

(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2012-502265

(P2012-502265A)

(43) 公表日 平成24年1月26日 (2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 N	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00 Z N A C	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 B	
	GO 1 N 27/30 3 5 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2011-525580 (P2011-525580)	(71) 出願人	593005895
(86) (22) 出願日	平成21年9月4日 (2009.9.4)		コンセホ・スベリオール・デ・インベステ
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月2日 (2011.5.2)		ィガシオネス・シエンティフィカス
(86) 国際出願番号	PCT/ES2009/070368		CONSEJO SUPERIOR DE
(87) 国際公開番号	W02010/026275		INVESTIGACIONES C I
(87) 国際公開日	平成22年3月11日 (2010.3.11)		ENTIFICAS
(31) 優先権主張番号	P200802551		スペイン、エー28006マドリッド、カ
(32) 優先日	平成20年9月4日 (2008.9.4)		リエ・セラノ117番
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)	(71) 出願人	511058855
			ユニベルシダッド・アウトノマ・デ・バル
			セロナ
			スペイン、エー08193セルダニョラ・
			デル・バリェス (バルセロナ)、シン・ヌ
			メロ、カンブス・デ・ベリャテラ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗H I V抗体を検出するためのバイオセンサー

(57) 【要約】

本発明は、生体試料中の抗-H I V抗体を検出可能なバイオセンサーであって、遺伝子工学的に改変されたアロステリック酵素と微小電極ネットワークを備えたマトリックスとの併用に基づく前記バイオセンサーを提供する。前記バイオセンサーの利点の1つには、高感度検出、簡易検出および携帯性がある。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) . 少なくとも抗H I V抗体により認識されるペプチドの付加による、改変アロステリック酵素、
b) . 微小電極ネットワークのマトリックスを含む変換器、および
c) . 電気化学的シグナルの検出器
を含む、バイオセンサー。

【請求項 2】

アロステリック酵素がβ-ガラクトシダーゼである、請求項 1 記載のバイオセンサー。

【請求項 3】

ペプチドが、H I Vウイルスの膜貫通糖タンパク質 g p 4 1 のエピトープである、請求項 1 記載のバイオセンサー。

【請求項 4】

改変アロステリック酵素が、配列番号：1 または配列番号：2 を含むリストから選択される、請求項 1 記載のバイオセンサー。

【請求項 5】

生体試料中の抗H I V抗体を検出するための、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項記載のバイオセンサーの使用。

【請求項 6】

- a) . 生体試料を抽出する工程、
b) . 工程 a) の生体試料を、本発明にかかるバイオセンサーと接触させる工程、
c) . 工程 b) の生体試料とバイオセンサーに、アロステリック酵素の基質を添加する工程、および
d) . 工程 c) において発生した電気化学的シグナルを記録する工程
を含む、抗H I V抗体を検出する方法。

【請求項 7】

アロステリック酵素の基質が、ONPG、CPRG、FDG またはPAPG を含むリストから選択される、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

本発明にかかるバイオセンサーを含む、抗H I V抗体を検出するためのキット。

【請求項 9】

アロステリック酵素の基質をさらに含む、請求項 8 記載のキット。

【請求項 10】

基質が、ONPG、CPRG、FDG またはPAPG を含むリストから選択される、請求項 9 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料中の抗-H I V抗体を検出することができるバイオセンサーであって、遺伝子工学的に改変されたアロステリック酵素と微小電極ネットワークを備えたマトリックスとを併用することに基づく前記バイオセンサーを提供する。本バイオセンサーの利点の1つとして、高感度検出、簡易検出および携帯性がある。

【背景技術】

【0002】

感染症の正確な診断は、臨床医学分野および獣医学分野における最も重要な要素である。現在、既存の検査を改良するために甚大な努力が費やされており、それは、新しい検出方法の出現 (Kuiken et al., 2003. Curr. Opin. Biotechnol., 14: 641-646)、並びにより高い感度で、安全に、かつ効率的に感染の早期検出を確実にする新しい戦略の発見 (Iqbal et al., 2000. Biosens. Bioelectronics., 15: 549-578, Dominguez EA, 1993. J. Clin. Microbiol., 31: 2286-2290; Lennette EH and Smith, 1999. Laborato

10

20

30

40

50

ry Diagnosis of Viral Infections, Informa Health Care) を可能にしている。過去 20 年間で、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) は、最もよく研究されたウイルスの 1 つであり、また標的としてのウイルスまたはそれに対して産生された抗体の使用に依存した新しい直接的または間接的分析手法の開発によって主要標的であった (McDougal, 2001. AIDS Rev. 3: 183-193)。

【0003】

直接的な方法の場合、ウイルス成分 (例えば、核酸またはタンパク質) は、抗原 E L I S A (Schupbach et al., 2000. Int J. Antimicrob. Agents, 16: 441-445) またはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) (Marie Louie, 2000. CMAJ, 163: 301-309; Elnifro et al., 2000. Clin. Microbiol. Rev., 13: 559-570; Ballagi-Pordany, 1993. Vet. Res Commun., 17: 55-72; Niesters, 2004. Clinical Microbiology Infect., 10: 5-11; Hjelle and Busch, 1989. Arch Pathol. Lab Med 113: 975-980) によって、検出可能である。

【0004】

間接的な方法は抗ウイルス抗体の存在を実際に示すものであり、最も一般的なものとしては、抗体-E L I S A、ウェスタンブロット (Steckelberg and Cockerill, 1998. Mayo Clin. Proc., 63: 373-380)、または他の免疫アッセイ (Branson, 2007. Clin. Infect. Dis., 45: S221-S225) がある。

【0005】

迅速な検出を可能にする利用可能な携帯型プラットフォームを有するという実現性は、十分な医療施設のない地域では特に必要とされる。この点に関連して、バイオセンサーは、従来の分析方法に対する有望な代替手段であると考えられる (Amano and Cheng, 2005. Anal. Bioanalysts. Chem, 381: 156-164; Bobby Pejicic et al., 2006. Analyst, 131: 1079 -1090)。

【0006】

アロステリック酵素は有効なバイオ成分として用いることができる。その理由は、該酵素の活性が、活性部位と離れた標的ペプチドの特異抗体による特異的認識によって調節されるからである (Villaverde, 2003. FEBS Lett., 554: 169-172)。アロステリックセンサーは、前記酵素の許容部位の適切な選択と病原体のペプチド抗原の適切な選択とによって改変するタンパク質挿入によって構築することができる。アロステリック反応は、酵素アッセイにおいて起こり得るし、単純な均一系のアッセイでは短い反応時間の後に起こり得る。これは、迅速な分子診断および超高速の感染症診断についての魅力的な実現性を与えるものである。

【0007】

アロステリックセンサーとしての使用に適した種々の酵素 (Villaverde, 2003. FEBS Lett., 554: 169-172) の中でも、大腸菌 (*Escherichia coli*) により産生される β -ガラクトシダーゼ (β -D-ガラクトシド加水分解酵素、EC 3.2.1.23) が非常に好都合である。このタンパク質は *lacZ* 遺伝子にコードされており、4つのサブユニットで構成され、各サブユニットは *116353Da* であり、それらは非共有結合により連結されている (Jacobson et al., 1994. Nature, 369: 761-766)。このタンパク質は、ラクトースおよび複数の合成アナログを加水分解する能力を有する。

【0008】

近年、活性化アガロース上に固定された大腸菌の β -ガラクトシダーゼ、NF795 gpC を使用し、前記アロステリック酵素の作用による ONPG 基質変換の結果として生じる呈色強度を測定する、抗 H I V 抗体を検出するための方法が記載された (Ferraz et al., 2007. Enzyme and Microbial Technology, 41 (4): 492-497)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】 Kuiken et al., 2003. Curr. Opin. Biotechnol., 14: 641-646

【非特許文献 2】 Iqbal et al., 2000. Biosens. Bioelectronics., 15: 549-578

- 【非特許文献 3】Dominguez EA, 1993. J. Clin. Microbiol., 31: 2286-2290
- 【非特許文献 4】Lennette EH and Smith, 1999. Laboratory Diagnosis of Viral Infections, Informa Health Care
- 【非特許文献 5】McDougal, 2001. AIDS Rev. 3: 183-193
- 【非特許文献 6】Schupbach et al., 2000. Int J. Antimicrob. Agents, 16: 441-445
- 【非特許文献 7】Marie Louie, 2000. CMAJ, 163: 301-309
- 【非特許文献 8】Elnifro et al., 2000. Clin. Microbiol. Rev., 13: 559-570
- 【非特許文献 9】Ballagi-Pordany, 1993. Vet. Res Commun., 17: 55-72
- 【非特許文献 10】Niesters, 2004. Clinical Microbiology Infect., 10: 5-11
- 【非特許文献 11】Hjelle and Busch, 1989. Arch Pathol. Lab Med 113: 975-980 10
- 【非特許文献 12】Steckelberg and Cockerill, 1998. Mayo Clin. Proc., 63: 373-380
- 【非特許文献 13】Branson, 2007. Clin. Infect. Dis., 45: S221-S225
- 【非特許文献 14】Amano and Cheng, 2005. Anal. Bioanalysts. Chem, 381: 156-164
- 【非特許文献 15】Bobby Pejic et al., 2006. Analyst, 131: 1079 -1090
- 【非特許文献 16】Villaverde, 2003. FEBS Lett., 554: 169-172
- 【非特許文献 17】Jacobson et al., 1994. Nature, 369: 761-766
- 【非特許文献 18】Ferraz et al., 2007. Enzyme and Microbial Technology, 41 (4): 492-497

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

本発明では、微小電極ネットワークに基づく新たなセンサプラットフォームを開発するため、電気活性生成物である p-アミノフェノールの生成をもたらす基質である p-アミノフェニル β-D-ガラクトピラノシドを使用する。Ferraz et al. (2007) 記載の方法に対する本発明の重要な技術的利点は、前記酵素と微小電極ネットワークとの組み合わせによって、より高感度で、それによって HIV ウイルスに感染した患者の検出効率が増大する新規バイオセンサーを提供することである。

【0011】

この意味において、本発明は、HIV ウイルスに感染した患者の検出に関する問題の解決策、すなわち、この感染症の診断を迅速性と特異性の点で改善すると共に、現行の前記システムのような高価な検出器や専門スタッフを必要としない携帯可能な検出システムの提供を可能にする解決策を提示する。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、遺伝子工学的に改変されたアロステリック酵素 (β-ガラクトシダーゼ) と微小電極ネットワークとを併用することに基づく、生体試料中の抗 HIV 抗体を検出するためのバイオセンサーを提供する。アロステリック酵素は、その立体構造に応じて異なる特異的な活性を有する。当該構造は、特異的なアロステリックエフェクターが前記酵素に結合することによって変化する。抗 HIV 抗体が本来のアロステリック酵素調節であるペプチドにより前記酵素に結合する場合、その 3D 構造は明確に変化して、活性部位の性能に影響を及ぼし、酵素活性を刺激する。本発明で提示されるバイオセンサーの重要な点は、アロステリック酵素の基質の生成物が電気活性のあるものである基質を使用することであり、例えば前記アロステリック酵素に好適な pH 域内で微小電極上で別の物質に酸化され得る分子を使用することである。このバイオセンサーの別の利点は、その高い感度であり、微量の生成物を検出することが可能である。

40

【0013】

生成物の濃度は、生体試料中に存在し、本来のアロステリック酵素に連結されたペプチドに結合する抗 HIV 抗体の量の間接的な測定単位である。これは、上述のように、抗 HIV 抗体 (アロステリックエフェクターとして働く) の結合が、前記の酵素活性を支持するためである。

50

【0014】

かくして、本発明は、血清試料におけるH I V感染の検出を可能にする2つの技術的な飛躍的進歩を組合せるものである。抗H I V抗体の存在に応答する遺伝子工学的に改変されたアロステリック β -ガラクトシダーゼが用いられる。酵素反応生成物により発生し、後述する単純なシステムにより検出される電気化学的シグナルの変換器としての微小電極ネットワークを組み立てるためのマイクロ技術も用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】0.37Vの定電位で微小電極ネットワークに観察された過渡電流を示す。Z緩衝液中に、0.25mg・ml⁻¹の基質のみ(×)、2 μ g・ml⁻¹の β -ガラクトシダーゼのみ(▲)、または基質(0.25mg・ml⁻¹)と酵素(2 μ g・ml⁻¹)の両方(●)を含む溶液中の電流の測定。

【図2】28℃で1時間のインキュベーション後に0.37Vで測定された過渡電流を示す。インキュベーションは、最終の希釈物である1/60血清と抗H I V抗体との存在下で実施した。基質濃度は0.25mg・ml⁻¹であり、2 μ g・ml⁻¹のH i s N F 7 9 5 g p Cを含む汚染血清(■)または非感染血清(□)および0.86 μ g・ml⁻¹のH i s N F 7 9 5 g p Cを含む汚染血清(▲)または清浄血清(△)であった。血清を含むがH i s N F 7 9 5 g p Cを含まない対照(●)により生成した過渡電流の測定もまた実施した。

【図3】0.37Vを微小電極ネットワークに印加した20分後の全通過電荷を示す。このシグナルは、抗H I V抗体における陽性(■)または陰性(○)血清と共に28℃で45分間インキュベートした後に0.25mg・ml⁻¹の基質と接触したH i s N F 7 9 5 g p Cの活性に相当する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

従って、本発明の第一の態様において、a). 少なくとも抗H I V抗体により認識されるペプチドの付加による、改変アロステリック酵素、b). 微小電極ネットワークを備えたマトリックスを含む変換器、およびc). 電気化学的シグナルの検出器を含む、バイオセンサーが挙げられる。

【0017】

用語「アロステリック酵素」は、その活性が1つまたは複数のアロステリック部位により調節される酵素を意味する。アロステリック部位は、酵素活性部位から離れた部位にあり、共有結合様式ではなく可逆的にエフェクター(別名、アロステリックエフェクター)と結合する。エフェクターの結合は、前記酵素の三次元構造を改変し、活性部位の配置に影響を及ぼし、本発明の場合にはその酵素活性を高めることとなる。

【0018】

アロステリック酵素に付加される(複数の)ペプチドは、H I Vウイルス感染の結果としてヒトまたは動物により産生される抗H I V抗体のいずれかにより認識されるものである。規定されるペプチドの配列は、免疫システムにより産生された抗体により認識されるタンパク質配列に対応し、そのようなタンパク質は抗原と称され、抗体により認識される配列はエピトープと称される。抗体がその固有の抗原だけを同定し結合することを可能にする高い特異性を有する相互作用でもって、これらのエピトープは抗体と結合する。したがって、アロステリック酵素に付加されるペプチドは、H I Vウイルスタンパク質、通常gp41またはgp120等のエンベロープタンパク質のエピトープに対応するものであるが、他の可能性のある抗原のエピトープを排除するものではない。

【0019】

加えて、本発明にかかるバイオセンサーの一部をなすアロステリック酵素の改変には、その配列のN末端および/またはC末端領域(例えば、ストップコドン)でのヌクレオチドまたはアミノ酸(修飾されたもの又はされていないもの)付加、ならびにその配列内部でのヌクレオチドまたはアミノ酸(修飾されたもの又はされていないもの)除去もしくはは

付加が含まれる。

【0020】

バイオセンサーは、天然の生物学的構成要素と物理化学的構成要素とを組み合わせたものである。本発明におけるバイオセンサーは、生物学的センサー、変換器および検出器の3つの部分から成る。

【0021】

本発明のバイオセンサーの変換器は、酵素生成物の出現をシグナルに変換する構成要素である。前記変換器は、生物化学的反応を定量化可能な電気信号に変換する微小電極ネットワークによって形成されるマトリックスである。

【0022】

微小電極は、電気化学過程の研究において強力かつ多用途のツールである。微小電極の利点は、その小さなサイズ、様々な環境下での使用能、微小容量での操作および極微量の様々な成分を検出するその能力等を有する装置であるという点がある。微小電極ネットワークは、通常平行して連結された微小電極の結合体である。それらは、微小電極の利点を備え、全電流が個々の微小電極各々の電流の和となるという強力な増幅性という、さらにもう1つの非常に重要な利点も有する。微小電極ネットワークは、整列した微小電極ネットワークとして提供されてもよいし、またはランダムネットワークおよびマイクロストリック等の他の配置で提供されてもよい。

【0023】

本発明の実施例2は、微小円盤の量、その直径およびマトリックス内でのその規則的な配置を規定する微小電極の製造に用いられるシステムを意味する。

【0024】

ネットワークに存在する微小電極の量は、観察される電流の全体的な大きさに影響を及ぼす。従って、ネットワーク成分の数を増やすことは、記録される電流の増加という結果となる。これは、各微小電極により集められる電流が加算的なためである。これにより、低感度の機器を使用することが可能となり、機器設計および必要な構成要素を減らすことが可能である。

【0025】

しかしながら、マトリックスを形成する構成要素の数よりもさらに重要なことは、微小電極が互いに遮蔽しないよう、微小電極の他の微小電極に対する独立した挙動を確実にするために試行錯誤可能であることである（良くすればするほど良くなることを意味するため）。これは、実験時間および関係する種の拡散係数等のパラメータにより決定される最小距離を超えて微小円盤を動かすことが達成される。分子が移動し得る距離は、以下の式を用いて概算することができる： $d = \sqrt{(D \times t)}$ [式中、 d は移動距離（m）であり、 D は対象分子の拡散係数（ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ）であり、 t は実験時間（s）である]。

【0026】

本発明においては、非常に長い時間を取り扱うため、微小電極ネットワークの拡散層は完全に重なり合い、ほぼマクロ電極のような挙動をし、その領域は微小電極ネットワークに満たされた表面であり得る。しかしながら、我々の用途を検出する製品形態の機序は、ゼロの初期濃度から出発し、生成物は最終的に溶液全体に行き渡るため、微小電極ネットワークを用いることは従来のマイクロ電極に対して高い感度を有するという利点を堅持する。

【0027】

電気化学検出の原理は、分析される基質（アロステリック酵素の反応産物と基質）と作用電極を用いる導電体との間の電荷移動である。この電荷移動（検出されるもの）は、基準電極に対して一定の電位を印加した場合の作用電極上の生成物の酸化または還元によるものである。電気化学反応は、補助電極に沿ったおよび対する電荷移動を含むが、本研究では酵素反応産物の挙動は考慮しない。

【0028】

本発明では、実施例に記載されるように、以下の電極を用いた：

- ・作用電極： 微小電極ネットワーク。
- ・基準電極： Ag / AgCl 電極 (3M KCl)。
- ・補助電極： ガラス状炭素ロッド。

【0029】

本発明で記載する種類の基準電極および補助電極の使用は、他の段落で記載する改変アロステリック酵素活性に起因する反応産物により生じる電気化学的シグナルを検出することを目的とする他の電極の使用を限定するものではない。

【0030】

電気化学的シグナルの検出器は、電流測定に関するものであってもよし、または電量測定に関するものであってもよい。電流測定と電量測定との違いは、電流測定が分析物の酸化還元により生じ得る電流を測定するものであり、電流は全体または一部であり得る。一方、電量測定は全体の電荷、すなわち時間中の電流の総量を測定する。これが電量測定をより感度のよいものにする。これは、電荷が常に時間に対して直線的に増加するのに対して、電流は瞬間ごとに増加したり低下したりし得るためである。別の種類の検出器もまた用いることができる。例えば、電位差検出器、伝導度検出器またはキャパシトメトリック検出器 (capacitometric detector) がある。

【0031】

好ましい実施形態において、本発明のバイオセンサーに包含されるアロステリック酵素は、 β -ガラクトシダーゼである。

【0032】

この酵素は、本発明のアロステリック酵素の態様を示す天然または人工の β -ガラクトシダーゼのいずれにも関する。 β -ガラクトシダーゼは、 β -ガラクトシドの単糖への加水分解を触媒する加水分解活性を有する酵素である。この酵素は、 LacZ 遺伝子によりコードされ、4個のサブユニットから成り、互いに非共有結合により連結されている。 β -ガラクトシダーゼは、ラクトースや主として酵素アッセイに用いられる合成類似化合物の両方を加水分解する能力を有する。

【0033】

他の好ましい態様において、アロステリック酵素に付加されたペプチドは、HIVウイルスの膜貫通糖タンパク質 gp41 のエピトープである。

【0034】

HIVの外皮は、細胞膜に由来する脂質エンベロープである。ウイルスの膜貫通糖タンパク質である gp41 およびコートタンパク質である gp120 がこの外皮から突き出しており、それにより HIV が認識領域を介して標的細胞に結合することが可能となる。その領域はエピトープ配列であり、エピトープ配列は免疫応答により産生される抗体と結合する。HIV は、その表面に糖タンパク質 gp41 および gp120 により認識される配列を有する細胞に感染する。このようにして、ウイルスは細胞膜に結合する。

【0035】

他の好ましい実施形態において、バイオセンサーは、配列番号：1 または配列番号：2 を含むリストから選択される改変アロステリック酵素から成る。第一の配列は NF795 gpC 酵素に関するものであり、第二の配列は His NF795 gpC に関する。後者の酵素は、NF795 gpC のアミノ末端にヒスチジンテイルおよびタバコ・プロテアーゼの開裂部位が付加されて構成されている。

【0036】

実施例で示されるように、配列番号：2 に対応する酵素は、NF795 gpC 酵素の活性に対して低下を示さない。従って、選択されるアロステリック酵素は、その N 末端および/または C 末端領域にヌクレオチドまたはアミノ酸付加 (修飾されているか又はされていない) を有していてよく、ならびにその配列の内側部分にいずれかのヌクレオチドまたはアミノ酸欠失もしくは付加を有してよい。

【0037】

本発明の他の態様は、生体試料中の抗 HIV 抗体の検出のためのバイオセンサーの使用

10

20

30

40

50

である。

【0038】

用語「生体試料」は、体液、例えば血液、血漿、血清または尿および／または器官由来のいずれかの細胞組織に由来し得る単一の試料を意味する。

【0039】

生体試料中の抗H I V抗体の検出に関して、次の段落で記載される方法で改変アロステリック酵素に特異的という意味で結合した抗体の濃度を間接的に決定することを可能にするアロステリック酵素の適切な基質の添加を必要とする。

【0040】

本発明の他の態様において、抗H I V抗体を検出する方法が提供され、該方法は、a. 生体試料を抽出する工程、b. 工程(a)の生体試料を本発明のバイオセンサーに接触させる工程、c. 工程(b)の試料およびバイオセンサーにアロステリック酵素の基質を添加する工程、d. 工程(c)で生じた電気化学シグナルを記録する工程、を含む。

10

【0041】

生体試料の種類に応じて、効果的にするためにこの方法の次工程に同一のものと異なる処理が必要になり得る。これらの処理は、本方法の有効性を高めるために必要な希釈が含まれる。

【0042】

インキュベーションは、酵素活性に最適な溶剤中で、すなわち酵素が活性である最適な条件に調整されたp Hの溶剤中で実施されなければならない、ならびにその領域を保つための緩衝剤の使用がある。インキュベーションは、試料の最適な希釈（検出のより高い感度を可能にする希釈）が行われるべきであり、適切な改変アロステリック酵素濃度および酵素に付加されたペプチドに抗H I V抗体が結合するのに要する時間で実施されるべきである。本発明の実施例5において、上記のインキュベーション条件が記載され、そこでは、H I Vに罹患した患者由来の血清試料の希釈は1 / 320または1 / 60であり、酵素濃度は2 mg / Lで、インキュベーション時間は少なくとも45分である。

20

【0043】

酵素に関する化学反応、すなわち酵素反応において酵素が処理を開始する際に作用する分子は基質と称され、それらは別の分子、すなわち生成物に変換される。基質は酵素の活性部位に結合し、酵素-基質複合体を形成する。基質は酵素作用により生成物に変換され、活性部位から放出され、活性部位は他の基質を受け入れるために開放される。添加される基質濃度は過剰であってはならず、酵素作用を阻害しない濃度である。

30

【0044】

後述するように、抗H I V抗体がアロステリックタンパク質に付加されたペプチドに結合することで酵素活性を刺激し、基質が酵素の活性部位に結合することを容易にする。結合抗体の数が多くなればなるほど、より多くの量の基質が変換し得ることとなる。この工程で添加される基質は、酵素反応により生じる生成物が電気活性なものでなければならない。

【0045】

用語「電気活性な生成物」は、電気活性な化学種、すなわち溶液中で前記の化学反応により電気活性でない化学的物質（基質）から形成された化学種である。この電気活性な種は、酸化または還元され、それによって電子流を生成し得る。この電子流を記録することは、関連する段落で記載する検出技術により実施される。本発明の実施例では、電気活性な生成物はp-アミノフェノール（PAP）であり、それは酸化されると電子流を生成する。

40

【0046】

好ましい態様において、アロステリック酵素の基質は、ONPG（o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド）、CPRG（クロロフェニル レッド-β-D-ガラクトピラノシド）、FDG（フルデオキシグルコース、別名、フルオレセイジン-β-D-ガラクトピラノシド）またはPAPG（p-アミノフェニル-β-D-ガラクトピラノ

50

シド) からなるリストから選択されるものである。

【0047】

本発明の他の態様は、本発明のバイオセンサーを含む抗H I V抗体を検出するためのキットである。

【0048】

好ましい実施形態において、キットはアロステリック酵素の基質もまた含む。さらに好ましい本発明の実施形態において、このキットに含まれるアロステリック酵素の基質は、ONPG (o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド)、CPRG (クロロフェニル レッド-β-D-ガラクトピラノシド)、FDG (フルデオキシグルコース、別名、フルオレセイン ジ-β-D-ガラクトピラノシド) またはPAPG (p-アミノフェニル-β-D-ガラクトピラノシド) からなるリストから選択されるものである。

10

【0049】

明細書および特許請求の範囲を通じて、用語「含む」およびその関連用語は、他の技術的態様、付加物、成分、または工程を排除することを意図するものではない。当業者であれば、本発明の他の目的、利点および態様を、本発明の記載から又は本発明の実地から部分的に想起し得る。添付する図面および以下の実施例は、例示を目的として提供されるものであり、本発明の限定を意図するものではない。

【0050】

(実施例)

抗H I V抗体の検出を記載する下記事項は、本発明者等により実施された複数の試験によって本発明を例示するものである。

20

【0051】

実施例 1

組換えβ-ガラクトシダーゼ H i s N F 7 9 5 g p C のクローニング、発現、精製および活性アッセイ。

H I V のエンベロープタンパク質 g p 4 1 のエピトープ B を提示するヒスチジン標識した組換えβ-ガラクトシダーゼ H i s N F 7 9 5 g p C の構築は、P C R により、ヒスチジンテイルおよびタバコエッチウイルス (Tobacco Etch Virus) のプロテアーゼの切断サイト (これは、ヒスチジンの除去を可能にする) を N F 7 9 5 g p C のアミノ末端に付加することに基づいた (Ferrer-Miralles et al., 2001. J. Biol. Chem 276: 40087-40095)。P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) により得られた D N A バンドを、元のベクター p J L A 6 0 2 (Schauder et al., 1987. Gene, 52: 279-283) に由来する p N F 7 9 5 g p C のユニークな制限酵素サイトである N c o I および E c o R I にクローン化し、ベクター p H i s N F 7 9 5 g p C を得た。前記プラスミドは、改変された酵素をコードし、それは、順に、熱感受性の調節因子 c I 8 5 7 により抑制された強力なファージプロモーター ラムダ p L および p R の制御下にある。

30

【0052】

タンパク質 H i s N F 7 9 5 g p C を、標準的な方法を用いて大腸菌 M C 4 1 0 0 中で産生させた (Ferrer-Miralles et al., 2001. J. Biol. Chem 276: 40087-40095)。次いで細胞を遠心分離により濃縮し、500 mM の N a C l、10 mM のイミダゾール、2 mM のβ-メルカプトエタノールおよびプロテアーゼインヒビターカクテル・タブレット (Roche Applied Scienceの完全 E D T A フリー) を添加した Z 緩衝液中に再懸濁した。Z 緩衝液は、P B S ロゼンジ (Invitrogen) を用いて調製し、0.1 M P B S に 1 mM の M g S O₄ および 20 mM の K C l を補充した 0.1 M P B S の濃度を得た。この溶液は、最大 18 MΩ c m⁻¹ の抵抗を示す脱イオン水を用いて調製した。実験間の器具を洗浄するために漂白剤を用いた。この溶液の p H は、温度制御付きの p H メーター (M E T R O H M 8 2 7 p H ラボメーター) を用いてモニターした。

40

【0053】

超音波処理および遠心分離した後に、その上清を、同じ緩衝液で平衡化したニッケルカラム (1 ml の H i T r a p キレーティング H P カラム、GE Healthcare) 上に注いだ。

50

次いで、そのカラムを同じ緩衝液で洗浄し、タンパク質を $10-300\text{ mM}$ イミダゾール勾配により抽出した。ヒスチジンテイルの後ろに含まれるプロテアーゼ切断標的は、この精製過程では用いなかった。なぜなら、このタンパク質の酵素活性がヒスチジンテイルの付加によって影響を受けなかったため、その必要がないと考えたためである。

【0054】

タンパク質陽性画分を、E L I S A マイクロプレートで、オルト-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドを基質として用いる β -ガラクトシダーゼの小規模な活性アッセイにより検出した。収集したタンパク質画分を Z 緩衝液に透析した。タンパク質濃度は、 260 および 280 nm で測定することにより分光学的に見積もった。その酵素活性は、既報の Miller 法 (Ferrer-Miralles et al., 2001. J. Biol. Chem 276: 40087-40095) の改変法により決定した。

【0055】

実施例 2

微小電極ネットワークのキャラクタライゼーション。

本実施例で用いた薄層の微小電極ネットワークは既報のものである (Ordeig et al. 2006b. Electroanalysis, 18: 247-252, Ordeig et al. 2006c. Electroanalysis, 18: 573-578)。これらのネットワークは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ の内部中心距離を有する立体ネットワーク内に配列された 128 個の直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ の微小円盤から成る。まず初めに、電極をエタノールで清浄し、次いで $0\text{ V} \sim 2\text{ V}$ vs. Ag/AgCl (3 M の KCl) の一連の電位パルスを印加することで電気化学的に活性化した。次いで電極を 1 mM のフェロシアン化カリウム中でサイクリック・ボルタメトリーによりキャラクタライズした。異なる操作速度での限界電流の分析、例えば Ordeig et al., 2006a. Analyst, 131: 440-445 に記載される分析は、実験を通じて任意の所定の時期でのネットワーク中のアクティブな微小円盤の数の解明を可能にする。この操作は、微小円盤のパシベーションの程度を決定するための各測定後に繰り返した。電極の性能は通常、用いる懸濁液中に存在する他のタンパク質の吸着により影響を受けるが、洗浄電解質溶液 (clean electrolyte solution) 中での電気化学的活性化の各サイクル後には、そのネットワークの初期の挙動を完全に回復することが可能であった。

【0056】

実施例 3

微小電極ネットワーク中の p-アミノフェノール (PAP) 電気化学。

抗 HIV 抗体の検出は、4-アミノフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、PAPG から β -ガラクトシダーゼにより生成される p-アミノフェノール、すなわち PAP への酸化を通じて間接的に実施された (Niwa et al., 1993. Anal. Chem, 65: 1559-1563; Wollenberger et al., 1994. Analyst, 119: 1245-1249)。この手法の利点は、PAP が適度の電位 (約 0.3 V vs. Ag/AgCl (3 M KCl) に対して) で可逆的に酸化され、また実質的に電極を毀損しないことである (Salavagione et al., 2005. J. Electroanal. Chem, 576: 139-145)。しかしながら、PAP は、EC 機序によって酸化され (Bard and Faulkner, 2000. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York)、そこで初期段階の電子移動が生じ、続いて関連する化学反応が生じ、さらに広域の pH で加水分解されることが知られている (Wang et al., 1999. J. Electroanal. Chem, 464: 181-186)。さらに、我々は、p-アミノフェノールが我々の最終目的の電極に弱く吸着したことを見出した。これは、この種の拡散係数に関する文献 (Niwa et al., 1993. Anal. Chem, 65: 1559-1563, Wang et al., 1999. J. Electroanal. Chem, 464: 181-186, Robinson et al., 1990. J. Phys. Chem, 94: 1003-1005) で見られる値の範囲が原因であろう。我々の微小電極ネットワークで得られた限界電流に関する分析から、我々は適当な拡散係数 ($4.45 \pm 0.45 \times 10^{-10}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$) を見積もる。我々は、本願における全ての計算でこの値を用いた。 1 mM PAP を含む 0.1 M PBS の Z 緩衝溶液中で、この測定を実施した。そのボルタメトリーから、我々は後の PAP の電流測定に関する測定実験において Ag/AgCl

1 (3 M KCl) に対して 0.37 V の作用電位 (working potential) を用いることにした。なぜなら、この電位では、PAP の酸化がもっぱら拡散により制御されるためである。

【0057】

PAP の検出限界は、 100 mV s^{-1} で測定した限界電流から決定した。この操作速度で、ネットワーク中の微小円盤の拡散の独立性が確認される (Davies and Compton, 2005. J. Electroanal. Chem, 585: 63-82, Davies et al., 2005. J. Electroanal. Chem 585: 51-62)。検出限界は、Long および Winefordner (1983) により提唱された誤差伝播法に基づいて $4 \mu\text{M}$ で評価した。それは、誤差伝播法が IUPAC の 3 法 (Danzer and Currie, 1998. International Union of Pure and Applied Chemistry, 70: 993-1014) よりも、より現実的な結果を提供するためである。 10

【0058】

実施例 4

野生型 β -ガラクトシダーゼの電気化学的検出

図 1 は、基質も野生型 β -ガラクトシダーゼも、作用電位 (work potential) での 20 分間の分極時間の間にはそれぞれ有意な応答が生じないことを示す。しかしながら、混合することで、この酵素活性により生成される PAP の出現が即座に起こり得る。所定濃度の酵素に対し、その反応速度は、生成物、この場合 PAP の酸化電流に直接関係する。所定の基質濃度の速度のため、電流対時間の曲線に関する初期の傾きが得られる。一連の基質濃度で測定した初速度が再提示される場合、 K_m および k_{cat} 定数の値を得ることができる。古典的ミカエリスメンテン (Michaelis-Menten) 型の機序のもとで酵素の動力学を試験し、 K_m および K_{cat} の値はそれぞれ約 $3.15 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ および約 0.18 s^{-1} であることが見出された。 20

【0059】

実施例 5

HIS-NF795gpC による血清中の HIV 抗体の検出。

HIS-NF795gpC 酵素は野生型酵素よりも安定であるため、測定は BSA 1% (容積あたりの重量) を含有する Z 緩衝液中で行った。しかしながら、酵素活性の電気化学的モニタリングは微小電極ネットワークにより実行可能であり続けた。

【0060】

より高い酵素濃度の場合、最大値を超えた後に電流はドロップする。低レベルの酵素では電流ドロップはなかったため、酵素濃度が高すぎる場合でも定量的な基質消費があったことが推定された。同様にしてセンサー応答に影響を及ぼし得る他の要素は、タンパク質の吸着によって生じる微小電極のパッシベーションがあるが、おそらく酵素の障害もある。酵素の障害は排除し得ないが、我々はこの酵素障害は本発明の実験条件下では無視してよく、電力損失は基質消費と電極のパッシベーションとの組合せにより一般的に説明し得ると考える。

【0061】

電気化学セルに基質を添加した直後に、PAP 酸化電流が記録される。HIS-NF795gpC タンパク質の陽性血清とのインキュベーションは、試験した全ての場合でその活性を少なくとも 56% 増強した。実際の試料を用いて実施した試験では、 2 mg l^{-1} の酵素を HIV-1 に感染した患者由来の血清カクテルの $1/60$ 最終希釈物と共に 45 分間インキュベートした。 40

【0062】

図 3 は、主要な実験結果を示し、前記実験は、感染した個人由来および健常者由来の 2 種の異なる血清の連続希釈の貯蔵物と酵素とを、タンパク質 HIS-NF795gpC と共にインキュベーションすることを含んだ。各条件に関し、平均値とそれらに対応するエラーバーの見積もりを可能にするため、測定を 3 回行った。我々は、測定誤差のため 95% の信頼水準と組み合わせた標準偏差を用いる。抗体による認識は $1/320$ 血清希釈物の場合に最適であった。酵素活性の増加はこの血清濃度の点よりも高レベルでは増加しな 50

った。電流分析は、酵素反応の初速度の測定よりも又は基質を用いた反応 20 分後の電流の測定よりも、より信頼性のある測定である。この電荷測定はより迅速であり、より低濃度の酵素と基質とを用いた実行を可能にする（図 2）。

【0063】

実施例の電気化学測定において用いた定電位電解装置は、Windows（登録商標）XPのPCに連結され、GPES4プログラムにより制御されたAutolab PG12であった。直径3mm、5cm長のガラス状炭素ロッドを補助電極として用い、Metrohm Biotrode Ag/AgCl（3M KCl）を基準電極として用いた。全ての溶液の温度は恒温槽に連結された二重壁セルにより制御された。

【図 1】

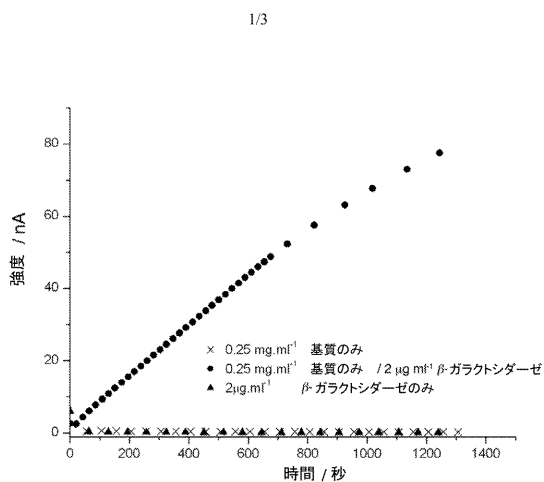


FIG. 1

【図 2】

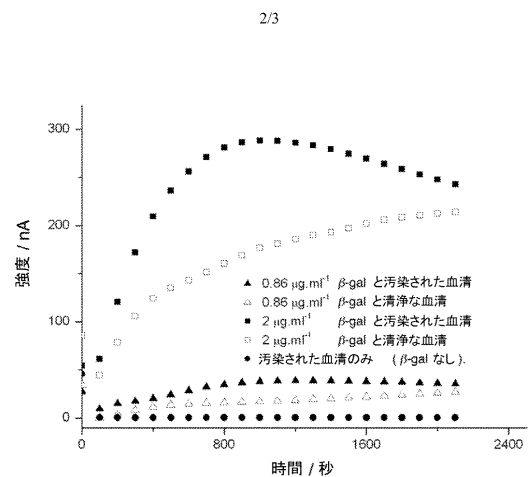


FIG. 2

【図 3】

3/3

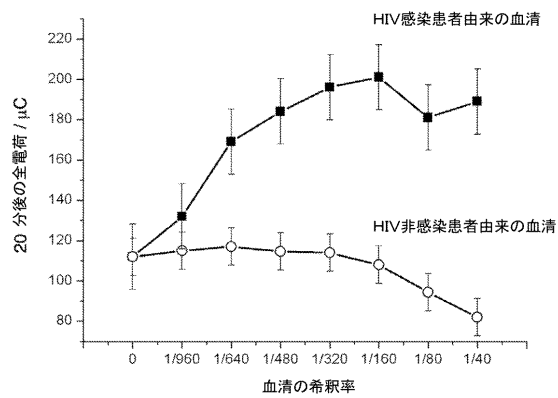


FIG. 3

【配列表】

[2012502265000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成23年5月2日(2011.5.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2012502265000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2009/070368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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)
C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Bases de datos STN

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FERRAZ R.M. et al., "Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered beta-galactosidase" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY (03 September 2007), Vol. 41, N°. 4, pages 492-497; ISSN 0141-0229; DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.04.001; the whole document.	1-10
Y	ORDEIG O. et al., "Electroanalysis utilizing amperimetric microdisk electrode arrays" ELEDTROANALYSIS (October 2007) Vol. 19, N°. 19-20, pages 1973-1986; DOI: 10.1002/elan.200703914; the whole document.	1-10
Y	FERRAZ COLOMINA R.M., "Development of allosteric biosensors for the diagnosis of infectious diseases" Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. ISBN: B-47797-2008 / 978-84-691-7245-2 [online], June 2008 [retrieved the 16/12/2009], Retrieved from the Internet <URL:http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0925109-122213/rmfc1de1.pdf>; the whole document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document 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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18.December.2009 (18.12.2009)

Date of mailing of the international search report
(07/01/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Authorized officer

A. García Coca

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Telephone No. +34 91 349 34 11

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070368

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VILLAYERDE A., "Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis" FEBS LETTERS (06 November 2003) Vol. 554, N°. 1-2, pages 169-172; ISSN 0014-5793; DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01160-8; the whole document.	1-3, 5
A	FERRER-MIRALLES N. et al., "Engineering regulable Escherichia coli beta-galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (26 October 2001) Vol. 276, N°. 43, pages 40087-40095; DOI: 10.1074/jbc.M104704200; the whole document.	1-10
A	FERRAZ R.M. et al., "Profiling the allosteric response of an engineered beta-galactosidase to its effector, anti-HIV antibody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (13 February 2004) Vol. 314, N°. 3, pages 854-860; ISSN 0006-291X; DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.169; the whole document.	1-10
A	FERRAZ R.M. et al., "High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor" MOLECULAR IMMUNOLOGY (May 2006) Vol. 43, N°. 13, pages 2119-2123; ISSN 0161-5890; DOI: 10.1016/j.molimm.2005.12.012; the whole document.	1-10
PX	LACZKA O. et al., "Fast electrochemical detection of anti-HIV antibodies: coupling allosteric enzymes and disk microelectrode arrays" ANALYTICA CHIMICA ACTA (08 May 2009) Vol. 641, N°. 1-2, pages 1-6; ISSN 0003-2670; DOI: 10.1016/j.aca.2009.03.008; the whole document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070368

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:

2. ☒ Claims Nos.: 1, 5, 6 and 8
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:

see additionnal sheet

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:

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/ES 2009/070368

Claims 1, 5, 6 and 8 lack clarity (PCT Article 6).

Claim 1 claims "a biosensor comprising a modified allosteric enzyme..." , yet does not define said enzyme, creating a lack of clarity. If the enzyme is not identified, the scope of said claims includes a very high number of known or unknown molecules, possibly creating a lack of unity of invention. The same is the case of claims 5, 6, and 8, which refer to the "biosensor according to the invention" .

When establishing the international search report, it was considered that the modified allosteric enzyme is the enzyme beta-galactosidase, as indicated in claim 2, such that claim 1 now reads:

1. A biosensor comprising:

- (a) the allosteric enzyme beta-galactosidase modified at least by addition of a peptide recognised by anti-HIV antibodies,
- (b) a transducer with a matrix of microelectrode arrays; and
- (c) an electrochemical signal detector.

In the case of claims 5, 6 and 8, which refer to the "biosensor according to the invention" , the biosensor is considered to comprise the enzyme beta-galactosidase, as indicated above.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070368

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12Q 1/34*** (2006.01)***G01N 33/53*** (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070368

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos STN

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	FERRAZ R.M. et al., "Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered beta-galactosidase" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY (03 septiembre 2007), Vol. 41, N° 4, páginas 492-497; ISSN 0141-0229; DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.04.001; todo el documento.	1-10
Y	ORDEIG O. et al., "Electroanalysis utilizing amperimetric microdisk electrode arrays" ELEDTROANALYSIS (octubre 2007) Vol. 19, N° 19-20, páginas 1973-1986; DOI: 10.1002/elan.200703914; todo el documento.	1-10
Y	FERRAZ COLOMINA R.M., "Development of allosteric biosensors for the diagnosis of infectious diseases" Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. ISBN: B-47797-2008 / 978-84-691-7245-2 [en línea], Junio 2008 [recuperado el 16/12/2009], Recuperado de Internet <URL:http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0925109-122213/rmfc1de1.pdf>; todo el documento.	1-10

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos
 ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

18.Diciembre.2009 (18.12.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

07-ENERO-2010 (07/01/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

A. García Coca

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono +34 91 349 34 11

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070368

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	VILLAYERDE A., "Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis" FEBS LETTERS (06 noviembre 2003) Vol. 554, N°. 1-2, páginas 169-172; ISSN 0014-5793; DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01160-8; todo el documento.	1-3, 5
A	FERRER-MIRALLES N. et al., "Engineering regulable Escherichia coli beta-galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (26 octubre 2001) Vol. 276, N°. 43, páginas 40087-40095; DOI: 10.1074/jbc.M104704200; todo el documento.	1-10
A	FERRAZ R.M. et al., "Profiling the allosteric response of an engineered beta-galactosidase to its effector, anti-HIV antibody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (13 febrero 2004) Vol. 314, N°. 3, páginas 854-860; ISSN 0006-291X; DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.169; todo el documento.	1-10
A	FERRAZ R.M. et al., "High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor" MOLECULAR IMMUNOLOGY (mayo 2006) Vol. 43, N°. 13, páginas 2119-2123; ISSN 0161-5890; DOI: 10.1016/j.molimm.2005.12.012; todo el documento.	1-10
PX	LACZKA O. et al., "Fast electrochemical detection of anti-HIV antibodies: coupling allosteric enzymes and disk microelectrode arrays" ANALYTICA CHIMICA ACTA (08 mayo 2009) Vol. 641, N°. 1-2, páginas 1-6; ISSN 0003-2670; DOI: 10.1016/j.aca.2009.03.008; todo el documento.	1-10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070368

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)	
Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:	
1. ☐	Las reivindicaciones N°s: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒	Las reivindicaciones N°s: 1, 5, 6 y 8 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: Ver hoja adicional.
3. ☐	Las reivindicaciones N°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).
Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)	
La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:	
1. ☐	Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐	Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐	Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐	Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:
Indicación en cuanto a la protesta	☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta. ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento. ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070368

Las reivindicaciones 1, 5, 6 y 8 tienen falta de claridad (art. 6 PCT).

En la reivindicación 1 se reivindica "un biosensor que comprende una enzima alostérica modificada...." pero no se define cuál es dicha enzima, lo que lleva a una falta de claridad. Si no se especifica cuál es dicha enzima, el alcance de dichas reivindicaciones incluiría un número muy elevado de moléculas, conocidas o no y podría dar lugar a una falta de unidad de invención. Lo mismo sucedería con las reivindicaciones 5, 6 y 8, que hacen referencia al "biosensor de la invención".

A la hora de la realización del Informe de Búsqueda Internacional, se ha interpretado que la enzima alostérica modificada es la enzima beta-galactosidasa, tal y como se indica en la reivindicación 2, de forma que la reivindicación 1 quedaría:

1. Biosensor que comprende:

- a. la enzima alostérica beta-galactosidasa, modificada, al menos, por la adición de un péptido reconocido por anticuerpos anti-VIH,
- b. un transductor que comprende una matriz con redes de microelectrodos y
- c. un detector de la señal electroquímica.

En el caso de las reivindicaciones 5, 6 y 8, que hacen referencia al "biosensor de la invención", se ha tomado el biosensor con la enzima beta-galactosidasa, tal y como se ha indicado anteriormente.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070368

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD***C12Q 1/34*** (2006.01)***G01N 33/53*** (2006.01)

フロントページの続き

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

(74)代理人 100100158

弁理士 鮫島 睦

(74)代理人 100068526

弁理士 田村 恭生

(74)代理人 100103115

弁理士 北原 康廣

(74)代理人 100156122

弁理士 佐藤 剛

(74)代理人 100165892

弁理士 坂田 啓司

(72)発明者 オリヴィエ・ラズカ

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、インスティトゥト・デ・ミクロエレクトロニカ・デ・バルセロナ（イエメベーセエネエメ）

(72)発明者 フランシスコ・ハビエル・デル・カンボ

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、インスティトゥト・デ・ミクロエレクトロニカ・デ・バルセロナ（イエメベーセエネエメ）

(72)発明者 フランシスコ・サビエル・ムニョス・バスクアル

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、インスティトゥト・デ・ミクロエレクトロニカ・デ・バルセロナ（イエメベーセエネエメ）

(72)発明者 アントニオ・ペ・ビリャベルデ・コラレス

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、エディフィシ・イベベ、インスティトゥト・デ・ビオテクノロヒア・イ・デ・ビオメディシナ（イベベーウアベ）

(72)発明者 ネウス・フェレル・ミラリエス

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、エディフィシ・イベベ、インスティトゥト・デ・ビオテクノロヒア・イ・デ・ビオメディシナ（イベベーウアベ）

(72)発明者 ロサ・マリア・フェラス・コロミナ

スペイン、エー０８１９３ベリャテラ（バルセロナ）、カンプス・ユニベルシダッド・アウトノマ、エディフィシ・イベベ、インスティトゥト・デ・ビオテクノロヒア・イ・デ・ビオメディシナ（イベベーウアベ）

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ79 QR15 QR44 QR82 QS28 QS33 QS36 QX04