm	AF680	679/702nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	ルシフェリン	560nm	AF750	749/775nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	Venus	515/528nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	mOrange	548/562nm

10

20

30

40

【表 2 - 4】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
NanoLuc	フリマジン	460nm	EYFP/Topaz	514/527nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	mCitrine	516/529nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	YPet	517/530nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	フルオレセイン	495/519nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	アクリジンエロー	470/550nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	ナイルレッド	485/525nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	R-フィコエリスリン	480/487nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	Red 613	480/613nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	TruRed	490/695nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	オレゴングリーン	496/516nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	diAcFAM	494/526nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	AlexFluor 488	494/517nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	TMR	555/585nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	Halotag NCT	595/635nm
NanoLuc	フリマジン	460nm	Halotag BRET 618	525/618nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Venus	515/528nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	mOrange	548/562nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	EYFP/Topaz	514/527nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	mCitrine	516/529nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	YPet	517/530nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	フルオレセイン	495/519nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	アクリジンエロー	470/550nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	ナイルレッド	485/525nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	R-フィコエリスリン	480/487nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Red 613	480/613nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	TruRed	490/695nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	オレゴングリーン	496/516nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	diAcFAM	494/526nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	AlexFluor 488	494/517nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	TMR	555/585nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Halotag NCT	595/635nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Halotag BRET 618	525/618
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	オレゴングリーン	496/516nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	diAcFAM	494/526nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	AlexFluor 488	494/517nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	TMR	555/585nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Halotag NCT	595/635nm

10

20

30

40

【表 2 - 5】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
NanoLuc	天然セレンテラジン	460nm	Halotag BRET 618	525/618
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	Venus	515/528nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	mOrange	548/562nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	EYFP/Topaz	514/527nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	mCitrine	516/529nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	YPet	517/530nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	フルオレセイン	495/519nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	アクリジンエロー	470/550nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	ナイルレッド	485/525nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	R-フィコエリスリン	480/487nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	Red 613	480/613nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	TruRed	490/695nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	オレゴングリーン	496/516nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	diAcFAM	494/526nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	AlexFluor 488	494/517nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	TMR	555/585nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	Halotag NCT	595/635nm
NanoLuc	セレンテラジンh	460nm	Halotag BRET 618	525/618
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	GFP2	396/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	GFP10	400/510nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	野生型GFP	396 (475) /508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	TagBFP	402/457nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	Cerulean /mCFP	433/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	ECFP/CyPet	434/477nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	Y66W	436/485nm

10

20

30

40

【表 2 - 6】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	dKeima-Red	440/616nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	mKeima-Red	440/620nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	Quin-2	365/490nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	パシフィックブルー	403/551nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質	405nm	ダンシルクロリド	380/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	GFP2	396/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	GFP10	400/510nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	野生型GFP	396(475) /508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	TagBFP	402/457nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	Cerulean /mCFP	433/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	ECFP/CyPet	434/477nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	Y66W	436/485nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	dKeima-Red	440/616nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	mKeima-Red	440/620nm

10

20

30

40

【表 2 - 7】

BDP	基質	基質波長 (ピーク)	蛍光アクセプター分子	アクセプターの波長 (Ex/Em)
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	Quin-2	365/490nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	パシフィックブルー	403/551nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質II	400nm	ダンシルクロリド	380/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	GFP2	396/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	GFP10	400/510nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	野生型GFP	396(475) /508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	TagBFP	402/457nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	Cerulean /mCFP	433/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	ECFP/Cypet	434/477nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	Y66W	436/485nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	dKeima-Red	440/616nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	mKeima-Red	440/620nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	Quin-2	365/490nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	パシフィックブルー	403/551nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple基質III	410nm	ダンシルクロリド	380/475nm

【0172】

D. 蛍光団ドメイン及びアクセプタードメイン

一部の実施形態では、検出可能な標識は、蛍光団ドナードメイン及びアクセプタードメ

10

20

30

40

50

インを含む。本明細書で使用される場合、「ドナー」という用語は、特定の波長の光を照射された場合に、光を放出する分子を意味する。本明細書で使用される「アクセプター」という用語は、ドナーから、ドナーの励起時にエネルギーを吸収することができる分子を指す。ドナー及びアクセプターの双方が光エネルギーを吸収することができるが、ドナーのみが光エネルギーを放出することが必要とされ、すなわち、ドナーは、蛍光性であり得、アクセプターは、非蛍光性であり得る。アクセプターが光エネルギーを放出しない場合、それは、消光剤または消光剤ドメインと呼ばれる。本発明に有用なアクセプターは一般に、ドナーの励起に適する波長のかかなり低い吸収も有する。好ましい実施態様では、検出可能な標識は、蛍光ドナー及び消光剤ドメインを含む。

【0173】

ドナーの放出スペクトルがアクセプターの励起スペクトルと重複する場合、任意の適切に選択された発色団をドナー及び／またはアクセプターとして使用することができる。本明細書で使用される場合、アクセプターの吸光度スペクトル及びドナーの放出スペクトルに関して、「重なり合うこと」という用語は、部分的または完全に共有されている吸収スペクトル及び放出スペクトルを意味する。従って、このような重なり合うスペクトルでは、ドナーの放出スペクトルの範囲の上限は、アクセプターの吸光度スペクトルの範囲の下限よりも高い。

【0174】

ドナー及び／またはアクセプターとしての使用に適している蛍光団の非限定例としては、フルオレセイン、ローダミン、4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール (NBD) ; カスケードブルー、4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジフェニル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 ; 4, 4-ジフルオロ-5, p-メトキシフェニル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、4, 4-ジフルオロ-5-スチリル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 ; 6-カルボキシ-X-ローダミン、N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン ; 5-((2-ヨードアセチル)アミノ)エチル)アミノ)ナフタレン-1-スルホン酸などのヨードアセチル指向プローブ (IAEDANS、AEDANSと互換的に使用される) ; 5-カルボキシフルオレセイン ; 6-カルボキシフルオレセイン ; 6-(フルオレセイン-5-カルボキサミド)ヘキサノ酸 ; フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ; テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) ; テキサスレッド (TR) ; エオシン ; フィコビリタンパク質 ; シアニン色素 ; クマリン ; R-フィコエリスリン ; アロフィコエリトリン (APC) ; R-フィコエリスリン (R-PE) コンジュゲート ; Alexa Fluor 色素 ; 量子ドット色素 ; 4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-マレイミド (DABmal)、及びフルオレセイン-5-マレイミド (Fmal) などのマレイミド指向プローブ ; またはそれらの組み合わせ (例えば、タンデムコンジュゲート) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0175】

他の非限定例としては、ATP-、ADP-、またはAMP-アナログなどのヌクレオチドアナログが挙げられる (例えば、Bagshaw, 2001を参照のこと)。特定の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、蛍光性である。蛍光ヌクレオチドアナログの例としては、実例として、2'-(または-3')-O-(トリニトロフェニル)アデノシン5'-三リン酸 (TNP-ATP)、2'-(または-3')-O-(トリニトロフェニル)アデノシン5'-二リン酸 (TNP-ADP)、e-ATP、e-アザ-ATP、FTP、2AP-TP、ant-ATP、Mant-ATP、DEDA-ATP、FEDA-ATP、REDA-ATP、及びCys3-EDA-ATPが挙げられる。

【0176】

他の非限定例としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、GFPの青色蛍光多様体 (BF P)、GFPのシアン蛍光多様体 (CF P)、GFPの黄色蛍光多様体 (YFP)、増強 GFP (EGFP)、増強 CF P (ECFP)、増強 YFP (EYFP)、GFPS 65 T、エメラルド、Venus、mOrange、Topaz、GFPUv、不安定化し

10

20

30

40

50

たEGFP (dEGFP)、不安定化したECFP (dECFP)、不安定化したEYFP (dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、tダイマー2、tダイマー2 (12)、mRFP1、ポシロポリン、Renilla GFP、モンスターGFP、pGFP、TdTomato、mCherry、Kaedeタンパク質、TagRFP、TurboFB、もしくはフィコビリタンパク質、またはそれらのうちのいずれか1つの生物学的に活性な多様体もしくはフラグメントなどのタンパク質が挙げられる。

【0177】

一部の実施形態では、ドナー蛍光団ドメインは、上で規定されたようなナノ結晶または量子ドットとし得る。

10

【0178】

一部の実施形態では、アクセプタードメインは、消光剤とし得る。本明細書で使用される場合、「消光」という用語は、機序にかかわらず、エネルギー移動による消光ドメインにより引き起こされる蛍光ドナーの蛍光の減少を指す。それ故、消光剤の存在下での蛍光ドナーの照度は、予想されるよりも強度が弱い、またはさらには完全に存在しない放出シグナルをもたらす。適切に選択された任意の分子は、蛍光団ドナードメインとして使用されている蛍光団の蛍光強度を減少させる場合、消光剤として使用することができる。消光剤の例としては、Deep Dark Quencher DDQ-I、DABCYL、Eclipse (登録商標) Dark quencher、Iowa Black (登録商標) FQ、BHQ-1、QSY-7、BHQ-2、DDQ-II、Iowa Black (登録商標) RQ、QSY-21、Black Hole Quencher (登録商標) BHQ-3、及び金ナノ粒子が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0179】

任意の数のドナー-アクセプターの組み合わせは、本発明のセンサーに使用することができる。当業者は、効率的なエネルギー移動を許容するドナー及びアクセプターのペアを選択することができるであろう。例えば、Bryce et al. (2016) 及び Sapsford et al. (2006) を参照のこと。

【0180】

検出可能な変化

プロテアーゼ、例えば、Pseudomonas spp. プロテアーゼによる本発明のセンサーの切断は、検出可能な変化を生じる。当業者が認識するように、本発明のセンサーはまた、センサーが他のプロテアーゼにより認識及び切断された切断部位を含有する場合、他のプロテアーゼにより切断され得る。

30

【0181】

当業者が理解するように、本明細書で使用される「検出可能な変化」は、センサーにおける任意の測定可能な変化である。例えば、検出可能な変化は、センサーの物理的または化学的特性の変化とし得る。一部の実施形態では、検出可能な変化は、音響、電気化学ポテンシャル、蛍光、化学発光、燐光、吸光度、抗体結合、BRET比、FRET効率、または質量の変化である。一部の実施形態では、検出可能な変化は、蛍光、化学発光、燐光、吸光度、抗体結合、または質量の変化である。本発明の利点は、センサーが、利用可能な検出技術に適するように適合させることができることである。検出可能な変化は、当業者に既知の任意の技術を使用して測定することができる。

40

【0182】

好ましい実施形態では、検出可能な変化は、BRET比の変化である。一例としてBRET測定を使用して、一実施形態では、生物発光タンパク質及びアクセプター分子間に生じるエネルギー移動は、特定の波長を選択する光学フィルタを使用して測定された放出から計算された比 (1つは、アクセプター分子放出用、もう1つは、生物発光タンパク質放出用) として提示される (等式1を参照のこと)。

$E_a / E_d = \text{BRET比} (1)$

E_a は、アクセプター分子放出強度として定義され (放出光は、アクセプターの放出に適

50

合した特定のフィルタを使用して選択され)、E dは、生物発光タンパク質放出強度として定義される(放出光は、生物発光タンパク質の放出に適合する特定のフィルタを使用して選択される)。

【0183】

光学フィルタは、B R E Tに適する波長識別を可能にする任意の種類のフィルタであり得ることが当業者により容易に理解されるべきである。例えば、本発明に従って使用される光学フィルタは、干渉フィルタ、ロングパスフィルタ、ショートパスフィルタなどとし得る。フィルタを通過する波長の強度(通常は、1秒当たりのカウント数(C P S)または相対発光単位(R L U))は、固相マイクロ光電子増倍管(マイクロP M T)、光電子増倍管(P M T)、カスケードフォトダイオード、フォトダイオードアレイ、または電荷結合素子(C C D)カメラなどの高感度カメラを含むフォトダイオードのいずれかを使用して定量することができる。続いて、定量化されたシグナルは、B R E T比を計算するために使用され、エネルギー移動効率を表す。B R E T比は、アクセプター放出の強度の増加に伴って増加する。

10

【0184】

一般に、ドナー放出強度に対するアクセプター放出強度の比が決定され(等式1を参照のこと)、これは、エネルギー移動効率を反映する任意の単位で表される数である。比率は、エネルギー伝達効率の増加に伴って増加する(X u e t a l.、1999を参照のこと)。

【0185】

エネルギー移動効率は、アクセプター放出強度に対するドナー放出強度の逆比を使用して表すこともできる(等式2を参照のこと)。この場合、比率は、エネルギー移動効率の増加に伴って減少する。この計算を実施する前に、放出強度は、バックグラウンド光の存在及び基質の自己発光について補正される。この補正は一般に、基質を含有するが、本発明の生物発光タンパク質、アクセプター分子、またはポリペプチドを含有しない対照試料から、適切な波長で測定された放出強度を差し引くことにより行われる。

20

$$E d / E a = B R E T \text{ 比 } (2)$$

E a及びE dは、上で規定された通りである。

【0186】

生物発光タンパク質及びアクセプター分子放出の光強度は、分光蛍光光度計、電荷結合素子(C C D)カメラ、またはダイオードアレイ検出器などのモノクロメーターベースの装置を使用して定量することもできる。分光蛍光光度計を使用して、基質の添加時に生物発光タンパク質及びアクセプター分子放出ピークの双方が検出されるように、放出スキャンが実施される。 $\lambda_{m a x}$ または最大強度に対するいずれかの任意の強度により規定される波長でのピーク下面積または強度は、相対的な光強度を表すために使用することができ、上で概説したように、比を計算するために使用されてもよい。同じ試料からの生物発光タンパク質及びアクセプター分子についての光を測定することが可能な任意の装置が、本発明のB R E Tシステムを監視するために使用することができる。

30

【0187】

代替的实施形態では、アクセプター分子放出のみが、B R E Tの効果的な検出及び/または定量化に適している。この場合、エネルギー移動効率は、アクセプター放出強度のみを使用して表される。エネルギー移動を測定するために、いかなる比率計算も行うことなくアクセプター放出強度を使用され得ることが、当業者には容易に明らかであろう。これは、理想的には、アクセプター分子が、生物発光タンパク質から移動した光を吸収する場合にのみ、光を放出するであろうという事実に起因するものである。この場合、1つの光フィルタのみが必要とされる。

40

【0188】

関連する実施形態では、生物発光タンパク質放出単独が、B R E Tの効果的な検出及び/または定量化に適する。この場合、エネルギー移動効率は、生物発光タンパク質放出強度のみを使用して計算される。エネルギー移動を測定するために、いかなる比率計算も行

50

うことなくドナー放出強度を使用され得ることが、当業者には容易に明らかであろう。これは、アクセプター分子が生物発光タンパク質から移動した光を吸収するので、生物発光タンパク質からの検出可能な放出の対応する減少があるという事実に起因するものである。この場合、1つの光フィルタのみが必要とされる。

【0189】

代替的实施形態では、エネルギー伝達効率は、測定用の光学フィルタを1つのみ必要とするレシオメトリック測定を使用して表される。この場合、ドナーまたはアクセプターの光強度は、適切な光学フィルタを使用して決定され、試料の別の測定は、いかなるフィルタも使用せずに行われる（オープンスペクトルの強度）。この後者の測定では、全光出力（全波長に対する）が定量される。次に、比率計算は、式3または4のいずれかを使用して行われる。等式3では、アクセプター用の光学フィルタのみが必要とされる。等式4では、ドナー用の光学フィルタのみが必要とされる。

$$E_a / E_o - E_a = BRET \text{ 比または } = E_o - E_a / E_a \quad (3)$$

$$E_o - E_d / E_d = BRET \text{ 比または } = E_d / E_o - E_d \quad (4)$$

E_a 及び E_d は、上で規定された通りであり、 E_o は、結合された全ての波長の放出強度として規定されている（オープンスペクトル）。

【0190】

さらなる等式は、等式1～4から導き出すことができることが、当業者には、容易に明らかでなければならない。例えば、このような1つの誘導体は、生物発光タンパク質及び／またはアクセプター分子の放出波長で存在するバックグラウンド光について補正することを含む。

【0191】

BRETアッセイを実施する際には、光放出は、BRETCountを使用して各ウェルから決定することができる。BRETCount装置は、改良型TopCountであり、TopCountは、Packard Instrument (Meriden、コネチカット州) により販売されているマイクロタイタープレートシンチレーション及びルミネセンスカウンターである。バックグラウンドノイズを排除するために2つの光電子増倍管 (PMT) を利用する従来のカウンターとは異なり、TopCountは、標準の不透明なマイクロタイタープレートでのカウントを可能にするノイズ低減用のシングルPMTテクノロジー及び時間分解パルスカウントを用いる。不透明なマイクロタイタープレートを使用すると、光学的クロストークを無視できるレベルまで低減させ得る。TopCountは、それぞれ、1、2、6、または12の試料の同時読み出しを可能にする1、2、6及び12の検出器 (PMT) を含む種々のフォーマットで提供される。BRETCountに加えて、他の市販の装置：Victor 2 (Wallac、フィンランド (Perkin Elmer Life Sciences)) 及びFusion (Packard Instrument、メリデン) は、BRETを実施可能である。BRETは、少なくともアクセプター分子放出、好ましくは、2つの波長 (アクセプター分子用及び生物発光タンパク質用)、またはそれ以上を検出し得るリーダーを使用して実施することができる。

【0192】

当業者が理解するように、BRETは、センサーがアクセプタードメインに対して化学発光ドナードメインを有する検出可能な標識を含むことを必要とする。これらの実施形態では、標的配列が *Pseudomonas* spp. プロテアーゼにより切断される場合に、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び／または双極子配向を変更して、BRET比の変化をもたらす。

【0193】

本明細書で使用される場合、「空間的位置」という用語は、ドナードメインが標的配列を介してアクセプタードメインに連結されないよう、プロテアーゼがセンサー分子を切断した結果として変化するアクセプター分子に対するドナーの3次元配置を指す。

【0194】

本明細書で使用される場合、「双極子配向」という用語は、3次元空間におけるドナー及び／またはアクセプター分子の配向に対する、ドナー及び／またはアクセプター分子のいずれかと関連する双極子モーメントの3次元空間における方向を指す。双極子モーメントは、分子上の電荷の変動の結果である。

【0195】

Pseudomonas spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、BRET比の変化をもたらす。例えば、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、観察された最大BRET比の約2%～約95%のBRET比の変化をもたらす。一部の実施形態では、BRET比の変化は、観察された最大BRET比の約5%～約90%、約15%～約50%、または約15%～約40%である。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、観察された最大BRET比の2%以上であるBRET比の変化をもたらす。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、観察された最大BRET比の5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、35%以上であるBRET比の変化をもたらす。15%以上のBRET比の変化は、プロテアーゼ検出のシグナル対ノイズ比を増加させる。これは、所与のあらゆるサンプリング時間に対する優れた検出限界及びプロテアーゼ濃度のレベルのより正確なコーディングをもたらす。あるいは、一定の検出限界では、BRET比のより大きな変化は、より短いシグナル積分時間を容易にし、それ故、より迅速な検出を容易にする。

【0196】

本明細書で使用される場合、「ストークスシフト」は、同じ電子遷移の吸収スペクトルのバンド最大値の位置及び放出スペクトルのバンド最大値の位置間の波長の差である。好ましくは、アクセプタードメインは、大きなストークスシフトを有する。吸収スペクトルの最大バンドの位置及び放出スペクトルの最大バンドの位置間の差が大きいと、放出された信号から反射励起放射を除去するのが容易になるので、大きなストークスシフトが望ましい。

【0197】

一部の実施形態では、アクセプタードメインは、約50nmを超えるストークスシフトを有する。一部の実施形態では、アクセプタードメインは、約50nm～約350nm、約50nm～約150nmのストークスシフトを有する。一部の実施形態では、アクセプタードメインは、約90nmより大きい、例えば、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、または150nmのストークスシフトを有する。

【0198】

BRETは、外部光源を用いるドナーの励起を必要としないので、蛍光に基づく技術に優るいくつかの利点を有する。BRETは、ドナー部分の自己蛍光、光散乱、光退色、及び／または光異性化、または細胞への光損傷を受けない。BRETアッセイに外部光源が存在しないと、バックグラウンドが非常に低くなり、その結果、検出感度が向上する。例えば、BRETは、トロンビン触媒によるタンパク質分解的な切断の監視に関して、FRETよりも感度が50倍高い(Dacres et al., 2009)。

【0199】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、FRET効率の変化であり、例えば、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、FRET効率の変化をもたらす。本明細書で使用される場合、FRETは、1つの蛍光団(ドナー)からアクセプターへのエネルギーの非放射移動に基づく近接アッセイである。アクセプターは通常、異なる色の蛍光を放出する別の蛍光団とし得る。アクセプターはまた、光を放出しない消光剤とし得る。Forsterの等式(Forster (1948)及びForster (1960))によると、FRET効率は、5つのパラメータ:(i)第2の蛍光団の吸収スペクトル及び第1の蛍光団の放出スペクトル間の重なり、(ii)ドナーの放出双極子及びアクセプターの吸収双極子間の相対的配向、(iii)蛍光団間の距離、(iv)ドナーの量子収量、及び(v)アクセプターの吸光係数、に依存する。

【0200】

通常は、ドナー及びアクセプターは、本発明のセンサーを形成する標的配列のN末端及びC末端に結合している。ドナー及びアクセプターがインタクトな標的配列に結合している場合、アクセプターからの放出が、ドナー粒子の励起時に観察される。プロテアーゼが標的配列を切断すると、ドナー及びアクセプター間のエネルギー移動が中断される。ドナー及びアクセプターの双方が蛍光団である場合、切断は、ドナー対アクセプターの蛍光放出の比を変える。ドナーが蛍光団であり、且つアクセプターが消光剤である場合、切断は、蛍光強度を増加させる。これは、ドナー及びアクセプター間の距離が、センサーの切断時に、大幅に増大するためである。

【0201】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、燐光の変化であり、例えば、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、燐光の変化をもたらす。燐光の変化は、当業者に既知の技術を使用して測定することができる。本明細書で使用される場合、「燐光」は、物質により吸収されたエネルギーが光の形態で比較的ゆっくり放出されるプロセスである。

【0202】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、時間分解蛍光の変化である。蛍光の変化は、当業者に既知の技術を使用して測定することができる。

【0203】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、吸光度の変化であり、例えば、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、吸光度の変化をもたらす。一部の実施形態では、センサーは、発色団（例えば、p-ニトロアニリン）を含む。*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、発色団の化学的環境を変え、分光光度計を使用して測定することができる吸光度の変化をもたらすであろう。一部の実施形態では、センサーの標的配列は、N末端またはC末端で、発色団、好ましくは高イプシロン発色団で標識され、非標識末端は、固体支持体（例えば、ビーズまたは表面）に付着する。*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、発色団を固体支持体から分離し、発色団を反応培地中に放出する。培地中に放出される発色団の量は、当業者に既知の技術を使用して決定することができる。さらなる実施形態では、センサーは、発色基質または化学発光基質を使用して吸光度変化を生じさせ得る酵素（例えば、アルカリホスファターゼ／西洋ワサビペルオキシダーゼなど）を含む。センサーは、固体基質（例えば、ビーズまたは表面）にも結合している。*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、当業者に既知の技術を使用した酵素アッセイを使用して検出することができる反応培地中に、色または光生成部分を放出するであろう。

【0204】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、抗体結合の変化であり、例えば、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、抗体を使用して検出することができるエピトープを放出する。一部の実施形態では、センサーは、エピトープ（例えば、myc、Flag、ヘキサヒスチジンなど）を含む。任意に、センサーは、固体支持体に結合している。*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、当業者に既知の方法を使用して検出することができる反応培地中にエピトープを放出する。未放出エピトープは、関連する抗体（例えば、抗myc、抗6XHISTAG、または抗FLAG）及び当業者に既知の方法を使用して検出することもできる。

【0205】

一部の実施形態では、検出可能な変化は、質量の変化である。当業者に理解されるように、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、センサーの質量を変化させる。質量の変化は、当業者に既知の任意の好適な技術、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）または水晶振動子マイクロバランス（QCM）などの任意のマイクロ計量技術を使用して検出することができる。一部の実施形態では、センサーは、当業

10

20

30

40

50

者に既知の任意の技術（例えば、チオール結合）を介してSPRチップまたはQCM上に固定化することができる。SPRの場合、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、局所的な屈折率の変化をもたらす、測定することができるSPRの変化をもたらす。QCMの場合、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼによる標的配列の切断は、共振器の質量を変化させ、QCMの共振周波数の変化を検出することができる。一部の実施形態では、センサーは、標的配列が切断された時に、質量の変化がより大きくなるように、大きな分子、ビーズなどを含む。

【0206】

組成物、方法、及び使用

本発明のセンサーは、細菌プロテアーゼを検出するのに使用される組成物に含まれていてもよい。一部の実施形態では、本発明によるセンサー及び許容される担体を含む組成物が提供される。本明細書で使用される場合、「許容される担体」という用語は、本発明の方法及び使用に適合する任意の及び全ての固体または溶媒（例えば、リン酸緩衝生理食塩水緩衝液、水、生理食塩水）、分散媒、コーティングなどを含む。許容される担体は、組成物の他の成分と適合性があり、且つ試験されているプロテアーゼを阻害または損傷しないという意味において「許容される」はずである。一般に、好適な許容される担体は、当該分野で既知であり、最終用途に基づいて選択される。

【0207】

当業者が理解するように、本出願のセンサーは、試料中の*Pseudomonas* spp. プロテアーゼの有無を検出するために使用することができ、存在する場合、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼの活性を決定するためにも使用されてもよい。それ故、一部の実施形態では、試料中の*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出する方法が提供され、方法は、i) 試料を本発明のセンサーと接触させること、及び、ii) センサーの変化を検出すること、を含み、該変化は、試料中の*Pseudomonas* spp. プロテアーゼの存在に対応する。

【0208】

乳製品中の*Pseudomonas* spp. 及び他の細菌由来のκ-カゼイン分解性プロテアーゼを検出及び定量するために、貯蔵寿命及び品質を予測するために、且つ細菌プロテアーゼ駆動型腐敗を低減させるか、遅延させるか、または排除するように設計された管理及び加工処理を最適化するために、センサーを使用することができる。

【0209】

本明細書で使用される場合、乳製品及び他の食品に関して「腐敗」という用語は、それが、もはや食欲をそそらないか、またはヒトの摂取用に適していない時点までの、製品の質感、色、匂い、及び／または風味の変質を記載するために使用される用語である。*Pseudomonas* spp. などの微生物により引き起こされる腐敗の場合、腐敗は多くの場合、微生物またはそれらの酵素によるタンパク質（例えば、カゼイン及び乳清）、炭水化物、ならびに脂肪の分解を伴う。本発明者らは、37℃において、細菌プロテアーゼが、1 pMを超える濃度で存在する場合、乳汁腐敗を引き起こし得ることを観察している。この場合、腐敗は、（得られた外観が「凝乳及び乳清」である）ミルクの相分離により明示される。

【0210】

本明細書で使用される場合、「乳製品」という用語は、ミルク、及びミルクから部分的にまたは完全に取出された製品を含む。乳汁は、任意の哺乳動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラクダ、バッファロー、ヒトなどから得られ得る。乳製品は、未殺菌乳、低脂肪乳、無脂肪乳、低温殺菌乳、UHT乳、ラクトース変性UHT乳、強化UHT乳、フレーバーUHT乳、及びこれらの製品の組み合わせ、ならびにUHT特殊調製粉乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バターミルク、クリーム、粉乳、乳児用調製粉乳、及びバターなどを含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、乳製品の腐敗を検出する方法が提供され、方法は、i) 試料を本発明のセンサーと接触させること；及び、ii) センサーの変化を検出することを含み、該変化は、乳製品が、腐敗しているか、腐敗し始

めているか、または腐敗する可能性を有することを示す。この例では、標的配列は、少なくとも部分的に乳汁腐敗を引き起こす *Pseudomonas* spp. 細菌プロテアーゼにより切断され得る切断部位を含む。製品はまた、プロテアーゼを含むか、または含むと疑われる乳製品の部分精製部分などの抽出物であってよい。

【0211】

本発明のセンサーは、*Pseudomonas* spp. を含むバイオフィルムを検出または推定するために使用することもできる。例えば、本発明のセンサーは、牛乳加工プラント及び機器の一部の手が届かないか、または届きにくい場所に存在し得る *Pseudomonas* spp. を含むバイオフィルムを検出または推定するために使用することができる。別の例では、本発明のセンサーは、食品及び／または飲料加工プラント及び機器の一部の手が届かないか、または届きにくい場所のバイオフィルムを検出または推定するために使用することもできる。さらなる例では、本発明のセンサーは、医療機器及びデバイスにおけるバイオフィルムを検出または推定するために使用することもできる。機器などを分解することなく、*Pseudomonas* spp. を含むバイオフィルムを検出または推定する能力は、所定の「所定位置の清掃」及び「所定位置以外の清掃」手順のスケジューリング及び評価に役立つであろう。

【0212】

本発明のセンサーは、*Pseudomonas* spp. 感染を検出するために使用することもできる。少なくとも1回の重篤なカテーテル感染の発生が、*Pseudomonas fluorescens*に関連している。他のシュードモナスは、重要な日和見病原体である。感染を検出するためのこれらのセンサーの使用は、臨床状況における感染管理及び処置を助けることができる。

【0213】

当業者が知っているように、本発明のセンサーは、多重化することもできる。この系では、異なるプロテアーゼにより切断されている2つ以上の異なるセンサー分子が提供される。例えば、本発明のセンサーは、ウシプラスミンにより切断されるセンサーと多重化することができる（例えば、PCT/AU2013/000378を参照のこと）。一部の実施形態では、それぞれ異なるセンサー分子は、異なる標的化合物の検出及び定量化を可能にするために異なる波長で放出するように、異なるドナー及び／またはアクセプター分子を含み得る。一部の実施形態では、それぞれ異なるセンサー分子は、同じドナー及び／またはアクセプター分子であってよい。一部の実施形態では、単一の流体検出チャンバが使用される。一部の実施形態では、マルチチャンネル検出デバイスが使用されてもよい。

【0214】

「試料」は、*Pseudomonas* spp. 及び／または *Pseudomonas* spp. プロテアーゼを含有する可能性を有する任意の物質または組成物とし得る。通常は、試料は、細菌及び／またはプロテアーゼを含むことが知られているか、または含むと疑われる任意の物質である。試料の例としては、液体、生物学的材料、及び装置が挙げられる。一部の実施形態では、試料は、乳製品またはその抽出物、土壌またはその抽出物、臨床試料またはその抽出物、医療機器の試料（例えば、綿棒、リンスなど）、機械の試料（例えば、綿棒、リンスなど）、食品加工機器の試料（例えば、綿棒、リンスなど）、植物材料またはその抽出物などからなる群より選択される。一部の実施形態では、臨床試料としては、血液、血清、痰、粘液、膿、腹腔液、及び他の体液が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、食品加工機器としては、輸送用タンカー、保管タンク、加工機械、ライン、管、コネクタ、バルブなどが挙げられるが、これらに限定されない。試料は、機械から取り出されてもよい（例えば、綿棒、リンスなど）。機械は、細菌及び／またはプロテアーゼを保有することが疑われるか、または保有することが知られている任意の機械、例えば、乳製品の製造、貯蔵、及び加工に参与する任意の機械を含む。一部の実施形態では、機械としては、緩衝剤及び保管サイロ、溶接継手、バッファタンク出口、コンベヤーベルト、限外濾過膜、バルブ、空気分離器、タンカートラック、タンカートラック貯蔵タンク、貯蔵タンク、バルブ、ガスカート、接続パイプなどが挙げられ

るが、これらに限定されない。試料は、医療機器から取り出されてもよく、例えば、試料は、限定されないが、カテーテル、静脈内ライン、人工呼吸器、創傷被覆材、コンタクトレンズ、透析機器、医療デバイスなどを含む医療機器の綿棒またはリンスであってよい。

【0215】

乳製品は、未殺菌乳、低脂肪乳、無脂肪乳、低温殺菌乳、UHT乳、ラクトース修飾UHT乳、強化UHT乳、フレーバーUHT乳、及びこれらの製品の組み合わせ、ならびにUHT特殊調製粉乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バターミルク、クリーム、粉乳、乳児用調製粉乳、及びバターなどとし得るが、これらに限定されない。試料は、環境または供給源から直接入手しても、本発明の方法が実施される前に好適な手順により抽出及び／または少なくとも部分的に精製されてもよい。

10

【0216】

一部の実施形態では、試料は、水性液体である。例えば、試料は、乳汁、フルーツジュース、他の飲料、及び血清を含む体液を含むがこれらに限定されない。

【0217】

本発明の方法は、検出可能な変化を測定するのに適する任意のシステムで実施することができる。

【0218】

当業者が理解するように、本発明の方法は、バッチ（例えば、プレートリーダーを使用するバッチフォーマット）またはフローフォーマットで実施することができる。例えば、本発明の方法は、適切なフィルタを備えたマイクロプレートリーダーを使用したマイクロプレートフォーマットで実施することができる。本発明の方法は、PCT/AU2013/000378に記載されているようなマイクロ流体デバイスで実施することもできる。

20

【0219】

前述の方法とは対照的に、本発明は、乳汁中、且つピコモルレベルで、*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを測定する直接的な選択的アッセイに使用することができる。例えば、一部の実施形態では、少なくとも1 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも5 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも10 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも20 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも30 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも40 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも50 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも60 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも70 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも80 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも90 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも100 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。一部の実施形態では、少なくとも150 pMの*Pseudomonas* spp. プロテアーゼを検出することができる。

30

40

【0220】

乳汁中の細菌プロテアーゼを検出する、以前に報告された方法は、非常に長いインキュベーション時間（最大14日以上）を必要とする（Button et al.、2011）。対照的に、本発明の方法は、3時間未満、2時間、1時間未満、30分未満、または15分未満で実施することができる。一部の実施形態では、本発明の方法は、2時間未満で実施することができる。一部の実施形態では、本発明の方法は、1時間未満で実施することができる。一部の実施形態では、本発明の方法は、30分未満で実施することがで

50

きる。好ましくは、本発明の方法は、15分未満で、所望の感度を得ることができる。

【0221】

本出願の方法及びセンサーは、ウシプラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの感度が高い可能性がある。実施形態では、本発明は、ウシプラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの選択性が、少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または5倍～1,000倍、または5倍～100倍、または5倍～50倍、または5倍～20倍、及び／または一部の場
合では、最大100～1,000倍高い。

【0222】

試料調製

プラスミン、そのチモーゲンプラスミノーゲン、及び細菌プロテアーゼなどのプロテアーゼは、乳製品中でカゼインミセル及び乳脂肪球と結合し得る。これは、これらの試料中に存在するプロテアーゼの量を測定することを困難にし得る。理論に拘束されることを望むものではないが、これらのプロテアーゼに対する天然基質であるカゼインは、プロテアーゼアッセイに使用される基質に対する競合的阻害剤として作用し得ると考えられる。乳製品中のプロテアーゼの量を測定する種々の方法が記載されている（例えば、プラスミンの場合、Saint-Denis et al. (2001) 及びRauh et al. (2014) を参照のこと）。これらのアッセイにより測定されたプロテアーゼの量は、試料がアッセイのために調製されている仕方に応じて変動し得る。カゼインミセルからプロテアーゼを解離させ、プロテアーゼアッセイのための試料を調製するために使用することができる改良された方法が必要とされている。

【0223】

本発明者らは、カゼインミセルからプロテアーゼを解離させるための改良された方法を見出している。一態様では、本発明は、カゼインミセルからプロテアーゼを解離させる方法を提供し、方法は、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物を、カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物の存在下で超音波処理することを含む。一部の実施形態では、カゼインミセルからプロテアーゼを解離させる方法が提供され、方法は、カゼインミセルと結合しているプロテアーゼを含む組成物を、カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物及びカルシウムキレート剤の存在下で超音波処理することを含む。改良された方法は、遊離プロテアーゼの量を増加させ、上記のプロテアーゼセンサー分子を使用するようなプロテアーゼアッセイのための試料を調製するために使用することができる。本明細書で使用される場合、「遊離プロテアーゼ」という用語は、カゼインミセルから解離されているプロテアーゼを指す。

【0224】

一部の実施形態では、組成物は、乳製品の試料である。組成物は、乳製品の部分的に精製された部分などの抽出物でもあり得る。

【0225】

カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物は、当業者に既知の任意の好適な化合物とし得る。一部の実施形態では、化合物は、リシンの誘導体またはアナログである。リシンの好適な誘導体またはアナログとしては、アミノカプロン酸、トランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸、トランス-4-アミノエチルシクロヘキサンカルボン酸、及びそれらのエステルが挙げられるが、これらに限定されない。アミノカプロン酸は、 ϵ -アミノカプロン酸、 ϵ -Ahx、または6-アミノヘキサン酸としても知られている。アミノカプロン酸及びそのエステルの例としては、アミノカプロン酸、ヘキシル ϵ -アミノカプロン酸などのアルキルエステル、及びベンジル ϵ -アミノカプロン酸などのアラルキルエステルが挙げられる。トランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸及びそのエステルの例としては、トランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸、ベンジルトランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸などのアラルキルエステル、ならびにフェニルトランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボキシラート及び4-(2-カルボキシエチル)フェニルトランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボキシラートなどのアリアルエステルが挙げられる。本発明に使用されるトランス-4-

アミノエチルシクロヘキサンカルボン酸及びそのエステル为例としては、トランス-4-アミノ-エチルシクロヘキサンカルボン酸、ベンジルトランス-アミノエチルシクロヘキサンカルボキシラートなどのアラルキルエステル、ならびにフェニルトランス-アミノエチルシクロヘキサンカルボキシラート及び4-(2-カルボキシエチル)フェニルトランス-アミノエチルシクロヘキサンカルボキシラートなどのアリールエステルが挙げられる。好ましい実施形態では、リシンの誘導体またはアナログは、 ϵ -アミノカプロン酸(EACAとも呼ばれる)である。

【0226】

カゼインに結合しているプロテアーゼと競合する化合物は、遊離プロテアーゼの量を増加させるのに十分な量で存在する。一部の実施形態では、組成物は、約0.1 mM~約20 mMの化合物、約0.3 mM~約10 mMの化合物、約0.5 mM~約5 mMの化合物、約0.6 mM~約4 mM、または0.7 mM~約2 mMの化合物を含む。例えば、組成物は、約0.7 mM、約0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約1.1 mM、約1.2 mM、約1.3 mM、約1.4 mM、約1.5 mM、約1.6 mM、約1.7 mM、約1.8 mM、約1.9 mM、または約2.0 mMの化合物を含有し得る。好ましい実施形態では、組成物は、0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約1.1 mM、または約1.2 mMの化合物を含む。より好ましい実施形態では、組成物は、約1 mMの化合物を含む。

【0227】

組成物は、カルシウムキレート剤を含み得る。当業者に既知の任意の好適なカルシウムキレート剤を使用することができる。理論に拘束されることを望むものではないが、カルシウムキレート剤は、遊離カルシウムイオン及びコロイド状リン酸カルシウムの量を減少させて、カゼインミセルの少なくとも部分的な解離をもたらすと考えられる。一部の実施形態では、カルシウムキレート剤は、クエン酸イオン、リン酸イオン、ピロリン酸イオン、ポリリン酸イオン、及びポリカルボキシラート、ならびにその塩からなる群より選択される。一部の実施形態では、カルシウムキレート剤は、ヘキサメタリン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、フィチン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、及びエチレングリコールビス(β -アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-四酢酸からなる群より選択される。カルシウムキレート剤の濃度は、キレート化されるべき金属イオンの予測量及び/または使用されるカルシウムキレート剤の種類に応じて変動し得る。一部の実施形態では、カルシウムキレート剤の濃度は、約0.01 M~約0.5 M、または約0.05 M~約0.4 M、または約0.05 M~約0.1 Mである。一部の実施形態では、カルシウムキレート剤は、クエン酸イオンまたはその塩である。一部の実施形態では、カルシウムキレート剤は、クエン酸三ナトリウムである。一部の実施形態では、クエン酸三ナトリウムの濃度は、約0.01 M~約0.5 M、または約0.05 M~約0.4 M、または約0.05 M~約0.1 Mである。

【0228】

一部の実施形態では、組成物のpHは、使用されるカルシウムキレート剤に基づいて、当業者が選択することができる。pHは、キレート剤の安定性及び有効性に影響を及ぼし得る。一部の実施形態では、組成物のpHは、6.0を超える。一部の実施形態では、pHは、7.0を超える。一部の実施形態では、pHは、約8.0~約10.0、約8.3~9.5、約8.5~約9.3、約8.7~約9.1、約8.8~約9.0、または約8.9である。pHを維持するために、緩衝剤を組成物に添加することができる。任意の好適な緩衝液を使用することができる。

【0229】

組成物は、許容される担体及び/または添加剤も含み得る。一般に、好適な許容される担体及び/または添加剤は、当該技術分野で既知であり、最終用途に基づいて選択される。例えば、一部の実施形態では、組成物は、塩化ナトリウムを含む。一部の実施形態では、塩化ナトリウムの濃度は、約0.01 M~約0.3 M、または約0.025 M~約0.25 M、または約0.04 M~約0.1 M、または約0.05 Mである。一部の実施形態では、塩化ナトリウムの濃度は、0.05 Mの塩化ナトリウムである。

【0230】

好ましい実施形態では、プロテアーゼは、少なくとも部分的に乳汁腐敗を引き起こす。一部の実施形態では、プロテアーゼは、比較的熱安定性である。一部の実施形態ではプロテアーゼは、プラスミンまたはそのチモーゲン、プラスミノーゲンである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、プラスミンである。一部の実施形態では、方法は、当業者に既知の方法を使用してプラスミノーゲンをプラスミンに変換することをさらに含む。一部の実施形態では、プロテアーゼは、細菌プロテアーゼである。一部の実施形態では、細菌プロテアーゼは、*Pseudomonas* spp. により産生される。一部の実施形態では、*Pseudomonas* spp. は、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas fragi*、*Pseudomonas ludensis*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas* LBSA1、または *Pseudomonas aureofaciens* である。一部の実施形態では、プロテアーゼは、細菌性細胞外プロテアーゼである。一部の実施形態では、細菌性細胞外プロテアーゼは、アルカリ金属のメタロプロテアーゼである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、セラリシンファミリーのプロテアーゼに属する。一部の実施形態では、プロテアーゼは、AprXプロテアーゼである。一部の実施形態では、プロテアーゼは、*P. fluorescens* n° 114 (NCBI GenPept ID BAA28268) のAprXと少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する。

10

【0231】

20

本方法の利点の1つは、当該技術分野に記載の他の方法よりも、実施が速いことである。例えば、Rauh et al. (2014) に記載の方法は、15分のインキュベーションを2回必要とする。最初のインキュベーションは、カゼインミセルを解離させると考えられる。第2のインキュベーションは、カゼインからプロテアーゼを解離させると考えられる。本発明者らは、本明細書に記載の方法が試料調製に必要な時間を低減することを見出している。一部の実施形態では、超音波処理は、15分間以下、10分間以下、5分間以下、または2分間以下実施される。好ましくは、超音波処理は、5分間以下実施される。より好ましくは、超音波処理は、2分間以下で実施される。本明細書で使用される場合、「以下」は、少なくとも1秒間の超音波処理を必要とする。

【0232】

30

一部の実施形態では、超音波処理は、連続的である。代替の実施形態では、超音波処理は、パルス化される。

【0233】

当業者に既知の任意の好適な超音波処理装置またはホモジナイザーが使用されてもよい。好適な超音波処理装置またはホモジナイザーとしては、Honda Electronics Sonac-200コントローラー、改良型Honda ZO41超音波カッター、Heilscher Gdmini2などのインライン超音波マイクロリアクター、Misonix超音波処理装置3000、またはQ55超音波処理装置が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、超音波処理器は、Sono TekのSonic Syringe (商標) システムなどの音波注射器を用いて実施されてもよい。

40

【0234】

好ましくは、超音波処理装置は、10 mL以下、5 mL以下、2.5 mL以下、1.25 mL以下、または0.1 mL以下の試料体積を超音波処理するために使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理装置は、約2.5 mLの試料体積を超音波処理するために使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理装置は、約1.25 mLの試料体積を超音波処理するために使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理装置は、約0.1 mLの試料体積を超音波処理するために使用することができる。

【0235】

一部の実施形態では、超音波処理装置は、20 mm以下、15 mm以下、11 mm以下、9 mm以下、7 mm以下、5 mm以下、4 mm以下、3 mm以下、または2 mm以下の

50

プローブの先端直径を有する。一部の実施形態では、超音波処理装置は、好適な4mmのプローブ先端直径を備えたマイクロ超音波処理装置（例えば、Honda Electronics ZO41またはZO-40W超音波カッター）を用いて実施されてもよい。さらに別の実施形態では、超音波処理装置は、11mmのプローブ先端直径を備えたHeilscher Gdmini2（またはこの機器の低出力バージョン）などのインライン超音波マイクロリアクターである。

【0236】

任意の好適な超音波処理デバイスの変位振幅を使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理は、約15 μm ～300 μm 、または約40 μm ～300 μm 、または約120 μm ～300 μm の超音波処理デバイスの変位振幅で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約15 μm ～300 μm 、または約15 μm ～120 μm 、約15 μm ～25 μm の超音波処理デバイスの変位振幅で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約40 μm の超音波処理デバイスの変位振幅で実施される。

【0237】

任意の好適な周波数を使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理は、約10kHz～約60kHzの周波数、例えば、約10kHz、約20kHz、約30kHz、約40kHz、約50kHz、または約60kHzで実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約15kHz～約30kHzの周波数で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約28kHz～約40kHzの周波数で実施される。

【0238】

任意の好適な電力消費量を使用することができる。一部の実施形態では、超音波処理は、約55ワット未満、約50ワット未満、約45ワット未満、約40ワット未満、約35ワット未満、約30ワット未満、約25ワット未満、約20ワット未満、または約15ワット未満の消費電力で実施される。好ましい実施形態では、超音波処理は、約25ワット未満の電力で実施される。

【0239】

一部の実施形態では、超音波処理は、約0.05mL～約10mL、0.08mL～2mL、または0.1mL～約2.5mLの試料体積で実施される。例えば、超音波処理は、約0.1mL、約0.2mL、約0.3mL、約0.4mL、約0.5mL、約0.6mL、約0.7mL、約0.8mL、約0.9mL、約1.0mL、約1.1mL、約1.2mL、約1.3mL、約1.4mL、約1.5mL、約1.6mL、約1.7mL、約1.8mL、約1.9mL、約2.0mL、約2.1mL、約2.2mL、約2.3mL、約2.4mL、または約2.5mLの試料体積で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約0.1mLの試料体積で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約1.25mLの試料体積で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約2.5mLの試料体積で実施される。

【0240】

当業者には理解されるように、超音波処理パラメータ（上述のものを含む）は、試料体積、超音波処理装置、超音波処理装置プローブ、先端深さ、試料容器などに応じて変動し得る。当業者は、超音波処理後に、約12,000 $\times g$ で2分間の遠心分離で乳汁が別の層を形成しないように、乳汁を均質化するのに必要な超音波処理パラメータを選択することができるであろう（図2）。好ましくは、超音波処理後に、12,000 $\times g$ で2分間の遠心分離で乳汁が別の層を形成しないように、乳汁を均質化するのに必要な最短時間で低出力超音波処理を提供する超音波処理パラメータが選択される。

【0241】

例えば、一部の実施形態では、超音波処理装置は、11mmのプローブ先端直径を有するHonda Electronics Sonac-200コントローラーであり、試料体積は、2.5mL（0.5mLの添加EACA緩衝液を含む2mLの未殺菌乳）であり、試料は、内径23mmのガラスバイアル中にあり、超音波処理は、以下のパラメータ：周波数=28kHz、振幅=17～21 μm 、及び消費電力：25Wで約2分間実施さ

れる。

【0242】

他の実施形態では、超音波処理装置は、4 mmのプロブ先端直径を有するように改良されたH o n d a Z O 4 1超音波カッターであり、試料体積は、2.5 mL (2 mLの未殺菌乳及び0.5 mLの添加E A C A緩衝液)であり、試料は、内径23 mmのガラスバイアル中にあり、超音波処理は、以下のパラメータ：周波数=40 kHz、振幅=16~19 μm、及び消費電力：5~8 Wで約2~6分間実施される。

【0243】

さらに他の実施形態では、超音波処理装置は、4 mmのプロブ先端直径を有するように改良されたH o n d a Z O 4 1超音波カッターであり、試料体積は、約1.25 mL (1 mLの未殺菌乳及び0.25 mLの添加E A C A緩衝液を含む)であり、試料は、内径約10 mmの1.5~2 mLのプラスチックエッペンドルフチューブ中にあり、超音波処理は、以下のパラメータ：周波数=40 kHz、振幅=16~19 μm、消費電力：5~8 Wで約1~6分間実施される。

【0244】

別の実施形態では、超音波処理装置は、4 mmのプロブ先端直径を有するように改良されたH o n d a Z O 4 1超音波カッターであり、試料体積は、約0.150 mL (0.120 mLの未殺菌乳及び0.030 mLのE A C A緩衝液を含む)であり、試料は、内径6 mmの96ウェルプレートの0.3 mLウェル中にあり、超音波処理は、以下のパラメータ：周波数=35 kHz、振幅=10 μm、及び音響パワーレベル0.25 Wで約1~2分間実施される。

【0245】

当業者に理解されるように、超音波処理は、プロテアーゼの変性及び／または不活化を引き起こさない温度で実施される。一部の実施形態では、超音波処理は、約50℃未満、好ましくは、40℃未満、最も好ましくは、30℃未満の温度で実施される。例えば、試料は、超音波処理中に氷上または氷浴中でインキュベートされてもよい。超音波処理する場合、試料は、(例えば、冷凍または他の好適な技術により)10℃以下に、10℃以下、または4℃以下に維持されてもよい。

【0246】

上述したように、カゼインミセルからプロテアーゼを解離する方法は、プロテアーゼアッセイのための試料を調製するために使用することができる。この方法は、プロテアーゼアッセイ用の乳製品の試料を調製するために、且つ乳製品中のプロテアーゼの濃度を決定するために使用することもできる。従って、別の態様では、乳製品中のプロテアーゼの濃度を決定する方法が提供され、方法は、

(i) 本明細書に記載の方法を使用して、乳製品の試料を処理すること。

(i i) 加工された乳製品中のプロテアーゼ活性を測定すること、及び

(i i i) プロテアーゼ活性に基づいて乳製品のプロテアーゼ濃度を決定すること、を含む。一部の実施形態では、乳製品の試料はまた、乳製品の部分的に精製された部分などの抽出物とし得る。一部の実施形態では、未殺菌乳、低脂肪乳、無脂肪乳、低温殺菌乳、U H T乳、ラクトース変性U H T乳、強化U H T乳、フレーバーU H T乳、U H T特殊調製粉乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バターミルク、クリーム、粉乳、乳児用調製粉乳、及びバター、ならびにそれらの組み合わせ、及び／またはカゼインに結合しているプロテアーゼを含むそれらのうちの1つ以上の抽出物からなる群より選択される乳製品。

【0247】

一部の実施形態では、ステップ(i i)は、少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位を有する標的配列及び任意に検出可能な標識を含むセンサー分子と、加工乳製品を混合すること(プロテアーゼによる標的配列の切断が検出可能な変化を生じる)、ならびに、検出可能な変化を測定することを含む。

【0248】

一部の実施形態では、センサー分子は、本発明のセンサー分子である。一部の実施形態

では、センサー分子は、本明細書に記載の *Pseudomonas* spp. プロテアーゼセンサー分子である。一部の実施形態では、センサー分子は、配列番号 105、106、及び 107 から選択されるポリペプチド配列を有する。一部の実施形態では、センサー分子は、PCT/AU2013/000378 に規定のセンサー分子である。一部の実施形態では、センサー分子は、ポリペプチド配列、配列番号 109 を有する。一部の実施形態では、センサーは、プラスミンにより切断される（例えば、PCT/AU2013/000378 を参照のこと）。一部の実施形態では、センサーは、細菌プロテアーゼ、例えば、本明細書で定義されるような *Pseudomonas* spp. プロテアーゼにより切断される。

【0249】

一部の実施形態では、センサー分子は、検出可能な標識を含み、検出可能な標識は、化学発光ドナードメイン及び標的配列に共有結合しているアクセプタードメインを含む。一部の実施形態では、アクセプタードメインは、本明細書に規定の通りである。一部の実施形態では、化学発光ドナードメインは、本明細書に規定の通りである。

【0250】

センサー分子は、少なくとも 1 つのプロテアーゼ切断部位を有する標的配列を含む。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、NQ、NT、EI、QQ、及び KZ（Z は、Q、N、K、Y、V、または E である）、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、NQ、NT、EI、及び KZ（Z は、Q、N、K、Y、V、または E である）、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、SF、FM、NQ、NT、EI、KK、KQ、及び KN、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。一部の実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、KK、KY、KV、及び KE、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0251】

一部の実施形態では、標的配列は、プラスミン切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、アミノ酸配列 KZ を含み、Z は、K、Y、V、または E である。一部の実施形態では、標的配列は、アミノ酸配列 LQXXXXXXXXXKZKLQ（配列番号 110）を含み、Z は、K、Y、V、または E であり、X は、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、標的配列は、LQGSKKYKVKESLQ（配列番号 111）を含む。

【0252】

一部の実施形態では、標的配列は、細菌プロテアーゼ切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、*Pseudomonas* spp. 切断部位を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 1～94 を含む。

【実施例】

【0253】

以下の実施例は、本発明による好ましいセンサー及び方法について記載している。しかし、これは、これらの実施例は、実例として提供され、その中には、本発明の全体的な範囲に限定されるものとして解釈されるべきものはないと理解されるべきである。

【0254】

実施例 1

センサーの構築

BRET²-プラスミンセンサー及び BRET²-細菌プロテアーゼ Pfl u センサー 1、2、及び 3 をコードする DNA 構築物を、GenScript（USA）で合成した。センサーは、化学発光ドナーとしての Rluc2、及びアクセプターとしての緑色蛍光タンパク質（GFP²）の多様体を含んでいた。EcoRI 及び XhoI 制限部位を使用して、pRSET ベクター（BioLabs、オーストラリア）に構築物をクローニングして、プロテアーゼセンサーをコードする pRSET-Pfl u ベクターを作製した。プロテアーゼセンサーをコードするポリヌクレオチド配列を、配列番号 102～104 に示す。プロテアーゼセンサーのポリペプチド配列を、配列番号 105～107 に示す。プラ

10

20

30

40

50

スミンセンサーをコードするポリヌクレオチド配列を、配列番号108に示す。プラスミンセンサーのポリペプチド配列を、配列番号109に示す。

【0255】

Escherichia coli 株BL21 (DE3) (Novagen)の細胞を、プロテアーゼセンサーをコードするpRSET-Pflubacterで形質転換した。*E. coli* 株BL21 (DE3) (Novagen)で、センサーを発現させた。37℃、200rpmで、100μg/mLのアmpiシリン及び2%のグルコースを含有するLB (10gのトリプトン、5gの酵母エキス、5gのNaCl (pH7.4))中で、単一コロニーから一晚培養物を成長させた。0.1のOD600まで、100μg/mLのアmpiシリンを含有するLBを250mL接種すること、及び、37℃ (200rpm)で4.5時間インキュベートし、続いて、22℃ (200rpm)で一晩インキュベートすることにより、発現を誘導した。接種の24時間後に、細胞を採取した。

10

【0256】

4335×g (4℃)で15分間の遠心分離により細胞を採取し、平衡緩衝液 (57.7mMのNa₂HPO₄、42.3mMのNaH₂PO₄、300mMのNaCl、pH7.0)中に再懸濁させた。約21,000psiの圧力で、ホモジナイザー (Microfluidics M-100P (Newton、米国マサチューセッツ州))に、細胞懸濁液を通過させ、15,000×g (4℃)で15分間の遠心分離により可溶性タンパク質画分を単離した。製造者の使用説明書に従って、コバルトアフィニティークロマトグラフィー (TALON (登録商標) Superflow Metal Affinity Resin (Takara Clontech、オーストラリア))を使用して、タンパク質を精製した。150mMのイミダゾールで精製タンパク質を溶出した後、セルロース透析膜 (12,000分子量カットオフ (Sigma))を使用して、プラスミン切断緩衝液 (50mMのTris (pH8)、10mMのNaCl、及び25mMのリシン)に対し、試料を透析した。ドライアイス上で、精製タンパク質の500μLのアリコートのスナップ凍結し、-80℃で保存した。

20

【0257】

実施例2

材料及び方法

粗細菌プロテアーゼ

30

Oxoid寒天プレート上に、*Pseudomonas fluorescens* (株65)の分離株をプレーティングし、28℃で2日間インキュベートした。プレートからの3つのコロニーを、滅菌栄養ブロス (NB) 100mLに接種し、28℃で48時間インキュベートした。10mLの培養物を、6000×gで10分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを滅菌等張生理食塩水 (0.85%w/v) 1mLに再懸濁し、脱脂UHT乳 (COLES オーストラリア脱脂乳、99%脂肪不含) 99mLに添加した。培養物を、150rpmで円形撹拌しながら、4℃で8日間インキュベートした。0.85%w/vの生理食塩水1mLを脱脂UHT乳99mLに添加すること、及び同一条件下で8日間インキュベートすることにより、対照培養物を調製した。この後、培養物を、4℃、3,000×gで10分間遠心分離した。上清を収集し、0.22μmフィルタで濾過滅菌し、粗プロテアーゼの供給源として使用した。これを、1mLのアリコートに等分し、-80℃で保存した。

40

【0258】

*P. fluorescens*を接種した脱脂乳から調製された粗抽出物のSDS-PAGE (図3)分析により、乳汁中の多数の異なる*P. fluorescens*株により産生される亜鉛依存性メタロプロテアーゼのクラス (AprXプロテアーゼ)を特徴付ける50kDaの分子量と一致する46~58kDaの主要バンドの存在が実証された (Dacres et al., 2014; Button et al., 2011)。SDS-PAGEゲル上の染色されたバンドの濃度分析により、*P. fluorescens*株65により分泌されたプロテアーゼの濃度を0.34μMと推定した。

50

【0259】

プロテアーゼアッセイ

最終体積100 μ Lを含む96ウェルプレート中で、プロテアーゼアッセイを実施した。切断緩衝液（50 mMのトリス-HCl、50 mMのNaCl、25 mMのリシン、pH 8）中の、または50 μ Lの全脂肪または脱脂UHT乳（Colles）が追加された様々な量の粗細菌プロテアーゼまたはプラスミン（ヒトもしくはウシ、Sigma）と共に、精製プラスミンセンサー（10 nM）を、28 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。1 pM～10 nMのプロテアーゼ濃度をアッセイすることにより、校正グラフを生成した。10分間インキュベーションした後に、BRET²シグナルを測定した。BRET²測定では、10分間のインキュベーション期間の後に、5 μ LのClz400a基質（100 μ M）を加えた。

10

【0260】

RLuc2/Clz400a放出フィルタ（410 nm、バンドパス80 nm）及びGFP²放出フィルタ（515 nm、バンドパス30 nm）を含む、BRET²放出フィルタセットを使用したPOLARstar OPTIMAマイクロプレートリーダー（BMG LabTech、オーストラリア）を用いて、同時二重放出BRET測定を実施した。0.5秒の積分時間を使用した。

【0261】

データ分析

マイクロプレート分光計を使用して、500 nm及び470 nmで測定された生物発光放出の比としてBRET比を計算した。GFP²強度（平均0～5秒）をRLuc2強度（平均0～5秒）で除することにより、BRET比を計算した。Windows（登録商標）用のGraphpad Prism 7の正規化関数を使用して、BRET比を正規化して、Log [プロテアーゼ] 値に対してプロットし、Log [アゴニスト] 対正規化応答-可変勾配モデルに適合させた。

20

【0262】

結果

ウシプラスミン及びヒトプラスミン（図4）または細菌プロテアーゼに対する全脂肪UHT乳中のプラスミンセンサーの検量線を作成した。プラスミンセンサーは、ヒトプラスミンの場合に5.6 nMのEC₅₀、ウシプラスミンの場合に108 nMのEC₅₀を有していた（表3）。ヒトプラスミン、ウシプラスミン、及び細菌プロテアーゼへのプラスミンセンサーの応答を比較する予備研究（図5）は、細菌プロテアーゼの場合のEC₅₀が全脂肪UHT乳中で約50 nMであることを推測する。

30

【0263】

これに加えて、未殺菌乳中の細菌プロテアーゼ（図6）を用いて、プラスミンセンサーを校正した。プラスミンセンサーは、未殺菌乳中の細菌プロテアーゼの場合、1.4 nMのEC₅₀を有していた（表3）。

【0264】

実施例3

本出願のセンサーは、乳製品などの試料中のPseudomonas spp. プロテアーゼを検出するために使用することができる。実施例1に記載されるように、Pfl uセンサー1、2、及び3を調製した。実施例2に記載されるように、粗細菌プロテアーゼを調製した。10 nMの精製センサーを使用した実施例2に記載されるように、プロテアーゼアッセイを実施した。

40

【0265】

結果

細菌プロテアーゼ、ウシプラスミン、及び／またはヒトプラスミンへの全脂肪UHT乳中のPfl uセンサー1、2、及び3の検量線を作成した。図7（Pfl uセンサー1）、図8（Pfl uセンサー1）、図9（Pfl uセンサー2）、及び図10（Pfl uセンサー3）に検量線を示す。

50

【0266】

P f l u センサー 1 は、細菌プロテアーゼの場合、0.7 nM の EC_{50} 、ウシプラスミンの場合、169 nM、ヒトプラスミンの場合、124 nM の EC_{50} を有していた（表3）。それ故、P f l u センサー 1 は、ヒトプラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの感度が約174倍高く、ウシプラスミンよりも細菌プロテアーゼへの感度が238倍高い。プラスミンを使用して生成された検量線から計算された EC_{50} を、細菌プロテアーゼを使用して生成された検量線から計算された EC_{50} で除することにより、センサーの感度を決定する。

【0267】

P f l u センサー 2 は、細菌プロテアーゼ画分の場合、2.6 nM の EC_{50} 、ヒトプラスミンの場合、926 nM の EC_{50} を有していた（表3）。ウシプラスミンを試験しなかった。それ故、P f l u センサー 2 は、ヒトプラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの感度が約353倍高い。

【0268】

P f l u センサー 3 は、細菌プロテアーゼの場合、2.3 nM の EC_{50} 、ヒトプラスミンの場合、1280 nM の EC_{50} を有していた（表3）。ウシプラスミンを試験しなかった。それ故、P f l u センサー 3 は、プラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの感度が約563倍高い。

【0269】

結言

センサーの標的配列を変えることにより、0.1～90 nM の細菌プロテアーゼの線形範囲の組み合わせを与える細菌プロテアーゼへの細菌プロテアーゼセンサーの感度は、32～537 nM の範囲のウシプラスミンレベル及び0.7～3680 nM の範囲のヒトプラスミンレベルを測定し得る。プラスミンの濃度は、比色測定を使用した未殺菌乳中の1～5 nM の濃度範囲で（Benslimane et al., 2009）、ELISA アッセイを使用して0.6～22 nM の範囲で（Dupont et al., 1997）測定されている。本発明によるセンサーは、細菌プロテアーゼにより切断され、細菌プロテアーゼへの選択性があり、乳汁中のプラスミンの生理学的レベルに対して大部分または比較的感度が鈍いことを、これらのデータが実証する。

【0270】

実施例 4

材料及び方法

未殺菌乳試料

オーストラリアの乳製品加工業者から、6つの未殺菌乳試料を入手した。これらの試料を得た雌ウシは、貯蔵寿命が長い生乳を一貫して生産することができる高品質の生産者であると認識されていたことを、加工業者は示していた。

【0271】

Rauh et al. (2014) の前処理プロトコル。

未殺菌乳試料を12分間超音波処理した（Misonix 超音波処理装置3000；試料バルサーオン、0.5秒；バルサーオフ、2.5秒；パワー5.5）。未殺菌乳試料を超音波処理して、均質な分散液を作製する。超音波処理後、Rauh et al. (2014) に記載の前処理方法を使用して、乳汁試料を前処理した。要約すると、0.4 M のクエン酸三ナトリウム緩衝液（pH 8.9）250 μ L と、超音波処理した未殺菌乳1 mL を混合し、振盪しながら室温で15分間インキュベートして、カゼインミセルを解離させた。8 mM の ϵ -アミノカプロン酸（EACA）及び0.4 M の NaCl を含有する0.1 M のトリス緩衝液（pH 8）と、クエン酸処理乳を混合（1：1）し、振盪しながら室温でさらに15分間インキュベートした。

【0272】

表3. 粗プロテアーゼを含む50%の全脂肪乳で計算された EC_{50} 及び線形範囲。10%～90%のBRET² 応答の範囲として定義された線形範囲。細菌プロテアーゼセンサ

ー P f l u 1、P f l u 2、P f l u 3、P f l u - H 3、及びプラスミンセンサーに対する選択率（細菌プロテアーゼ：プラスミン）。N. D. =測定なし、* は、未殺菌乳試料中で計算された値を示し、¹ は、株 1 1 7 由来の細菌プロテアーゼへの応答を示し、他の全ての応答は、株 6 5 由来の細菌プロテアーゼに対するものである。

【表 3】

標的配列	センサー	ヒトプラスミン		ウシプラスミン		細菌プロテアーゼ		ヒトプラスミンと比較した細菌プロテアーゼへの選択性 (倍)	ウシプラスミンと比較した細菌プロテアーゼへの選択性 (倍)
		EC ₅₀ (nM)	線形範囲 (nM)	EC ₅₀ (nM)	線形範囲 (nM)	EC ₅₀ (nM)	線形範囲 (nM)		
LQGSKKYKV KEGSLQ (配列番号 110)	プラスミン	5.6	0.7~43	108	32~367	約 50 1.4*	10~90 0.2~9*	0.1	2
LQGSFMKKN QNTIEIGSFE (配列番号 72)	P f l u 1	124	10~1401	169	53~537	0.7 0.14* 0.2* ¹	0.1~4 0.01~ 1.25* 0.02* ¹ ~ 3.16* ¹	174	238
LQGSFMNQN TEIGSFE (配列番号 73)	P f l u 2	926	233~3680	n. d.	n. d.	2.6	0.6~12	353	N. D.
LQGSLSFMA IPGSFE (配列番号 74)	P f l u 3	1280	452~3622	n. d.	n. d.	2.3	0.5~11	563	N. D.
LQGSKKQKQK QKQGSFE (配列番号 112)	P f l u -H3	n. d.	n. d.	174*	28~1079*	0.5* 6.8*	0.03~ 6.8*	N. D.*	376*

10

20

30

40

50

【0273】

BRET² プラスミンセンサーを使用した検量線

検量線を作成するために、前処理された乳汁試料のアリコートに30秒間90℃に加熱して、任意の内因性プラスミンを不活化した。10μLのプラスミン溶液を50μLの加熱した乳汁試料に添加することにより、加熱した前処理した試料にヒトプラスミン (Sigma) を混ぜた。添加されたプラスミンの最終濃度は、0.001~500nMに及んでいた。5μLのBRET² プラスミンセンサー (10nM) 及び30μLのプラスミン切断緩衝液を混ぜた試料に加え、試料を、ピペティングすることによりよく混合した。試料を、28℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後に、5μLのClz400a基質 (100μM) をウェルに添加し、BRET比を上記のように記録した。

10

【0274】

BRET² プラスミンセンサーを使用した内因性プラスミン濃度の測定

未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を決定するために、50μLの前処理された未殺菌乳試料をマイクロプレートウェル中で5μLのBRET² プラスミンセンサー (10nM) 及び40μLのプラスミン切断緩衝液と混合した。混合物を、28℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、5μLのClz400a基質 (100μM) をウェルに添加し、BRET比を記録した。検量線から計算した濃度に2.5の希釈係数を掛けた。

【0275】

比色基質を使用した検証

20

比色基質としてD-Val-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩 (V0882, Sigma Aldrich) を使用したRauhet al. の方法 (2014) を使用して、BRET² プラスミンセンサーに基づく測定を検証した。

【0276】

5mgの基質に、0.1MのトリスHCl (pH8.0) 1.81mLを添加することにより、D-Val-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩の5mMのストック溶液を調製した。

【0277】

プラスミン切断緩衝液中のヒトプラスミン5μl及び比色基質45μLと、前処理された未殺菌乳50μLを混合して、37℃で2時間インキュベートすることにより、検量線を生成した。添加されたプラスミンの最終濃度は、0~15nMに及んでいた。プレートリーダー (Spectra Max M2, Molecular Devices, 米国) を使用して、吸光度を、2分毎に405及び490nmで測定した。490nmでの吸光度を、405nmでの吸光度から差し引き、時間に対してプロットした。20~120分の吸光度の変化率 (410nm~490nm) を、各添加プラスミン濃度について計算した。

30

【0278】

市販のアッセイを使用して、内因性プラスミンの濃度を決定した。5μLのプラスミン切断緩衝液 (10nM) 及び比色基質45μLと、前処理された未殺菌乳50μLを混合し、37℃で2時間インキュベートした。プレートリーダー (Spectra Max M2, Molecular Devices, 米国) を使用して、吸光度を、2分毎に405及び490nmで測定した。490nmでの吸光度を、405nmでの吸光度から差し引き、時間に対してプロットした。20~120分の吸光度の変化率 (410nm~490nm) を、各試料について計算した。検量線から計算された濃度に2.5の希釈係数を掛けた。

40

【0279】

結果

BRET² プラスミンセンサー

前処理ステップなしで未殺菌乳中のプラスミン濃度を決定する最初の試みは成功しなかった。

50

【0280】

Rauh et al. (2014) の前処理プロトコル後に調製され、ヒトプラスミンを混ぜた試料について BRET² プラスミンセンサーの検量線を作成した (図 11)。EC₅₀ は、19.48 nM である。前処理された未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、2.1 nM ~ 4.4 nM の範囲であり (表 4)、内因性プラスミン濃度は、試料の 3 つにおいて検出可能でなかった。

【0281】

比色基質

Rauh et al. (2014) の前処理プロトコル後に、ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料の場合の、比色基質 D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩の検量線を作成した (図 12)。元の Rauh 前処理プロトコル後の未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、2.1 nM ~ 2.9 nM の範囲であった (表 4)。

【0282】

実施例 5

材料及び方法

2 ステップ前処理プロトコル

クエン酸三ナトリウム緩衝液に EACA 及び NaCl を添加して、2 回の 15 分間のインキュベーションのステップを組み合わせることにより、実施例 4 に記載の前処理プロトコルを修正した。要約すると、5 mM の EACA 及び 0.25 M の NaCl を含有するクエン酸三ナトリウム緩衝液 (pH 8.9) 250 µL と、1 mL の超音波処理未殺菌乳を混合した。次に、試料を室温で 15 分間インキュベートした。

表 4. Rauh et al. (2014) の前処理プロトコル後の未殺菌乳試料中の遊離の内因性プラスミンの測定。BRET² プラスミンセンサーを使用する場合、前処理された試料を 10 分間、または発色基質 (D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩) と共に 120 分間インキュベートした。ND = 検出不能

【表 4】

試料 ID	[遊離内因性プラスミン] (nM)	
	BRET ² プラスミンセンサー (nM)	比色基質
1	ND	2.3
2	ND	2.6
3	ND	2.7
4	2.1	2.6
5	2.4	2.1
6	4.4	2.9

【0283】

検量線

BRET² プラスミンセンサー及び比色基質についての検量線を、実施例 4 に記載のように決定した。

【0284】

内因性プラスミン濃度の決定

実施例 4 に記載されるように、未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を決定した。実施例 4 に記載されているように、比色基質、D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩を使用して、未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を検証した。

【0285】

結果

BRET² プラスミンセンサー

ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料を使用して、2ステップ前処理プロトコール後に、BRET² プラスミンセンサーの検量線を作成した。EC₅₀は、16.04 nMである（図13）。未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、5.8 nM～9.0 nMの範囲であった（表5）。

【0286】

比色基質

2ステップ前処理プロトコールにより処理し、ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料を使用して比色基質の検量線を作成した（図14）。2ステップ前処理プロトコール後の未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、9.7 nM～10.9 nMの範囲であった（表5）。

表5：BRET² プラスミンセンサー及び比色基質、D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩を使用した2ステップ前処理後の未殺菌乳試料中の遊離内因性プラスミンの測定（平均±SD、n=3）。BRET² プラスミンセンサーを使用する場合、前処理された試料を10分間、または発色基質（D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩）と共に120分間インキュベートした。

【表5】

試料ID	[遊離内因性プラスミン] (nM)	
	BRET ² プラスミンセンサー (nM)	比色基質
1	6.8±1.4	9.7±1.1
2	5.8±1.5	10.0±0.8
3	8.2±1.1	10.9±2.4
4	6.4±1.7	10.4±0.6
5	8.5±0.7	9.7±0
6	9.0±1.1	10.4±0.6

【0287】

実施例6

材料及び方法

1ステップ前処理プロトコール

遊離プラスミンの放出を促進するために超音波処理及びインキュベーションステップを組み合わせることにより、実施例5に記載の前処理プロトコールを修正した。要約すると、未殺菌乳1 mLに、0.4 Mのクエン酸三ナトリウム緩衝液（5 mMのEACA及び0.25 MのNaCl）を含有するpH8.9）250 μLを混ぜ、試料を12分間超音波処理した（Misonix超音波処理装置3000；試料パルサーオン、0.5秒；パルサーオフ、2.5秒、パワー5.5）。

【0288】

検量線

BRET² プラスミンセンサー及び比色基質についての検量線を、実施例4に記載のように決定した。

【0289】

内因性プラスミン濃度の決定

実施例4に記載されるように、未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を決定した。実施例4に記載されているように、比色基質、D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩を使用して、未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を検証した。

【0290】

結果

BRET² プラスミンセンサー

1ステップ前処理プロトコール後に、ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料の場合の、BRET² プラスミンセンサーの検量線を作成した。検量線を図15に示す。EC₅₀は、24.2 nMであり、線形応答が1.6 nM (90%) ~ 128 nM (10%) のプラスミンで観察される。

【0291】

未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、20.9 nM ~ 23.1 nMの範囲であった(表6)。乳汁試料中で測定された最低プラスミン濃度は、18.2 nMであり、77.1%のBRET² 応答であり、最高は、25.7 nMであり、66.7%のBRET² 応答であり、双方のウェルは、アッセイの直線範囲内であった。

10

【0292】

比色基質

1ステップ前処理プロトコール後に、ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料の場合の、比色基質、D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩の検量線を作成した。検量線を図16に示す。

【0293】

比色アッセイのEC₅₀は、11.06 nMであり、5.70 nM (10%) ~ 13.70 nM (90%) の線形応答であった。これは、BRET² プラスミンセンサーのキャリブレーション結果で観察されるよりもはるかに狭い範囲である。

【0294】

未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、17.2 nM ~ 18.0 nMの範囲であった(表6)。

20

表6: BRET² プラスミンセンサー及び比色基質、D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩(平均±SD、n=3)を使用した1ステップ前処理後の未殺菌乳試料中の遊離内因性プラスミンの測定。BRET² プラスミンセンサーを使用する場合、前処理された試料を10分間、または発色基質(D-Val-Leu-Lys-4-ニトロアニリド二塩酸塩)と共に120分間インキュベートした。

【表6】

30

試料ID	[遊離内因性プラスミン] (nM)	
	BRET ² プラスミンセンサー	比色基質
1	20.9 ± 3.7	17.2 ± 0.9
2	23.6 ± 0.7	17.2 ± 0.5
3	21.2 ± 1.7	18.0 ± 0.6
4	22.6 ± 3.2	17.6 ± 0.2
5	22.8 ± 2.0	17.2 ± 0.7
6	22.3 ± 1.6	17.6 ± 0.9

40

【0295】

実施例7

材料及び方法

低出力超音波処理を含む1ステップ前処理プロトコール

超音波処理装置(Misonix超音波処理装置3000)を、連続的に使用することができる低出力超音波処理装置(Q55超音波処理装置、Daintree Scientific)と交換することにより、実施例6に記載の前処理プロトコールをさらに修正した。要約すると、0.4 Mのクエン酸三ナトリウム緩衝液(pH 8.9、5 mMのEACA及び0.25 MのNaClを含有する)250 µLと、未殺菌乳1 mLを混合した。試料を氷上で2分間連続して超音波処理した(Q55超音波処理装置、振幅を40に設定

50

）。

【0296】

検量線

実施例4に記載されたように、検量線を決定した。

【0297】

内因性プラスミン濃度の決定

実施例4に記載されるように、未殺菌乳試料中に存在するプラスミンの量を決定した。

【0298】

結果

低出力超音波処理を含む1ステップ前処理プロトコル後に、ヒトプラスミンを混ぜた未殺菌乳試料の場合の、BRET²プラスミンセンサーの検量線を作成した。検量線を図17に示す。計算されたEC₅₀は、29.3 nMであり、応答は、5.5 nM (90%) ~ 107 nM (10%) で線形である。

【0299】

低出力超音波処理を含む1ステップ前処理後の未殺菌乳試料中で測定された内因性プラスミン濃度は、12.0 nM ~ 17.2 nMの範囲であり、BRET² 応答は、6つの試料について87.1% ~ 91.4%の範囲であった(表7)。

【0300】

考察

実施例4~7のデータは、前処理プロトコルへの超音波処理の組み込みが、アッセイの感度及び乳汁試料中で測定された遊離内因性プラスミンの量に大きな好ましい効果を有することを示す(表8)。例えば、1ステップ前処理プロトコルを使用すると、Rauhet al. (2014)の前処理方法と比較して、測定された遊離内因性プラスミンのレベルが5~10倍増加した。比色基質アッセイを使用して、これを検証した。BRETアッセイ及び比色アッセイの双方について、未殺菌乳中で測定された内因性遊離プラスミンレベルは、2ステップ前処理の代わりに1ステッププロトコルを使用した場合に2~3倍高かった。低出力超音波処理を組み込むと、同時に、元の方法の場合の50分のアッセイ時間から低出力超音波処理の前処理場合の12分のアッセイ時間に総アッセイ時間を低減しながら、Rauhet al. (2014)の前処理方法と比較して、未殺菌乳中で測定された内因性遊離プラスミンレベルが4~6倍増加した。データは、EACAの存在下で試料を超音波処理することが、カゼインからの内因性プラスミンの解離の効率を有意に増加させることを示している。

表7: BRET² プラスミンセンサーを備えた低出力超音波処理を含む1ステップ前処理後の未殺菌乳試料中の遊離内因性プラスミンの測定(平均±SD、n=3)。

【表7】

試料ID	[遊離内因性プラスミン] (nM)
1	12.0 ± 0.6
2	12.5 ± 1.9
3	17.3 ± 0.4
4	17.2 ± 2.3
5	16.8 ± 0.9
6	15.6 ± 1.5

表8. 元のRauh前処理プロトコル、2ステップ前処理、1ステップ前処理、及び低出力超音波処理(迅速な1ステップ)を含む1ステップ前処理後の6つの「高品質」未殺菌乳試料で測定された遊離の内因性プラスミン濃度範囲(nM)の比較。総アッセイ時間は、均質化時間(2ステップ及び1ステップの場合の12分ならびに迅速な1ステップの場合の2分間)、前処理インキュベーション時間、及び10分のインキュベーションアッ

セイ時間を含む。

【表 8】

	前処理プロトコル			
	Rauhet al. (2014)	二段階	一段階	迅速な一段階
測定されたプラスミン (nM)	2. 1~4. 4	5. 8~9. 0	20. 9~22. 6	12~17. 2
総アッセイ時間 (分)	50	32	22	12

10

【0301】

実施例 8

材料及び方法

未殺菌乳中の細菌プロテアーゼを測定するために、Pf1u1センサーを本明細書で使
用した。試料を4分間超音波処理したことを除いて、実施例7に記載されたように、前処
理された未殺菌乳試料を調製した。

【0302】

検量線

検量線を生成するために、前処理された未殺菌乳試料のアリコートをし、1時間55℃、
続いて、30秒間90℃に加熱して、任意の内因性細菌プロテアーゼ及び内因性プラスミ
ンを不活化した。50μLの加熱された乳汁試料に、10μLの細菌プロテアーゼを添加
することにより、加熱前処理された試料に、種々の量の粗製細菌プロテアーゼ画分を混ぜ
た（調製については実施例2を参照のこと）。添加された細菌プロテアーゼの最終濃度は
、1pM~10nMの範囲であった。5μLのBRET² Pf1u1センサー（10n
M）及び30μLのプラスミン切断緩衝液を、混ぜた試料に添加して、試料をピペッティ
ングにより十分に混合した。試料を、28℃で10分間インキュベートした。インキュベ
ーション後に、5μLのClz400a基質（100μM）をウェルに添加し、BRET
比を上記のように記録した。

20

【0303】

細菌プロテアーゼ濃度の決定

未殺菌乳試料中に存在する細菌プロテアーゼの量を決定するために、マイクロプレート
ウェル中の5μLのPf1u1センサー（10nM）及び40μLのプラスミン切断緩衝
液と、前処理未殺菌乳試料50μLを混合した。混合物を、28℃で2時間インキュベ
ートした。インキュベーション後、5μLのClz400a基質（100μM）をウェルに
添加し、BRET比を記録した。検量線から計算した濃度に2. 5の希釈係数を掛けた。

30

【0304】

結果

前処理及びPf1u1センサー後の未殺菌乳試料の検量線を作成した。検量線を図18
に示す。EC₅₀は、0. 4nMであり、応答は、48. 2pM（90%）~2. 6nM
（10%）の線形である。迅速な1ステップ前処理プロトコル後の未殺菌乳試料中で測
定された細菌プロテアーゼのレベルは、主に、CYBERTONGUE（登録商標）細菌
プロテアーゼセンサーの本発明者らの現在の生成の検出の限界以下のサブピコモル濃度で
存在していた（検出限界は現時点では、1pM以上と推定される）。未殺菌乳試料のうち
2つを除く全ては、検出可能な細菌プロテアーゼを含まなかった（図19）。内因性細菌
プロテアーゼを測定することができた試料では、濃度は、1. 4pM~3. 4pMの範囲
であった（図19）。

40

【0305】

実施例 9

材料及び方法

50

本明細書では、未殺菌乳試料の任意の前処理なしに、未殺菌乳中の細菌プロテアーゼを測定するために、P f l u l センサーを使用した。

【0306】

検量線

検量線を生成するために、前処理された未殺菌乳試料のアリコート、55℃に1時間加熱して、任意の内因性細菌プロテアーゼを不活化した。50μLの加熱された乳汁試料に、10μLの細菌プロテアーゼを添加することにより、加熱前処理された試料に、種々の量の粗製細菌プロテアーゼ画分を混ぜた（調製については実施例2を参照のこと）。添加された細菌プロテアーゼの最終濃度は、1pM～10nMの範囲であった。5μLのBRET² P f l u l センサー（10nM）及び30μLのプラスミン切断緩衝液を、混ぜた試料に添加して、試料をピペティングにより十分に混合した。試料を、前処理（低出力超音波処理を含む1ステップ前処理プロトコル）有り及びなしで、28℃で10分間または2時間インキュベートした。インキュベーション後に、5μLのClz400a基質（100μM）をウェルに添加し、BRET比を上記のように記録した。

【0307】

結果

細菌プロテアーゼセンサーは、2時間のインキュベーション期間の後に（4分間の低出力超音波処理を含む1ステップ前処理プロトコルを使用して）前処理されている未殺菌乳中で検量された同じセンサーと比較して、細菌プロテアーゼを含むセンサーの10分間のインキュベーション後の未殺菌乳のいかなる前処理もなしに、細菌プロテアーゼへの類似の応答及び感度を有することが明らかである（図20～22、表9）。

【0308】

2時間のインキュベーション時間後に前処理なしで、細菌プロテアーゼの最低検出率（3.94pM）を達成した。これは、より長いインキュベーション時間が、より低い検出限界をもたらすことを実証する。インキュベーション時間をさらに増加させると、より低い濃度（pM未満）の細菌プロテアーゼの検出が可能になることが予測される。未殺菌乳中で細菌プロテアーゼへのプラスミンセンサーの応答と、結果を比較すると（図6及び表3）、P f l u l センサーは、未殺菌乳中でインキュベーション時間が10分間のプラスミンセンサーよりも、細菌プロテアーゼへの感度が10倍高い。

表9. 4分間の低出力超音波処理を含む1ステップ前処理プロトコルの有無にかかわらず、異なるインキュベーション時間のために粗プロテアーゼを混ぜた50%の未殺菌乳中で計算されたEC₅₀及び線形範囲。10%～90%のBRET² 応答の範囲として定義された線形範囲。

【表9】

	アッセイ条件			
	前処理なし		前処理	
	インキュベーション時間			
	10分	2時間	10分	2時間
線形範囲 (pM)	15.74～ 1256	3.94～ 290	48.2～ 2580	14.80～ 670
EC ₅₀ (pM)	140	33.9	353	100

【0309】

実施例10

P f l u l センサーが複数のP. f l u o r e s c e n s 株に応答することができるかどうかを決定するために、本発明者らは、P. f l u o r e s c e n s 株117由来の細菌プロテアーゼの粗抽出物を生成した。

【0310】

材料及び方法

実施例 2 に記載の方法を使用して、*P. fluorescens* 株 117 を接種した脱脂乳から粗抽出物を調製した。

【0311】

P. fluorescens (株 117) を接種した脱脂乳から調製された粗抽出物の SDS-PAGE (図 23) 分析により、株 65 (図 3) を含む、乳汁中の多数の異なる *P. fluorescens* 株により産生された亜鉛依存性メタロプロテアーゼのクラス (AprX プロテアーゼ) を特徴付ける 50 kDa の分子量と一致する 46 ~ 58 kDa の主要バンドの存在が実証された (Dacres et al., 2014; Buttone et al., 2011)。染色されたバンドの比色分析により、マーカー 46 kDa (カラータンパク質標準、Broad Range #P7712S Lot: 0021410、BioLabs) SDS-PAGE ゲルと比較した場合、*P. fluorescens* 株 117 により分泌されるプロテアーゼの濃度を 0.32 μ M であると推定した。

10

【0312】

P. fluorescens (株 117) 由来の細菌プロテアーゼの検出

切断緩衝液及び UHT 乳に、株 65 または 117 いずれかから産生された 1 nM の細菌プロテアーゼを混ぜ、応答を、いかなる細菌プロテアーゼも添加しない対照と比較した。実施例 2 に記載したように、粗細菌プロテアーゼを調製した。10 nM の精製センサーを使用して、実施例 2 に記載されるように、プロテアーゼアッセイを実施した。

20

【0313】

結果

P. fluorescens 株 65 及び 117 から産生された細菌プロテアーゼは、緩衝液中で 10 分のインキュベーション時間内に Pfl センサーを完全に切断して (図 24)、BRET 比の 95 % の減少をもたらした。1 nM の細菌プロテアーゼを混ぜた UHT 乳中で、アッセイを実施した場合、株 117 由来の細菌プロテアーゼにおける 71.2 % の低減と比較して、株 65 の細菌プロテアーゼにおける BRET 比の 80.6 % の低減があった。これにより、Pfl センサーが異なる *P. fluorescens* 株から産生された細菌プロテアーゼに応答することができることが実証される。

【0314】

実施例 11

Pfl 1 ~ 3 センサーシリーズは、 κ -カゼインに見られる切断部位及びポリペプチド配列を組み込む、中央の F-M 開裂部位を有するリンカー配列 (図 1) で隔てられている BRET 構成要素を含んでいた。全てのカゼインに見出される全ての切断部位に対する P4 ~ P4' 位に見出される最も主要なアミノ酸を組み込むように、プロテアーゼセンサーの第 2 のセットを設計した (Pfl-H1 ~ 4)。

30

【0315】

材料及び方法

新しい細菌プロテアーゼセンサーの構築

GenScript (米国) により、BRET² 細菌プロテアーゼ Pfl センサー H1、H2、H3、及び H4 をコードする DNA 構築物を合成した。センサーは、リンカーで隔てられている化学発光ドナーとしての Rluc2 及びアクセプターとしての緑色蛍光タンパク質 (GFP²) の多様体を含んでいた (表 10)。pRSET ベクター (BioLabs、オーストラリア) に構築物をクローニングして、プロテアーゼセンサーをコードする pRSET-Pfl-H ベクターを作製した。プロテアーゼセンサーをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 116 ~ 119 に示される。プロテアーゼセンサーのポリペプチド配列は、配列番号 120 ~ 123 に示される。実施例 1 に記載の方法を使用して、精製センサーを製造した。

40

【0316】

検量線及びプロテアーゼアッセイ

50

検量線の方法及び新規細菌プロテアーゼセンサー（P f l u－H 1～H 4）のプロテアーゼアッセイは、実施例 2 に記載されている。

表 1 0．H 1～H 4 センサーの B R E T 構成要素を隔てるリンカー配列。

【表 1 0】

細菌プロテアーゼ センサー	リンカー配列
P f l u－H 1	L Q G S P P L K Q P P P G S F E（配列番号 1 1 3）
P f l u－H 2	L Q G S P P L Q Q P Q P G S F E（配列番号 1 1 4）
P f l u－H 3	L Q G S K Q K Q K Q K Q G S F E（配列番号 1 1 2）
P f l u－H 4	L Q G G S G G S L K Q Q G G S G G S F E（配列番号 1 1 5）

10

【0 3 1 7】

結果

4 つ新しい細菌プロテアーゼセンサー（P f l u－H 1～H 4）全ては、緩衝液中の 1 n M の細菌プロテアーゼに対して有意に応答した（ $P = 0.05$ ）（図 2 6）。センサーの相対感度は、 $H 3 > H 4 > H 1 > H 2$ であり、応答は、それぞれ 8 9. 7 %、6 4. 5 %、4 9. 5 %、及び 3 1. 9 % であった。これにより、P f l u－H 3 センサーが、最も感度が高く、P f l u－H 4、P f l u－H 1、及び P f l u－H 2 センサーのそれぞれの応答と比較して、1 n M の細菌プロテアーゼへの応答が 3 9 %、8 2 %、及び 1 8 2 % 高いことが実証される。

20

【0 3 1 8】

乳汁中のプラスミンと比較した細菌プロテアーゼへの P f l u－H 1～H 4 センサーの選択性を評価するために、1 n M のプラスミンまたは細菌プロテアーゼのいずれかを混ぜた U H T 乳への P f l u－H 1～H 4 センサーの応答を比較した（図 2 7～3 0 及び表 1 1）。

表 1 1．U H T 乳中の P. f l u o r e s c e n s 株 6 5 由来の 1 n M の粗細菌プロテアーゼまたは 1 n M のウシプラスミンへの P f l u－H 1～H 4 センサーシリーズの B R E T² 応答（%）。細菌プロテアーゼ応答対プラスミン応答の比として、選択性を計算する。

30

【表 1 1】

センサー	プラスミン応答（%）	細菌プロテアーゼ応答（%）	選択性
P f l u－H 1	4. 9	6. 7	1. 3
P f l u－H 2	7. 9	6. 6	0. 8
P f l u－H 3	0. 9	3 6. 3	4 0. 3
P f l u－H 4	6. 3	1 7. 1	2. 7

40

【0 3 1 9】

P f l u－H 3 センサーは、プラスミンを超える細菌プロテアーゼを検出することに対して最も選択性があり、U H T 乳では 4 0 の選択率を示した。これの後に、プラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの選択性が 2. 7 倍高い P f l u－H 4 センサーが続いた。P f l u－H 1 は、プラスミンよりも細菌プロテアーゼへの選択性が 1. 3 倍高い。P f l u－H 2 は、細菌プロテアーゼへの選択性が最も低く、プラスミンへの選択性が高く、選択率は 0. 8 であった。

【0 3 2 0】

P f l u－H 3 は、乳汁中の細菌プロテアーゼを検出する選択性及び感度が最も高かつ

50

たので、未殺菌乳中でこのセンサーを使用して、さらなる分析を実施した。図31に示されるように、細菌プロテアーゼ（株65）及びウシプラスミンについて検量線をプロットした。Pf1u-H3センサーは、細菌プロテアーゼの場合の0.5 nMのEC₅₀及びウシプラスミンの場合の173.9 nMのEC₅₀を有していた（表3）。それ故、Pf1u-H3センサーは、未殺菌乳中でウシプラスミンよりも、細菌プロテアーゼへの感度が約376倍高い。

【0321】

実施例12

実施例2及び10では、デンシトメトリーを使用して、且つSDS-PAGEの細菌プロテアーゼバンドの相対密度を46 kDaバンドのマーカーバンドと比較して、細菌プロテアーゼ濃度を推定した（カラータンパク質標準、Broad Range #P7712S Lot:0021410、BioLaban）。本発明者らは、細菌プロテアーゼの相対密度を既知の濃度のBSAと比較することにより、細菌プロテアーゼ濃度を決定する異なるアプローチを調査した。

【0322】

材料及び方法

実施例2及び10に記載の方法を使用して、P. fluorescens株65及び117を接種した脱脂乳から粗抽出物を調製した。株65（65-1及び65-2）ならびに株117及び異なる濃度のBSAの2つの抽出物のSDS-PAGE分析を実施した（図32）。株65-1は、株65由来の細菌プロテアーゼを使用している本明細書中の全ての実施例に使用される抽出物である。株117は、実施例10に使用される抽出物である。Novex #LC5625 SeeBlue Pre-stained Standardは、使用された市販のマーカーであった。SDS-PAGEでのタンパク質のデンシトメトリー分析を、Image Quant TL (GE Healthcare) 及びBSA検量線から推定された細菌プロテアーゼ濃度を使用して実施した（図33）。線形回帰分析を当てはめることにより、GraphPad Prism（バージョン7）を使用して、検量線グラフをプロットした。

【0323】

結果

BSA校正グラフに最適な直線は、 $y = 107235 + 79.66x$ 、 $R^2 = .9679$ であると決定された（図32）。抽出物65-1、65-2、及び117のための細菌プロテアーゼ濃度はそれぞれ、それぞれ3.94、2.37、及び3.37 μ Mであると決定された。実施例2及び10において株65-1及び株117の同じバッチの濃度を決定するために使用された以前の方法により、それぞれ、0.34 μ M及び0.32 μ Mの濃度が推定された。濃度決定のための今日のアプローチを使用すると、細菌プロテアーゼの濃度が、株65（65-1）の場合11.6倍高く、株117の場合10.5倍高くなる。Pf1u1センサーの感度に対するこの効果の一例としては、補正率11.6を使用して、図7をプロットするために使用される全ての細菌プロテアーゼ濃度を補正し、結果として、表3に提示されているものよりも11.6高い8.2 nMのEC₅₀及び1.4~4.5 nMの線形範囲（図34及び表12）になる。細菌プロテアーゼ濃度に関する補正率を、細菌プロテアーゼ測定ために、表3に最初に提示された全ての値に適用した（表12）。

【0324】

細菌プロテアーゼ濃度を推定するための、このアプローチの使用は、ヒトまたはウシプラスミンと比較して、細菌プロテアーゼへの細菌プロテアーゼセンサーの選択性を低減させるという影響を有する。例えば、（ヒトプラスミンと比較した）細菌プロテアーゼへの最低の選択性は、174よりも低減した、Pf1u1センサーの場合の15であり、最高は、563の元の選択率と比較して、Pf1u3センサーの場合の48.5である。細菌プロテアーゼへのプラスミンセンサー応答に対し補正率を適用すると、細菌プロテアーゼと比較して、プラスミンを検出するプラスミンセンサーへの選択率が増加する（表12）

。

【0325】

UHT乳中の細菌プロテアーゼ濃度を測定するための標準としてBSAを使用して、異なる標的配列を有するセンサーは全て、初期の濃度決定方法を使用して、UHT乳中の0.1～90 nMの細菌プロテアーゼと比較して、1.5～1044 nMの組み合わせられた線形範囲を与える。未殺菌乳では、バクテリアプロテアーゼ測定のための組み合わせられた線形範囲は、2つの異なる濃度決定方法の場合の0.01～9 nM（表3）と比較して、0.2～110 nM（表12）の範囲である。

【0326】

未殺菌乳中の内因性細菌プロテアーゼレベルを決定するために、実施例8で使用されたBSA法により決定した細菌プロテアーゼ濃度の検量線を補正する場合、ここで測定された濃度は、（図19）を使用して、16.2 pM～39.4 pMの範囲である。

表12. 粗プロテアーゼを含む50%の全脂肪乳で計算されたEC₅₀及び線形範囲。10%～90%のBRETT² 応答の範囲として定義された線形範囲。細菌プロテアーゼセンサーPfl u1、Pfl u2、Pfl u3、Pfl u-H3、及びプラスミンセンサーに対する選択率（細菌プロテアーゼ：プラスミン）。BSA標準との比較により決定した細菌プロテアーゼ。N.D. = 測定なし、* は、未殺菌乳試料中で計算された値を示し、¹ は、株117由来の細菌プロテアーゼへの応答を示し、他の全ての応答は、株65由来の細菌プロテアーゼに対するものである。

10

【表 1 2】

標的配列	センサー	[ヒトプラスミン] (nM)		[ウシプラスミン] (nM)		[細菌プロテアーゼ] (nM)		ヒトプラスミンと比較した細菌プロテアーゼへの選択性 (倍)	ウシプラスミンと比較した細菌プロテアーゼへの選択性 (倍)
		EC ₅₀	線形範囲	EC ₅₀	線形範囲	EC ₅₀	線形範囲		
LQGSKKYKVK EGSLQ (配列番号110)	プラスミン	5. 6	0. 7 ~ 43	108	32 ~ 367	約580 16. 2*	116 ~ 1044 2. 4 ~ 110*	0. 01	0. 2
LQGSFMKKNQ NTEIGSFE (配列番号72)	P f l u 1	124	10 ~ 1401	169	53 ~ 537	8. 2 1. 63* 2. 6*1	1. 5 ~45 0. 2 ~ 14. 5* 0. 2 ~ 33. 2*1	15	20
LQGSFMNQNT EIGSFE (配列番号73)	P f l u 2	926	233 ~ 3680	n. d.	n. d.	30. 4	6. 7 ~ 13. 8	30	N. D.
LQGSLSFMAI PGSFE (配列番号74)	P f l u 3	1280	452 ~ 3622	n. d.	n. d.	26. 4	5. 5 ~ 125. 8	48. 5	N. D.
LQGSKQKQKQ KQGSFE (配列番号112)	P f l u -H3	n. d.	n. d.	174*	28 ~ 1079*	5. 4*	0. 4 ~ 78. 9*	N. D. *	32

【0327】

本開示の一般的な広い範囲から逸脱することなく、上述の実施形態に対して、多数の変形及び／または修正が行われ得ることが当業者に理解されるであろう。それ故、本実施形

10

20

30

40

50

態は、全ての点で、例示的であり限定的ではないと見なされるべきである。

【0328】

本出願は、2016年11月14日に出願されたAU2016904639及び2017年1月19日に出願されたAU2017900161からの優先権を主張し、その双方の内容全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0329】

本明細書で考察及び／または参照されている全ての刊行物は、全体が本明細書に組み込まれている。

【0330】

本明細書に含まれている文書、行為、材料、デバイス、物品などのあらゆる考察は、単に本発明の文脈を提供する目的のためのものである。これらの事項のいずれかまたはその全てが、本出願の各請求項の優先日より前に存在していたので、先行技術の基礎の一部を形成するか、または本発明に関連する分野における一般的な知識であったことを認めたものと解釈すべきではない。

【0331】

参考文献

- Bagshaw (2001) J. of Cell Science 114:459-460
- Benslimane et al. (2009) Journal of Dairy Research 57:423-435.
- Bryce et al. (2016) Sensors 16:1488.
- Button et al. (2011) Journal of Food Quality 34:229-235.
- Dacres et al. (2009) Biosensors and Bioelectronics 24:1164-1170.
- Dacres et al. (2014) Poster presentation. Biosensors 2014, May 27-30th 2014, Melbourne.
- Datta and Deeth (2001) Trans. Instit. Chem. Eng (Part C). 79:197-210
- Day et al. (2004) Luminescence 19:8-20.
- de Wet et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 2987:725-737.
- Dupont et al. (1997) Journal of Dairy Research 64:77-86.
- Dupont et al. (2007) Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55:6857-6862.
- Forster (1948) Ann. Physik. 2:55
- Forster (1960) Rad. Res. Suppl., 2:326,
- Greer and Szalay (2002) Luminescence 17:43-74.
- Guarise et al. (2006) PNAS, 103:3978-3982.
- Hastings (1996) Gene 173:5-11.
- Hushpalian et al. (2007) Biol. Chem. 388:373-380.
- Inouye and Shimomura (1997) Biochem Biophys Res Commun. 233:349-353.
- Kim and Kim (2012) Theranostics, 2:127-138.
- Loening et al. (2006) Protein Eng. Des. Sel. 19:391-400.

10

20

30

40

50

Loening et al. (2007) Nature Methods 4:641–643.

Lorenz et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 88:4438–4442.

Martins (2015) Brazilian Journal of Microbiology, <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120130859>.

Rauh et al. (2014) Int. Dairy J. 38:74–80.

Saint-Denis et al. (2001) J. Dairy Res. 68:437–449.

Sapsford et al. (2006) Angew. Chemie. Int. Ed. 45:4562–4588.

Tsien (1998) Ann. Rev. Biochem. 63:509–544.

Verhaegen et al. (2002) Anal. Chem. 74:4378–4385

Viviani (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59:1833–1850.

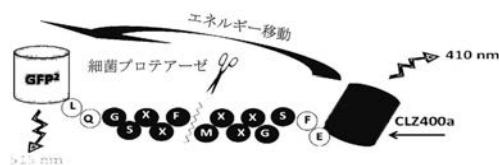
Wang et al. (1997) in Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons, eds. Hastings et al. (Wiley, New York), pp. 419–422.

Xu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:151–156.

Zhang and Lv (2014) J Food Sci Technol. 51:1185–119.

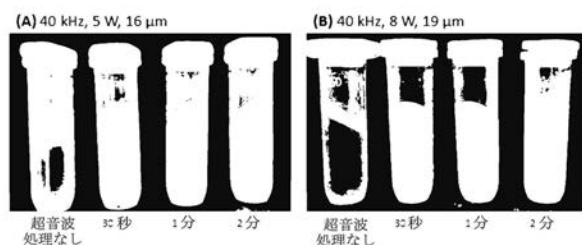
【図 1】

図 1



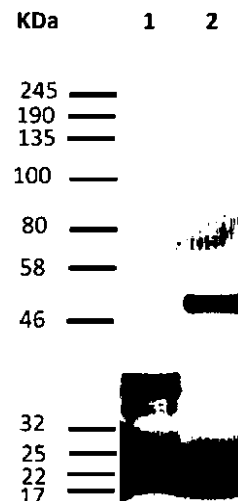
【図 2】

図 2



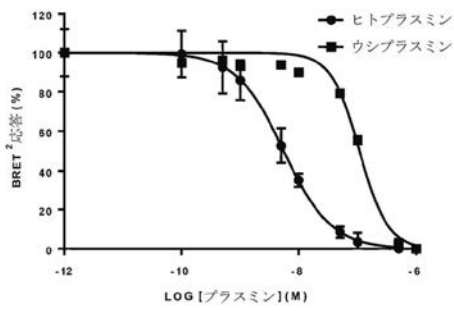
【図 3】

FIGURE 3



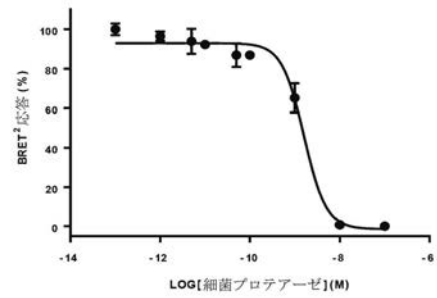
【図 4】

図 4



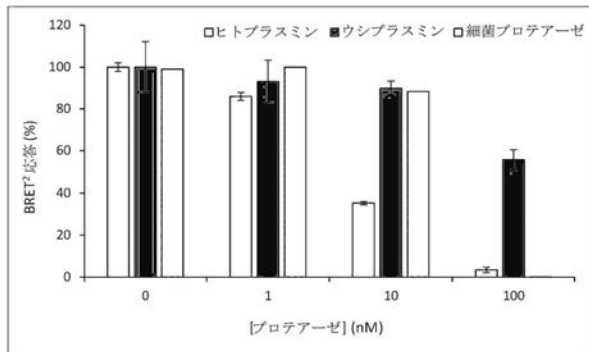
【図 6】

図 6



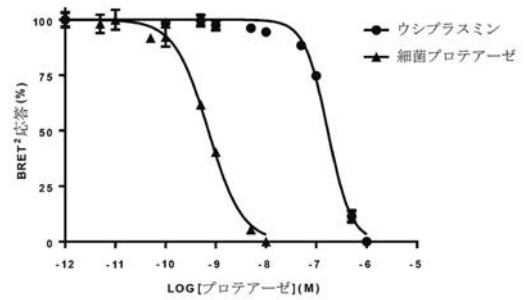
【図 5】

図 5



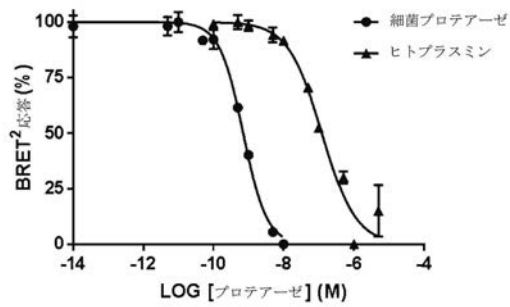
【図 7】

図 7



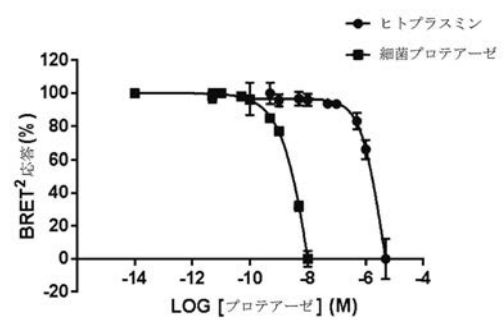
【図 8】

図 8



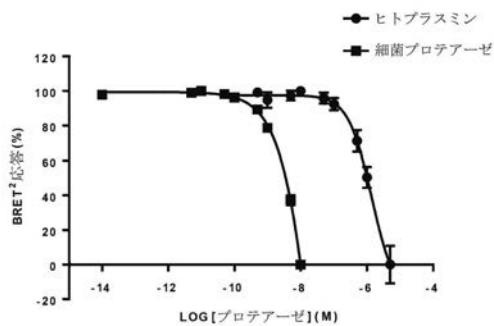
【図 10】

図 10



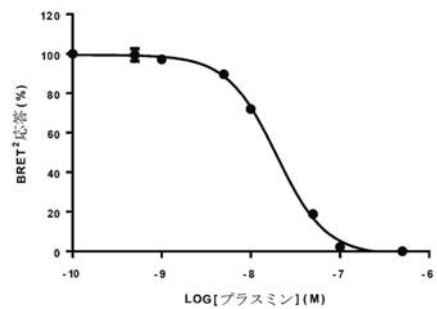
【図 9】

図 9



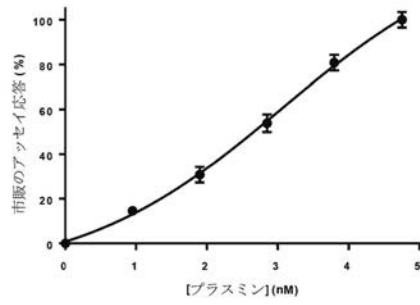
【図 11】

図 11



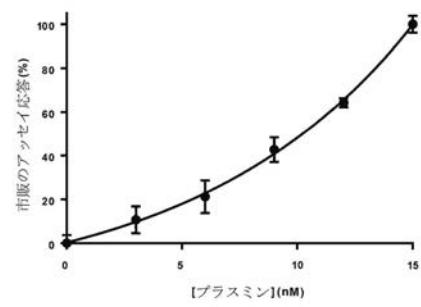
【図 1 2】

図 1 2



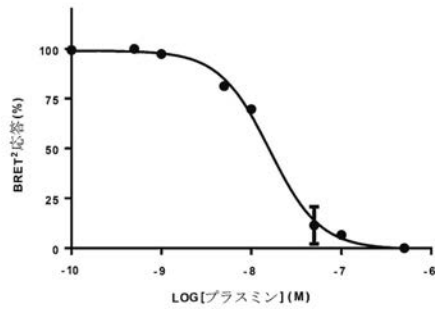
【図 1 4】

図 1 4



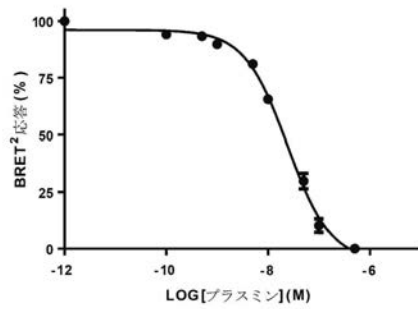
【図 1 3】

図 1 3



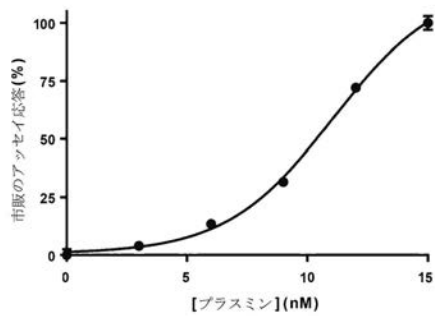
【図 1 5】

図 1 5



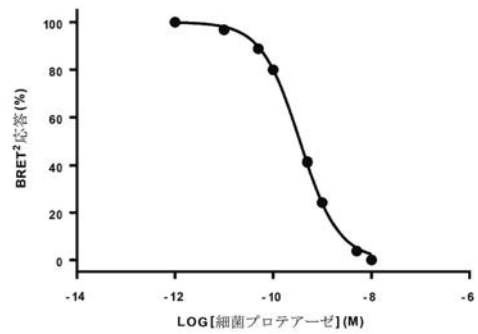
【図 1 6】

図 1 6



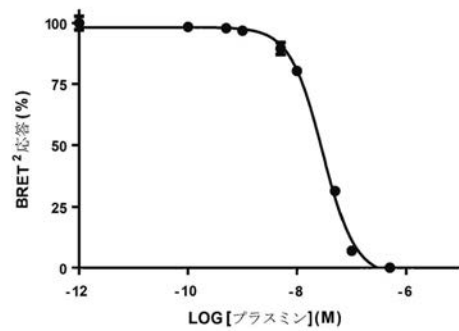
【図 1 8】

図 1 8



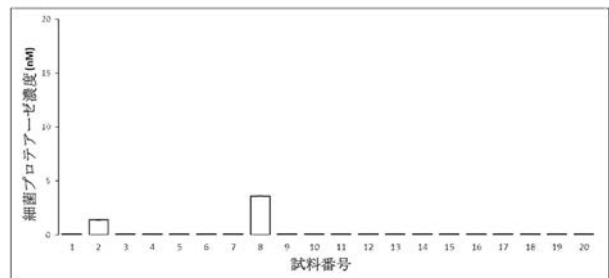
【図 1 7】

図 1 7



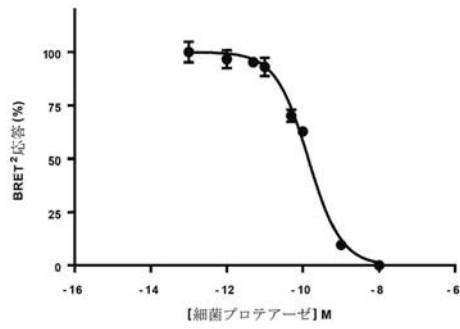
【図 1 9】

図 1 9



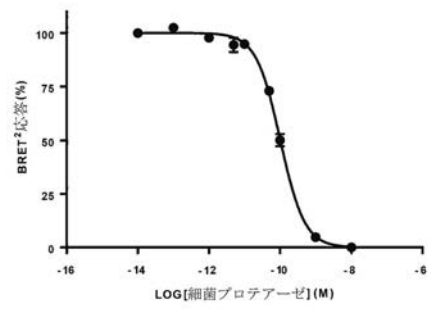
【図 2 0】

図 2 0



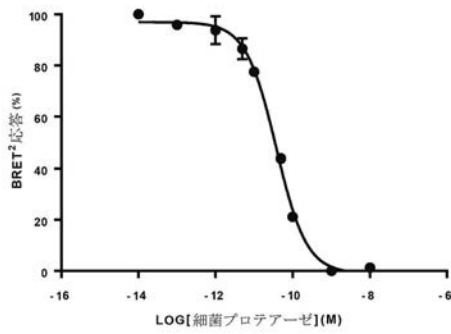
【図 2 2】

図 2 2



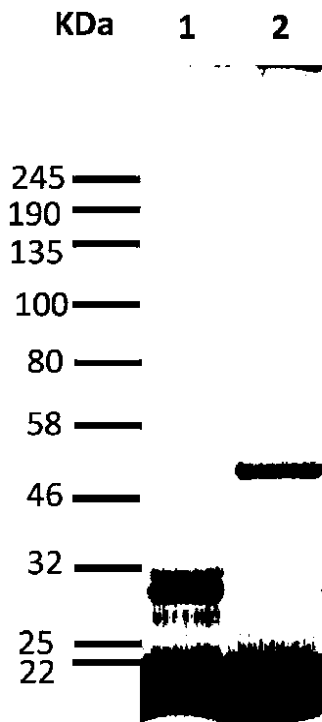
【図 2 1】

図 2 1



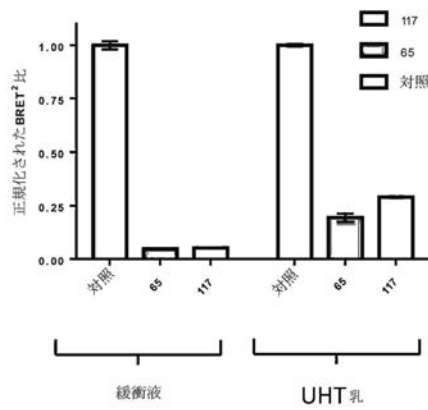
【図 2 3】

FIGURE 23



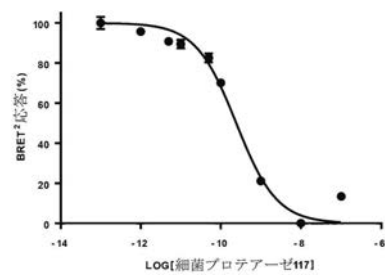
【図 2 4】

図 2 4



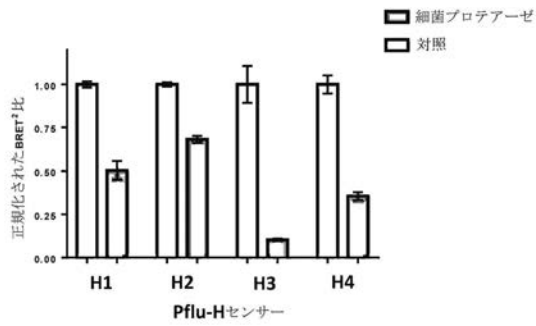
【図 2 5】

図 2 5



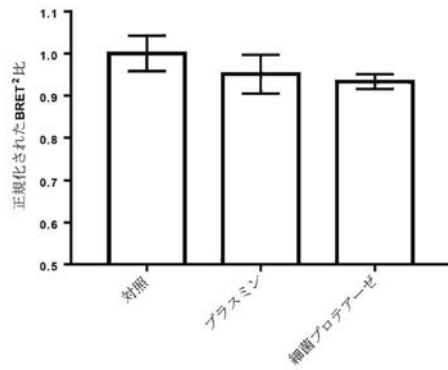
【図 26】

図 26



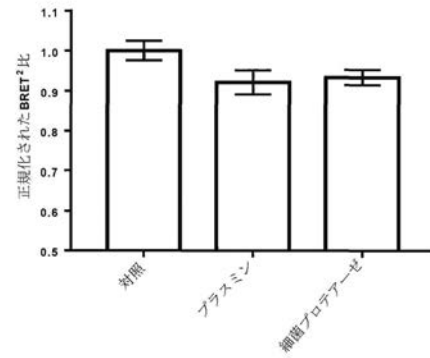
【図 27】

図 27



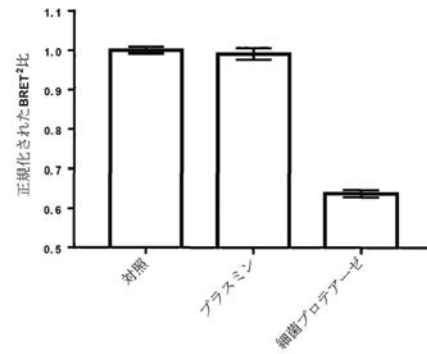
【図 28】

図 28



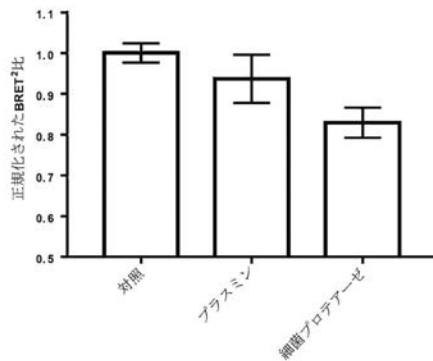
【図 29】

図 29



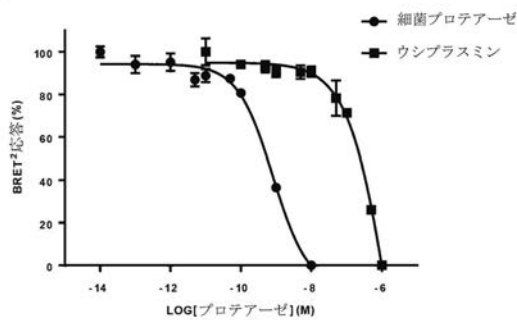
【図 30】

図 30



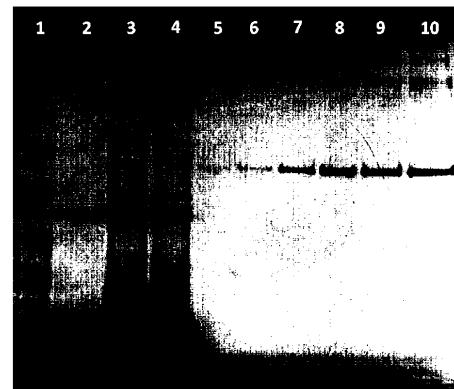
【図 31】

図 31



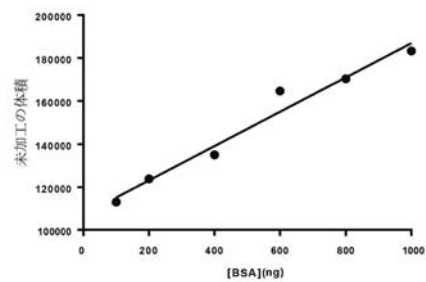
【図 32】

FIGURE 32



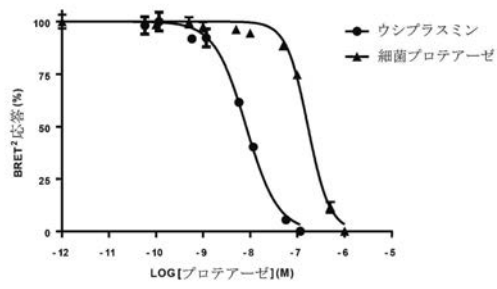
【図 33】

図 33



【図 3 4】

図 3 4



【配列表】

2020510406000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/051237						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/37 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PATENW, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, CABA, FSTA, INSPEC, Google & keywords: protease, sensor, biosensor, Pseudomonas, casein, milk, sonicate, ultrasound, protease inhibitor, plasmin, dissociate, label, cybertongue and like terms. GenomeQuest: SEQ ID NOs: 40, 45, 57, 70, 72, 73, 74, 112 Applicant(s)/Inventor(s) name searched in internal databases provided by IP Australia (Non-OPI and AusPat) and external databases Espacenet, Google								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Documents are listed in the continuation of Box C</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		Documents are listed in the continuation of Box C	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
	Documents are listed in the continuation of Box C							
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex								
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
Date of the actual completion of the international search 21 December 2017	Date of mailing of the international search report 21 December 2017							
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au	Authorised officer Jessie Williams AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832865							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2017/051237
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AU 2015243093 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 05 November 2015 example 10; page 3	
A	WO 2002/010433 A2 (EXPRESSIVE CONSTRUCTS, INC.) 07 February 2002 abstract; claim 1	
A	WO 2007/092909 A2 (EXPRESSIVE CONSTRUCTS, INC.) 16 August 2007 title; abstract; page 2 para 2; page 3 para 3; page 29; claims 20, 27; SEQ ID NOs: 2 and 3	
A	RAUH, V.M. et al., "The determination of plasmin and plasminogen-derived activity in turbid samples from various dairy products using an optimised spectrophotometric method", International Dairy Journal. 2014, vol. 38, pages 74-80 abstract; section 2.3; para spanning pages 80-81; table 8	
A	WILKINS, T.D. et al., "Isolation of recombinant proteins from milk", Journal of Cellular Biochemistry. 1992, vol. 49, pages 333-338 whole document	
A	ROLLEMA, H.S. et al., "On the determination, purification and characterization of the alkaline proteinase from bovine milk", Netherlands Milk and Dairy Journal . 1981, vol. 35, pages 396-399 introduction; section 2.3; figure 1	
A	CHANDRAPALA, J. et al., "The effect of ultrasound on casein micelle integrity", Journal of Dairy Science. 2012, vol. 95, pages 6882-6890 whole document	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2017/051237

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2017/051237
Supplemental Box	
Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into two distinct groups: • Group 1. Claims 1-19 (in full) and 24 (in part) are directed to a <i>Pseudomonas</i> spp. protease sensor molecule, and uses thereof. The features of: at least one protease cleavage site selected from the group consisting of KQ, SF, FM, KK, KN, NQ, NT, EI, QQ and combinations thereof; one or more of the features listed in parts i) to iii) of claim 1 which are directed to target sequence length, detectable labels or multiple cleavage sites; and production of a detectable change upon cleavage of the target sequence by a <i>Pseudomonas</i> spp. protease are specific to this group of claims. • Group 2. Claims 20-23 (in full) and 24 (in part) are directed to methods of dissociating a protease from a casein micelle. The feature of sonicating a composition comprising [any] protease associated with casein micelle in the presence of a compound which competes with the protease binding casein is specific to this group of claims. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a priori</i>. Please note that, despite this lack of unity, this opinion covers all of the claimed inventions. Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/051237	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
AU 2015243093 A1	05 November 2015	AU 2015243093 A1	05 Nov 2015
		AU 2015243093 B2	20 Apr 2017
		AU 2013204332 A1	31 Oct 2013
		AU 2013204332 B2	16 Jul 2015
		CA 2869914 A1	24 Oct 2013
		CN 104380085 A	25 Feb 2015
		EP 2839266 A1	25 Feb 2015
		HK 1207421 A1	29 Jan 2016
		JP 2015521274 A	27 Jul 2015
		KR 20150005619 A	14 Jan 2015
		NZ 630059 A	24 Feb 2017
		NZ 726003 A	26 May 2017
		SG 11201405952U A	30 Oct 2014
		US 2015094219 A1	02 Apr 2015
		WO 2013155553 A1	24 Oct 2013
WO 2002/010433 A2	07 February 2002	WO 0210433 A2	07 Feb 2002
		AU 9621101 A	13 Feb 2002
		AU 2001296211 B2	22 Sep 2005
		CA 2412071 A1	07 Feb 2002
		EP 1356081 A2	29 Oct 2003
		EP 1356081 B1	23 Aug 2006
		JP 2004504854 A	19 Feb 2004
		US 2005181465 A1	18 Aug 2005
		US 7244583 B2	17 Jul 2007
		US 2003096315 A1	22 May 2003
WO 2007/092909 A2	16 August 2007	WO 2007092909 A2	16 Aug 2007
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2017/051237	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F
G 0 1 N 33/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/04	
C 0 7 K 5/083 (2006.01)	C 0 7 K 5/083	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 5/103 (2006.01)	C 0 7 K 5/103	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	

(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

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100197169
弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 ヘレン ダクレス
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 3 0, ウェリビー, スニーデス ロード 6 7 1, シー／
シーエスアイアールオー フード イノベーション センター

(72)発明者 スティーブン チャールズ トロウウェル
オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 3, オックスリー, ファ
レリー クローズ 3

Fターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA04 DA02 EA01 EA02 EA06 EA13
2G045 AA40 CB30 DA36 FA13 FB07
4B050 FF02C LL03
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ06 QQ16 QQ36 QR48 QR66 QS12 QS36
QX02
4H045 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17