

(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2011-501161

(P2011-501161A)

(43) 公表日 平成23年1月6日(2011.1.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 27/327 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/30 3 5 1	
<b>GO 1 N 27/416 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/46 3 3 6 B	
	GO 1 N 27/46 3 3 6 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁)

(21) 出願番号 特願2010-530160 (P2010-530160) (86) (22) 出願日 平成20年10月17日 (2008.10.17) (85) 翻訳文提出日 平成22年6月10日 (2010.6.10) (86) 国際出願番号 PCT/US2008/080379 (87) 国際公開番号 W02009/052436 (87) 国際公開日 平成21年4月23日 (2009.4.23) (31) 優先権主張番号 60/980, 733 (32) 優先日 平成19年10月17日 (2007.10.17) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 61/087, 102 (32) 優先日 平成20年8月7日 (2008.8.7) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 61/087, 094 (32) 優先日 平成20年8月7日 (2008.8.7) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 510108607 オームクス コーポレーション アメリカ合衆国, イリノイ州 60201 , エバンストン, スイート 6143, メ ーブル アベニュー 1801 (74) 代理人 100079108 弁理士 稲葉 良幸 (74) 代理人 100109346 弁理士 大貫 敏史 (72) 発明者 アーレンス, マイケル, ジェー. アメリカ合衆国, イリノイ州 60201 , エバンストン, セントラル ストリート 2951, ナンバー 306 <div style="text-align: right;">最終頁に続く</div>
---	---

(54) 【発明の名称】 バイオセンサーに用いる新しい化学

## (57) 【要約】

本発明は、電子移動プロセスの核の再配置エネルギー、 を用いる、被分析物の検出のための新規組成物および方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

共有結合的に付着された電気活性複合体（EAM）を含有する電極を含む組成物であって、前記 EAM は遷移金属および少なくとも 1 つのシアノリガンドを含む、組成物。

**【請求項 2】**

前記 EAM は少なくとも 2 つのシアノリガンドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記 EAM は少なくとも 3 つのシアノリガンドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記 EAM は少なくとも 4 つのシアノリガンドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

**【請求項 5】**

前記 EAM は少なくとも 5 つのシアノリガンドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記遷移金属はオスミウムである、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 7】**

電極は金であり、および前記 EAM は前記電極と、1 つのイオウ原子を介して共有結合的に付着する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 8】**

電極は金であり、および前記 EAM は前記電極と 2 つのイオウ原子を介して共有結合的に付着する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

**【請求項 9】**

前記 EAM は、前記電極と、前記イオウ原子（群）を含む第 1 の終端を伴う付着リンカーを用いて付着する、請求項 7 または 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記付着リンカーは、前記遷移金属のために配位原子を提供する第 2 の終端を含む、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記付着リンカーはアルキル鎖である、請求項 9 または 10 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記アルキル鎖は置換される、請求項 11 に記載の組成物。

30

**【請求項 13】**

前記電極は、前記 EAM および捕獲リガンドを含む酸化還元活性捕獲複合体（REAMC）を含有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 14】**

前記捕獲リガンドは配位原子を前記遷移金属のために提供する、請求項 13 に記載の組成物。

**【請求項 15】**

電極は金であり、および前記 REAMC は前記電極と、1 つのイオウ原子を介して共有結合的に付着する、請求項 13 または 14 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

40

電極は金であり、および前記 REAMC は前記電極と、2 つのイオウ原子を介して共有結合的に付着する、請求項 13 または 14 に記載の組成物。

**【請求項 17】**

前記 REAMC は、前記電極と、前記イオウ原子（群）を含む第 1 の終端を伴う付着リンカーを用いて付着する、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

**【請求項 18】**

前記付着リンカーは、前記遷移金属のために配位原子を提供する第 2 の終端を含む、請求項 17 に記載の組成物。

**【請求項 19】**

前記付着リンカーはアルキル鎖である、請求項 17 または 18 に記載の組成物。

50

## 【請求項 20】

前記アルキル鎖は置換される、請求項 19 に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記電極は、前記 EAM を含有する第 1 の種および捕獲リガンドを含有する第 2 の種を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記捕獲リガンドはペプチドである、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記捕獲リガンドは糖質である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 24】

前記組成物は、電極のアレイを含み、その各々は、遷移金属および少なくとも 1 つのシアノリガンドを含む共有結合的に付着された遷移金属複合体を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

## 【請求項 25】

標的酵素を検出する方法であって、

a) 試料を、

i) 遷移金属、および第 1 の  $E^0$  を有する少なくとも 1 つのシアノリガンドを含む電気活性部分 (EAM)、

ii) 捕獲リガンド

を含む電極が含まれる組成物と、前記標的酵素が、存在するならば、前記捕獲リガンドを変え、前記 EAM が第 2 の  $E^0$  をもつような条件の下で接触させること、および

20

b) 前記第 2 の  $E^0$  を測定すること

を含む、方法。

## 【請求項 26】

各々が

i) 遷移金属、および第 1 の  $E^0$  を有する少なくとも 1 つのシアノリガンドを含む電気活性部分 (EAM)、

ii) 捕獲リガンド

を含む複数の電極が含まれる支持体を、前記組成物が含む、請求項 25 に記載の方法。

30

## 【請求項 27】

標的酵素を検出する方法であって、

a) 試料を、

i) 遷移金属、および第 1 の  $E^0$  を有する少なくとも 1 つのシアノリガンドを含む電気活性部分 (EAM)、

ii) 捕獲リガンド

を含む REAMC が含まれる組成物と、前記標的酵素が、存在するならば、前記捕獲リガンドを変え、前記 EAM が第 2 の  $E^0$  をもつような条件の下で接触させること、および

b) 前記第 2 の  $E^0$  を測定すること

を含む、方法。

40

## 【請求項 28】

a) 官能基を含む第 1 の種、および

b) 電気活性複合体 (EAM) であって、遷移金属および少なくとも 1 種のシアノリガンドを含む EAM

を含む電極が含まれる組成物。

## 【請求項 29】

前記官能基はマレイミド基である、請求項 28 に記載の組成物。

## 【請求項 30】

バイオセンサーを作成する方法であって、

a) 次の

i) 第 1 の官能基を含む第 1 の種、および

50

i i) 電気活性複合体 (EAM) であって、遷移金属および少なくとも 1 種のシアノリガンドを含む EAM が含まれる電極を提供すること、

c) 前記電極を、第 2 の官能基を含む生体分子と、前記第 1 の種および前記生体分子の間で共有結合を形成するために接触させることを含む、方法。

【請求項 3 1】

第 1 の官能基は、マレイミド、イミドエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジル、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリール、アルファ-ハロアシルおよびピリジル (pyridyl) ジスルフィドを含む部分からなる群より選ばれる、請求項 3 0 に記載の方法。

10

【請求項 3 2】

前記第 1 の官能基はマレイミドを含み、および前記生体分子はシステインアミノ酸を含むタンパク質である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記タンパク質はペプチドである、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

次の式

アンカー - スペース 1 - EAM - ( スペース 2 )<sub>n</sub> - CL ( I )

( 式中、前記アンカーは環状ジスルフィド基を含み、

EAM は電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元化合物を含有し、

CL は捕獲リガンドであり、

スペース 1 は SAM 形成性種であり、および

n = 0 または 1 である )

20

を有する化合物。

【請求項 3 5】

前記 EAM は、マンガン、テクネチウム、レニウム、鉄、ルテニウム、オスミウム、コバルト、ロジウム、イリジウム、ニッケル、パラジウム、プラチナ、銅、銀、および金からなる群より選ばれる遷移性金属を含有する、請求項 3 4 に記載の化合物。

【請求項 3 6】

前記遷移性金属はルテニウムである、請求項 3 5 に記載の化合物。

30

【請求項 3 7】

前記環状ジスルフィド基は、ピリジル - オリゴフェニルエチルニル - [ 1 , 2 , 5 ] - ジチアゼパン (pyridyl-oligophenylethynyl-[1,2,5]-dithiazepane) を含む、請求項 3 4 に記載の化合物。

【請求項 3 8】

次の式

アンカー - スペース 1 - EAM - ( スペース 2 )<sub>n</sub> - CL ( I )

( 式中、前記アンカーはピリジル基を含み、

EAM は電気活性部分であり、

i) 溶媒接触可能酸化還元化合物、および

ii) 電荷中和性リガンド

40

を含み、

CL は捕獲リガンドであり、

スペース 1 は SAM 形成性種であり、および

n = 0 または 1 である )

を有する化合物。

【請求項 3 9】

前記電荷中和性リガンドは、ジチオカルバマート、ベンゼンジチオレート、シッフ塩基、EDTA、および DTPA からなる群より選ばれる、請求項 3 8 に記載の化合物。

【請求項 4 0】

50

前記電荷中和性リガンドは、カルボン酸塩、アミン、チオレート、ホスフィン、イミダゾール、ピリジン、ピピリジン、テルピリジン、tacn (タクン)、サレン、acacen (アカセン)、EDTA、DTPA、Cp、ピンサー、およびscorpionates (スコルピオネート) からなる群より選ばれる、請求項 39 に記載の化合物。

【請求項 41】

前記電荷中和性リガンドはペンタアンミンである、請求項 40 に記載の化合物。

【請求項 42】

前記 EAM は、単座、二座、三座、または多座である、請求項 41 に記載の化合物。

【請求項 43】

- a) 第 1 のアンカー、
- b) 前記第 1 のアンカーに連結する電荷中和性リガンド、
- c) 前記電荷中和性リガンドと共有結合的に付着する電気活性部分 (EAM)、および
- d) 捕獲リガンド

を含む、組成物。

10

【請求項 44】

前記捕獲リガンドは前記第 1 のアンカーと連結する、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

さらに、第 2 のアンカーを含み、前記捕獲リガンドは前記第 2 のアンカーと連結する、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 46】

自己組織化単分子層 (SAM) を含む電極が含まれる組成物であって、前記 SAM は次の式

20

アンカー - スペース 1 - EAM - スペース 2 - CL (II)  
 (式中、前記アンカーは、前記電極と、ジスルフィド基を通して連結され、  
 EAM は電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元化合物を含有し、  
 CL は捕獲リガンドであり、  
 スペース 1 は絶縁性または伝導性のいずれかであり、  
 スペース 2 は任意である)

を有する化合物を含有する、組成物。

【請求項 47】

- a) 次の式

アンカー - スペース 1 - EAM - (スペース 2)<sub>n</sub> - CL (I)  
 (式中、前記アンカーは環状ジスルフィド基を含み、  
 EAM は電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元化合物を含有し、  
 CL は捕獲リガンドであり、  
 スペース 1 は絶縁性または伝導性のいずれかであり、および  
 n = 0 または 1 である)

を有する化合物を提供すること、および

30

- b) 前記化合物を、電極と、前記電極への前記アンカーの付着を形成するために、前記環状ジスルフィドを開くことによって接触させること

40

を含む、方法。

【請求項 48】

前記電極はさらに、自己組織化単分子層 (SAM) を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

電極のアッセイを含む組成物であって、各電極は、次の式

アンカー - スペース 1 - EAM - (スペース 2)<sub>n</sub> - CL (I)  
 (式中、前記アンカーは環状ジスルフィド基を含み、  
 EAM は電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元化合物を含み、  
 CL は捕獲リガンドであり、  
 スペース 1 は絶縁性または伝導性のいずれかであり、および

50

$n = 0$  または  $1$  である )

を有する化合物を含有する、組成物。

【請求項 50】

試験試料において標的被分析物を検出する方法であって、

a) 次の式

アンカー - スペース 1 - E A M - ( スペース 2 )  $n$  - C L ( I )

( 式中、前記アンカーは環状ジスルフィド基を含み、

E A M は電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元化合物を含有し、

C L は捕獲リガンドであり、

スペース 1 は絶縁性または伝導性のいずれかであり、および

$n = 0$  または  $1$  である )

を有する化合物を含む電極を提供すること、

b) 前記電極を前記試験試料と接触させること、および

c) 前記 E A M の再配置エネルギーを測ることによって前記標的被分析物の存在を決定すること

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国仮特許出願の2007年10月17日付け出願番号第60/980,733号および2008年8月7日付け出願の第61/087,094号および第61/087,102号の利益、およびそれらに対する優先権を請求し、そのすべての開示を、参照することによってそのまま全体としてここに組み込む。

本発明の分野

【0002】

本発明は、新しい組成物および標的被分析物の $E^0$ の変化を用いる被分析物の検出のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

電子移動反応は、光合成から酸素呼吸まで、多種多様な生物学的変換における重要な工程 ( ステップ ) である。化学的、および生物学的なシステムにおける電子移動反応の調査は、大多数の知識および強い理論的な基礎の開発を導き、それは少数のパラメータに関して電子移動の比率 ( 速度 ) を記述する。

【0004】

タンパク質および他の生物学的分子における電子トンネリング ( トンネル効果 ) は、酸化還元 ( レドックス ) 中心の電子相互作用が比較的弱い場合の反応において起こる。半古典論の反応は、電子移動のための反応速度が、原動力 ( driving force ) (  $-G^\circ$  )、核の再配置パラメータ (     )、および遷移状態 (  $H_{AB}$  ) での反応体および生成物の間での電子結合強度 ( electronic-coupling strength ) に依存し、次の方程式によると予測する。

すなわち

【数 1】

$$k_{ET} = (4\pi^3/h^2 \lambda \kappa_B T)^{1/2} (H_{AB})^2 \exp[(-\Delta G^\circ + \lambda)2/\lambda \kappa_B T]$$

【0005】

上記の方程式において、核の再配置エネルギー ( reorganization energy )、 $\lambda$  は、生成物の平衡核立体配置 ( equilibrium nuclear configuration ) での反応体のエネルギーとして規定される。極性溶媒中の電子移動反応では、 $\lambda$  への主要な貢献は、反応体の電荷分布における変化に応じた溶媒分子の再配向 ( 再設定 ) から生じる。 $\lambda$  の第2の構成要素は、ドナー ( 供与体 ) およびアクセプター ( 受入体 ) の酸化状態における変化による、結合の長さ、および角度における変化に由来する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6,013,459号明細書

【特許文献2】米国特許第6,013,170号明細書

【特許文献3】米国特許第6,248,229号明細書

【特許文献4】米国特許第7,267,939号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

以前の仕事では、再配置エネルギー、における変化を新規センサーの基礎として用いることが記述される。たとえば、米国特許第6,013,459号、第6,013,170号、第6,248,229号および第7,267,939号を参照し、すべてを、ここで、参照することによってそのまま全体について組み込む。これらの方法は、一般にレドックス活性複合体に、またはその近くで被分析物を結合することを含む。レドックス活性複合体は標的被分析物を結合する少なくとも1つの電気活性（エレクトロアクティブ）分子および捕獲（キャプチャー）リガンド（配位子）を含み、そして複合体は電極に結合する。被分析物の結合により、レドックス活性分子の再配置エネルギーが変えられ、このようにして、 $E^0$ が変わり、そして検出が許される。

【0008】

20

本発明の目的は、レドックス活性分子の $E^0$ における変化と対応させて、溶媒再配置エネルギーにおける変動を用い（例えば、バイオセンサーの遷移金属を伴うシアノリガンドを利用する）、標的被分析物の検出のための組成物および方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

#### 本発明の概略

本発明は、標的被分析物の検出において使用するための、バイオセンサーに関する方法および組成物を提供する。

【0010】

30

一局面において、本発明は特定の $E^0$ を有する共有結合的に付着したエレクトロアクティブ複合体（EAM）含有の電極を含む固形支持体（時々、ここでは「基材（サブストレート）」と称する）が含まれる組成物を提供する。基材は任意に、電極のアレイ（配列体）を含むことができる。電極（群）は各々、任意にReAMCの一部であることができるEAMを含有する。適切な遷移金属には、鉄、ルテニウムおよびオスミウム、ならびにここに概説される他のものが含まれる。若干の具体例において、EAMsは、少なくとも1つのシアノリガンドを本発明において含み、また、2、3、4および5つでも使用が見出された。EAMs（ならびにReAMCsおよび希釈剤SAM形成性種）は、アルキル基（置換されたアルキル基が含まれる）を含め、付着（アタッチメント）リンカーを用いて電極に連結されることができる。

【0011】

40

更なる面では、電極は任意に自己組織化単分子層（SAM）種を含む。

【0012】

追加の面では、本発明のEAM/ReAMCsは、アンカー（錨、固着部）リガンドを用いる電極に付着し、それは「単足性（unipodal）」または「多足性（multipodal）」であることができ、たとえば、二足性付着で、2つの硫黄原子または環状ジスルフィドアンカー基のようなものの使用が含まれる。

【0013】

更なる面では、EAMは、前記EAMおよび捕獲リガンドを含むレドックス活性捕獲複合体（REAMC）の一部である。一局面において、捕獲リガンドは、調整（配位）原子を遷移金属に提供する。追加の面では、電極に、EAMを含む第1の種および捕獲リガンドを含む第2の種が含まれるように、捕獲リガンドはEAMとは分かれている。

50

## 【0014】

一局面において、捕獲リガンドは、ペプチドを含むタンパク質、または糖質（炭水化物）である。

## 【0015】

追加の面では、ここに概説されるように、本発明は、試料（サンプル）を、電極が含まれる組成物と接触させることを含む、標的被分析物を検出する方法を提供する。標的分析物を捕獲リガンドと結合させることは、EAMの $E^0$ を変え、たとえば、第2の $E^0$ を作り出し、それは標的分析物の存在、または不存在を決定するために測定される。

## 【0016】

更なる面では、本発明は、第1の官能基を含む第1の種（通常はSAM形成性種（SAM forming species））が含有される電極を提供することを含む、バイオセンサーを作成する方法を提供する。電極は、第1の種と生体分子の間で共有結合を形成するために第2の官能基を含む生体分子（それは、捕獲リガンドになる）と接触される。電極はまた、本発明のバイオチップ（生体素子）を形成するために、電気活性複合体（EAM）を含有する。若干の面では、各々の分子上の官能基は、マレイミド、イミドエステル、N-ヒドロキシサクシニミジル、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリール、アルファ-ハロアシルおよびピリジル（pyridyl）ジスルフィドおよびシステインを含む部分（一部分、モエティ）からなる群から選ばれる（例は、第1の官能基はマレイミドを含み、そして生体分子は、システインアミノ酸を含むタンパク質（例は、ペプチド）である。

10

## 【0017】

追加的な面では、本発明には、次の式

アンカー-スペーサー1-EAM-(スペーサー2)<sub>n</sub>-CL

（式中、前記アンカーは環状ジスルフィド基を含み、

EAMは電気活性部分であり、溶媒接触可能（アクセシブル）酸化還元化合物を含有し、

CLは捕獲リガンドであり、

スペーサー1はSAM形成性種であり、および

n=0または1である）

を有する化合物が包含される。

20

## 【0018】

更なる面では、本発明には、次の式

アンカー-スペーサー1-EAM-(スペーサー2)<sub>n</sub>-CL (I)

（式中、EAMは遷移金属および少なくとも1種の電荷中和性（charge-neutralizing）リガンドを含む電気活性部分である）

を有する化合物が包含される。電荷中和性リガンドは、次の、ジチオカルバマート、ベンゼンジチオレート、シッフ塩基、EDTA、およびDTPA、カルボン酸塩、アミン、チオレート、ホスフィン、イミダゾール、ピリジン、ピピリジン、テルピリジン、tacn（タクン）、サレン、acacen（アカセン）、Cp、ピンサー（pincer）、およびscorpionates（スコルピオネート）およびペンタアンミン（pentaammine）からなる群より選ぶことができる。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0019】

【図1】図1A-1Cは本発明のいくつかの化合物を描く。図1Aはここで、スペーサーを通してレドックスに連結（リンク）される一端部での捕獲リガンドを含む化合物を示す（ここで、ルテニウム例を含むことが示される）。化合物はまたアンカーを含み、それを通して、化合物は電極の表面に付着される。また、同様に電極の表面に付着される絶縁体（110）が示される。図1Bおよび1Cは、化合物が複数金属を含有することを描く。示されるもののようなジオメトリー（表面形状）は、そこではCLは「捕獲リガンド」であり、単一のタンパク質を引き付け、そして2つの金属中心が同時に可能性のより一層大きな変化を与えてそれを相互作用させる。

40

【図2】図2はBPAIアンカーを有する[BIM-Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sub>2</sub>+複合体およびBPAアンカーを有する[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>L]<sub>2</sub>+複合体を描く。

50



【図 3】図3はBIPODに基づく（ベースの）化合物を描く。

【図 4 A】図4Aはアルキルチオールアンカーを有する $[BIM-Ru(NH_3)_4L]^{2+}$ 複合体を描く。

【図 4 B】図4Bは共役チオールアンカーを有する $[Ru(NH_3)_5L]^{2+}$ 複合体を描く。

【図 5 A】図5AはRu-Nに基づく複合体のための新しいアーキテクチャー（基本設計概念）を描く。

【図 5 B】図5BはRu-Nに基づく複合体の例を描く。

【図 6 A】図6Aは、増幅を伴う検出のために修飾したプルシアンブルーの面を図式的に描く。

【図 6 B】図6Bは、潜在的シフトを高めるために、クラウンエーテルの調整の使用を描く。

【図 7】図7は、第2の球状調整、 $Ru(NH_3)_5L$ および18-C-6の間の付加物形成の効果を描く。

【図 8 A】図8Aおよび8Bは、複数金属が用いられるとき、「単一」および「隣り合う」アレンジメント（配置）において用いるリガンドを描く。

【図 8 B - 1】上記と同様の図である。

【図 8 B - 2】上記と同様の図である。

【図 9 A】図9は、被分析物の検出のために化合物を生じさせるためのビルディングブロック（基礎的要素）の若干を描く。

【図 9 B】上記と同様の図である。

【図 1 0】図10Aおよび10Bはいくつかの模範的な化合物を描く。

【図 1 1】図11はいくつかの模範的な化合物を描く。

【図 1 2】図12および13は、本発明の適切なジオメトリーのいくつかの概略図を描く。図12AおよびCは、リンカーが電極に対して一端部にて付着し、そして他の端部が調整原子を遷移金属(TM)のために提供するリガンド(L)において終わる状況を描く。捕獲基材(CS)は追加のリガンド（描いていない）を提供し、そして複数の他のリガンドは残留する調整原子を提供する。酵素による作用の際、捕獲基材は、脱離基(X)を招く。これらの図は、遷移金属が6つの調整原子を利用する状況を描くが、他の多数の調整原子が、金属に従って用いられることに留意する必要がある。同様に、これらの図は、単一の調整原子を提供するリガンドの使用を描くが、より一層少ないリガンドで、多重の（複数の）調整原子の（例は、多座の）リガンドが提供されるものを同様に用いることができる。図12Bは、捕獲基材およびEAMが別々に電極に付着される状況を描く。図12Cは、捕獲基材が調整原子を遷移金属に提供しないこと以外は、図3Aに似た状況を描く。溶液相システム（solution phase system）が図12および14と似ていることができ、そこでは、溶液におけるEAMの電気化学ポテンシャルが標的酵素の酵素活性の結果として変えられることができることを理解すべきである。

【図 1 3】上記と同様の図である。

【図 1 4】図14は本発明でのバイオチップを生産するための一般的なスキーム（計画）を描く。

【図 1 5】図15は図14の生産の特定の例を示す。

【図 1 6】図16A、B、CおよびDは、若干の模範的な化合物を描く。

【図 1 7】図17A、B、CおよびDは、若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、ジスルフィド環状アンカー基、例えば、または異なるスペーサーのような異なるアンカーとともに構築することができる。

【図 1 8】図18AおよびBは、若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、ジスルフィド環状アンカー基、例えば、または異なるスペーサーのような異なるアンカーとともに構築することができる。

【図 1 9】図19は合成の一般的なスキームを描く。

【図 2 0】図20は一般的な検出スキームを描く。

【図 2 1 A - B】図21A、B、C、DおよびEは、若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、例えばジスルフィド環状アンカー基のような異なるアンカー、または異なるスペーサ

10

20

30

40

50

ーとともに構築することができる。

【図 2 1 C - E】上記と同様の図である。

【図 2 2】図22は合成の一般的なスキームを描く。

【図 2 3】図23はアッセイのために合成の一般的なスキームを描き、また、2008年10月17日にファイルされたUSSN \_\_\_\_\_で記述され、「Novel Chemistry used in Biosensors ( バイオセンサーにおいて用いる新しい化学 ) と題され、参照することによってここにはっきりとその全体において組み込む。

【図 2 4】FIG 24は捕獲リガンドを描く。

【図 2 5 A - B】図25A、B、CおよびDは、若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、例えばジスルフィド環状アンカー基のような異なるアンカー、または異なるスペーサーとともに構築することができる。

10

【図 2 5 C - D】上記と同様の図である。

【図 2 6 A - B】図26A、B、CおよびDは、EAMとしてフェロセンを用いる若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、例えばジスルフィド環状アンカー基のような異なるアンカー、または異なるスペーサーとともに構築することができる。

【図 2 6 C - D】上記と同様の図である。

【図 2 7】図27AおよびBは、若干の模範的な化合物を描く。似た化合物は、例えばジスルフィド環状アンカー基のような異なるアンカー、または異なるスペーサーとともに構築することができる。

20

【発明を実施するための形態】

【0020】

#### 発明の詳しい説明

本発明は、標的被分析物およびバイオセンサーの相互作用の際、観察された $E^0$ における変化によって証明されるように、再配置エネルギー、における変化に依存する電気化学的バイオセンサーの改善に向けられる。以前に示すように、再配置エネルギーにおける変化に依存するバイオセンサーが記述された。本発明は、シアノリガンドを電気活性部分 (EAMs) の遷移金属のために利用することのような驚くべき改善を示した。シアノリガンドは、 $E^0$ の変化における驚くべき増加を提供し、例では、 $E^0$ のデルタは、他の荷電されたりガンドについて見られるものよりも高い。

#### 1. 再配置エネルギーの概説

30

【0021】

本発明は、被分析物の結合の際、酸化還元活性分子の再配置エネルギーにおける変化を用いる標的被分析物の検出のための方法および組成物を提供し、酸化還元活性分子および電極の間で電子移動 (electron transfer) を容易にするか、または妨げる。この発明は、遷移金属イオンのような酸化還元活性分子が酸化される (電子を失う) か、または還元される (電子を得る) とき、変化が、分子構造において、ならびにその直近の溶媒 (immediate solvent) の環境において生じるという事実に基づく。分子構造 (結合長さおよび角度) での、そして分子を取り巻く溶媒分子の組織 (化) でのこれらの変化は、新しい酸化状態を力強く安定させるのにはたらく (serve)。これらの変化の合計は、酸化還元反応の再配置エネルギー、を構成する。分子内変化は内部の球状 (inner-sphere、内圏) 再配置エネルギー、と称され (termed)、そして溶媒および環境における変化は、外部の球状または溶媒再配置エネルギー、と称される。

40

【0022】

この発明の目的のために、第1の焦点 (primary focus) は溶媒の再配置エネルギーにおける変化上にあるが、内部の球状の再配置における変化は本発明のいくつかの具体例において考慮される。この発明の意図は、電気活性分子 (EAM) が、興味のある (例は、プロテイン (proteint) または細菌) 被分析物に選択的に結合することができる捕獲リガンド (CL) に付着されるとき、酸化還元反応の再配置エネルギーにおける変化を十分に利用する (capitalize on) ことである。EAM-CLを被分析物に対し結合させることは、EAMに関与する酸化還元反応のための再配置エネルギーが変化するように、EAMの溶媒環境にお

50

ける変化を招く。酸化還元反応が電極およびEAMの間で電子移動に関与する場合について、標準電位 ( $E^0$ ) は変化する。このように、EAM-CL複合体 (錯体) の  $E^0$  における変化は、それが被分析物 (analyte) に結合することの指標である。結合の指標としての  $E^0$  における変化、そして結果として、被分析物の存在または不存在を検出することが、この発明の意図である。

#### 【0023】

電子移動を使う、被分析物の検出のための慣習的な方法論において、通常、結合対の1つの構成員 (メンバー) (例は、抗体および抗原) に付着した (attached) ラベルまたはタグとしてEAMを採用する。これらの方法では、酸化または還元の際、最小の溶媒再配置を有する電気活性分子を用いることによって、EAMは外側の球状溶媒効果が最小であるように選ばれる。そのようなEAMsは一般に、水とほとんど相互作用をもたない大きな疎水性リガンドを含む。このように、伝統的に用いられる遷移金属イオンのためのリガンドは無 (非) 極性であり、そして概して、疎水性であり、しばしば有機環 (例は、ピピリジルおよびテルピリジル) を含む。全電子移動反応の大きさが予め定められた電極電位にて測られる (カレント (current)) ので、慣習上そのようなEAMsが選ばれる。

10

#### 【0024】

理論に束縛されることなく、この発明に最も適切な酸化還元分子は、酸化還元反応が水性環境における大きな溶媒再配置 (reorganization) エネルギーをもつものであると予想される。増加を安定させるか、または変化を減少させるための再配置は、いくつかの現象に起因することができる。水のような極性溶媒 (polar solvent such as water) において、酸化還元分子上の電荷は、酸化還元分子の近くの環境において極性溶媒の分子の方向性 (orientation) によって安定化される。極性分子が分子の異なる原子上にわずかな電荷変動 (パリエーション) しかもたないので、酸化還元分子の周りのそれらの方向性はそれを安定化させるのを助けることができる。さらに、 $CN^-$  のような若干のリガンドはそれら自体で、極性であり、そして原子上の部分的な電荷をもつ。これらの極性のリガンドはそれら自体で、溶媒分子を囲むことでの方向性を誘導することができる。荷電された酸化還元分子の安定化 (または不安定化) はまた、酸化還元分子における遷移金属のリガンドに対して溶媒および/または他の分子が付着する水素によって起こることができる。溶媒分子、ならびに酸化還元分子を囲む溶媒における他の分子は、それらのドナー数またはアクセプター数に基づいて特徴付け、そして比較することができる (Neyhart et al. (ネイハートら), J. Am. Chem. Soc (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ) 118 (1996年) 3724-29頁、参照することによってここに組み込む)。特定の溶媒の使用、または好ましいドナーまたはアクセプターの数をもつ分子の、溶媒への特定の添加剤の使用は、酸化還元反応の溶媒再配置エネルギーに影響を及ぼす。さらに、酸化還元分子の電荷における変化は、溶媒において荷電されたイオンによって安定化される。このように、被分析物の結合の際の溶媒再配置変化における変化は、電解質の適した選定によって最大化することができ、イオン上の電荷、イオンの濃度、イオンのサイズ (寸法) およびイオンの疎水性が考慮される。

20

30

#### 【0025】

理論に束縛されることなく、酸化還元分子の安定化を、一般に好まれる溶媒システムにおいて最大にすること (すなわち、その溶媒再配置エネルギーを最大にすること) が好ましく、それは酸化還元分子を安定化させる現象が、酸化還元分子/捕獲リガンド複合体、EAM-CLの被分析物に対する結合の際に妨げられるためである。そのような状況の下で、あるものは、 $E^0$  での変化によって証明される再配置エネルギーにおける変化が最適であると予想する。CLが被分析物に結合することは、溶媒環境の最適な組織化にはより一層有利でない、表面の上の環境中に、または被分析物 (例は、タンパク質) の裂け目またはポケット (cleft or pocket) 中に、EAMを「強制する」と予想される。1種の具体例において、結合は立体障害のため、EAMの近くで水分子の脱落を引き起こすと予想される。

40

#### 【0026】

溶媒再配置エネルギーが、結合の際に増加するか、または減少するかどうか (および  $E^0$

50

がより一層多くの正（ポジティブ）、またはより一層多くの負の電位にニフェするか（nives to）どうかは、EAMの特定の電荷に依存することに注目するべきであり、そして理論によって拘束されてはならない。モニター（監視）されているEAMの酸化還元反応が、EAM<sup>3+</sup>へのEAM<sup>2+</sup>の酸化のようなEAMの増加された（increaed）電荷を招く場合、EAM-CLの結合された環境は再配置によって結合されてないEAM-CLよりも安定化されない。それゆえに、あるものは、E<sup>0</sup>がより一層多くの正電位へ移ることを予想する。あるいはまた、モニターされているEAM酸化還元反応が、EAM<sup>-</sup>へのEAM<sup>2-</sup>の酸化のようなEAMの減少した電荷を招く場合、結合されてないEAM-CLは再配置によって結合されたEAM-CLよりも少なくともしか安定化されない。それゆえに、あるものはE<sup>0</sup>がより一層少ない正電位へ移ると予想される。

【0027】

10

理論に束縛されることはないが、本発明において活用されうる2つの一般的な機構（メカニズム）がある。第1のものは、酸化還元ラベルによる内側の球状変化に関する。この具体例では、標的被分析物を、立体的にEAMの近くにある捕獲リガンドに結合することは、EAMの、小さな極性のリガンドの1つまたはそれよりも多くを、標的被分析物によって供給される1つまたはそれよりも多くの調整原子によって置き換えられるようにし、少なくとも2つの理由のために、内部の球状再配置エネルギーにおける変化が引き起こされる。まず、推定的により一層大きなリガンドのための、小さな極性のリガンドの交換は、概して、より一層多くの水を金属から除外し、要求される溶媒再配置エネルギー（すなわち内部の球状効果）を下げる。第2に、比較的小さな酸化還元活性分子への概して大きな標的被分析物の接近は、金属イオンの第1または第2の配位圏（coordination sphere）内で水を立体的に除外し、また、溶媒再配置エネルギーが変化する。

20

【0028】

あるいはまた、本発明は、置換的に（substitutionally）不活性なリガンド、さらにプラスの外部の球状効果に依存する。この具体例において、標的分析物の調整原子によって、金属イオンの上での極性リガンドの交換がある。むしろ、この具体例において、極性のリガンドは、金属イオンに効果的に不可逆的に結合し、そして溶媒再配置エネルギーにおける変化（change）は、標的被分析物の結合の結果としての金属イオンの第1または第2の配位圏において水の排除の結果として得られ、本質的に、水は排除される（すなわち、外部の球状効果）。

【0029】

30

本発明は、新しい基本設計概念を有する化合物および標的被分析物の検出のためにこれらの化合物を用いる方法を提供する。

【0030】

若干の具体例において、標的被分析物は捕獲リガンドと結合する。若干の具体例において、標的被分析物は酵素であることができ、そしてE<sup>0</sup>における変化は酵素的な事象（enzymatic event）の結果として、米国特許出願第61/087094号に記述されるようなものであり、参照することによってここに、その全体において組み込む。

【0031】

本発明の具体例において、おそらく、標的被分析物の導入の際の再配置エネルギーの変化により、E<sup>0</sup>において変化がある。より一層十分に下記で議論するように、様々な因子に従って、変化はE<sup>0</sup>における正または負のシフト（転換）のいずれかでありうる。概して、シアノリガンドを用いるとき、E<sup>0</sup>における変化はE<sup>0</sup>における負のシフトであることができるが、用いられるシステムと他のリガンド（あるとすれば）に従い、標的被分析物と捕獲リガンドとの相互作用の効果はE<sup>0</sup>における正のシフトを招くことができる。驚くべきことに、約50mV、100mV、150mV、200mV、250mVおよび300mVよりも大きなシフトがシアノリガンドを用いて見ることができる。

40

【0032】

CN-は良好な求核試薬であり、そしてある例において、鉄-シアノ(-2)複合体は、-0.8767VのシアノのN上の部分的な電荷をもち、そして0.5549VのシアノのC上の部分的な電荷をもち、窒素上のその電荷数は非常に大きいため、孤立の1対の電子があるように作用すると

50

考えることができる。したがって、N上の部分的な負電荷は、水の陽子がNへと向かう（oriented toward）よう、水分子を並べる（その反対は、NH<sub>3</sub>リガンドにあてはまる）。窒素上の部分的な電荷が高いので、この局所（ローカル）配向効果は強く、そして従って、近くの水（標的捕獲の前に）および排除された水（標的捕獲の後）の間のデルタは高く、・ ・すなわち、2つの状態の間のラムダにおける違いは、量的により一層高い。

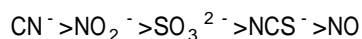
#### 【0033】

単座配位子CN<sup>-</sup>は常に、炭素を通して結合し、および（binds through the carbon and）したがって、大きな部分的な負電荷がN上に備わる（resides）。溶媒（水）へと向かう部分的な負電荷がより一層大きいほど、観察可能な効果はより一層大きくなる。そのように、リガンド上の部分的な負電荷を有するリガンドは、高い酸化状態の金属を安定化させ、そして水の方向性に対する強い影響をもつ。

10

#### 【0034】

CNは最良であり、それは、それがN上の最も高いネット（正味）電荷、およびしたがって、水の陽子との最も強い相互作用をもつからである。すなわち



NCS<sup>-</sup>はSCN<sup>-</sup>であるに等しい。

#### 【0035】

概して、金属中心がより一層正になるほど、金属の電位はより一層高い。したがって、すべての負電荷とまではいかないが、そのほとんどが水との相互作用によって中和されるとき、金属はより一層正になる。

20

### II. センサーのジオメトリー

#### 【0036】

本発明は、標的被分析物の検出のための方法および組成物に指向し、電極の表面上、または若干の場合において、溶液においてのいずれかで（ここでの大部分の説明は、固形相アッセイに指向される一方で、この技術における者によって理解されるように、本発明が同様に溶液において用いることができ、そしてここで、そのような説明は、溶液相のアッセイに対して同様に適用可能なように適用されることを意図され）、酸化還元活性分子の、電気化学的電位、E<sup>0</sup>の変化に基づく。

#### 【0037】

概して、本発明は次のように記述することができる。酸化還元活性分子は、通例、遷移金属および少なくとも1種のリガンドを含み（1種のシアノリガンドのようなもの（またはそれよりも多くの、ここに記述されるようなもの））、それらは、調整原子を遷移金属のために提供し、ここに記述するようにリンカーを通して、概して電極の表面に付着される。そのうえ、ここに記述するように、電極はまた、自己組織化単分子層（SAM）を任意に含むことができる。酸化還元活性分子の空間付近（spatial vicinity）では、ここに記述するように、概して3つの方向のうちの1つに捕獲リガンドが付着される。標的被分析物の導入および/または結合は、酸化還元活性分子の電気化学的電位における変化を招き、次にそれがここに記述されるように、様々なやり方で検出される。

30

#### 【0038】

図12-14において描くように、3つの基本的なジオメトリーがセンサーのために存在するが、ここでの説明はそのように制限されるのを意図しない。1種の具体例において、図12Aで示すように、電気活性部分（EAM）は、遷移金属イオンおよびリガンドを含み、それらのリガンドは調整原子を遷移金属のために提供し（若干の具体例において、少なくとも1種はシアノリガンドであり）、電極に付着される。そのうえ、特異的に標的被分析物を結合する捕獲リガンド（時々また、「結合性リガンド」と称される）は電極に付着される。ここに記述するように、双方の種は概して、付着リンカーを用いて電極に付着される。EAMのE<sup>0</sup>が標的被分析物の結合の際、変えられるように、2つの種はそれらが空間的に近くであるようにして電極に付着される。第3の種が、単分子層形成性種を含み、以下に記載されるが、電極の上で任意に存在することもできることに留意する必要がある。この具体例では、EAMの種は式（1a）を有することができ、捕獲リガンドの種は式（1b）を有するこ

40

50

とができ、そして希釈剤の種は式(1c)を有することができる。すなわち

AG - スペーサー1 - EAM (1a)

AG - スペーサー1 - CL (1b)

AG - スペーサー1 - TG<sub>n</sub> (1c)

式中、AGはアンカー基であり、EAMは、電気活性部分であり、溶媒接触可能(solvent accessible)酸化還元複合体を含み、スペーサー1はここに記述するSAM形成性種であり、CLは捕獲リガンドであり、そしてTGは終端基(terminal group)であり、0または1であるnを有する。

【0039】

第2の具体例において、図\*XBにおいて描かれるように、EAMの遷移金属のための調整原子のうちの1つは捕獲リガンドによって提供され、「酸化還元活性部分複合体」、すなわちReAMCが形成される。この具体例では、調整原子は、実際は、捕獲リガンドの一部であり(例は、捕獲リガンドがペプチドである場合、アミノ基は調整原子を提供することができる)、または捕獲リガンドに付着するのに用いるリンカーの一部(例は、ピリジンリンカー、等)であることができる。ReAMCは単一の種として付着され、そして上記のように、追加的な種は、単分子層形成性種を含み、以下に記述されるが、また電極上で任意に存在することもできる。この具体例では、本発明は、式(II)を有する化合物を提供する。すなわち

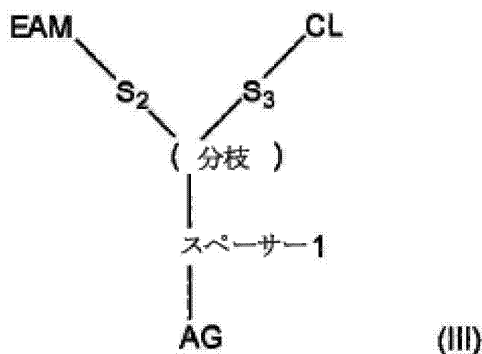
AG - スペーサー1 - EAM - (スペーサー2)<sub>n</sub> - CL (II)

式中、AGはアンカー基であり、EAMは電気活性部分であり、溶媒接触性酸化還元複合体を含み、CLは捕獲リガンドであり、スペーサー1はここに記述するSAM形成性種であり、そしてスペーサー2はリンカーであり、n=0または1を有する。

【0040】

第3の具体例において、図12Cにおいて描かれるように、そこで、ReAMCは単一の種であり、しかし、捕獲リガンドは調整原子を提供せず、むしろ、それは空間的に近いが、ReAMCのEAMとは区別される。再度、第3の種は、単分子層形成性種を含み、以下に記述されるが、また電極上で任意に存在することもできる。この具体例では、本発明は、式(III)を有する化合物を提供する。すなわち

【化1】

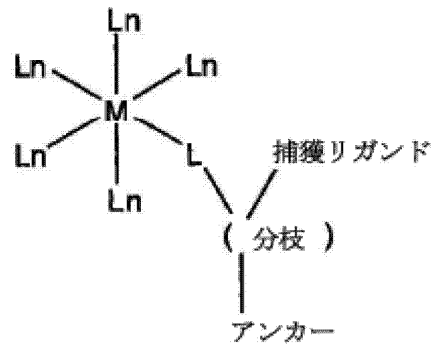


式中、AGはアンカー基であり、EAMは電気活性部分であり、溶媒接触可能酸化還元複合体を含み、CLは捕獲リガンドであり、スペーサー1はここに記述するSAM形成性種であり、そしてS<sub>2</sub>およびS<sub>3</sub>は、分枝した構造を形成するために、EAMおよびCLを一緒にAGと連結する2つのリンケージ(連関)である。S<sub>2</sub>およびS<sub>3</sub>は、異なるか、または同じであることができる。

【0041】

この立体配置の1種の例を、下に示す。すなわち

## 【化 2】



10

式中、M=遷移性金属 (transitional metal)、Ln=アンカーおよび捕獲リガンドに共有結合的に接続する調整性リガンド (coordinating ligand)、n=0または1、およびL=調整性リガンドである。

## III. 電極

20

## 【0042】

1種の局面において、本発明は、電極に付着されるこれらのリガンドの基本設計概念を提供する。ここでの「電極」は組成物を意味し、そしてそれは、電子装置につながれるとき、流れ (電流) または電荷を感知し、および信号に変換することができる。好適な電極はこの技術において既知であり、そして制限されないが、一定の金属およびそれらの酸化物で、金、プラチナ (白金)、パラジウム、シリコン、アルミニウム; 酸化プラチナ、酸化チタン、酸化スズ、酸化インジウムスズ、酸化パラジウム、シリコン酸化物、酸化アルミニウム、モリブデン酸化物 ( $\text{Mo}_2\text{O}_6$ )、タングステン酸化物 ( $\text{WO}_3$ ) およびルテニウム酸化物を含む金属酸化物電極; そして炭素 [ ガラス状炭素 (グラッシーカーボン) 電極、黒鉛およびカーボンペーストが含まれる ] が含まれるものを含む。好適な電極は、金、シリコン、炭素および金属酸化物の電極を含み、特に好ましくは金である。

30

## 【0043】

ここに記述する電極は平面として描かれ、それは電極のとりうる立体配置のうちのわずかに1種であり、概略的目的のためだけである。電極の立体配置は、用いる検出方法とともに (With) 変動する。例えば、平らな平坦電極は、光学的検出方法のために好適でありえ、または核酸のアレイ (配列体) が作成されるとき、このようにして、合成および検出の双方のための接近可能な (アドレス指定可能な) 場所 (ロケーション) が要求される。あるいはまた、単一のプローブ分析のために、電極は、SAMs、EAMsおよび内側表面に結合する捕獲リガンドのようなシステムの構成要素を伴い、チューブの形態であってよい。これは、小容量の試料に曝される核酸を含む表面積の最大値を許す。

40

## 【0044】

本発明での電極は、概して、バイオチップカートリッジ中に組み込まれ、そして多種多様な立体配置を採ることができ、そして作用 (working) および参照の電極、相互接続 (「ボードを通しての (through board)」相互接続を含む)、およびマイクロ (微小) 流体の構成要素 (microfluidic components) を含むことができる。例えば、米国特許第7,312,087号を参照し、参照することによってここでその全体としてそのまま組み込む。

## 【0045】

バイオチップカートリッジは、生体分子のアレイが含まれる基材を含み、そして様々なやり方において構成することができる。例えば、チップは、試薬の導入および除去のために入口および出口を有する反応チャンパー (室) を含むことができる。そのうえ、カートリッジは、試料を導入し、試薬を加え、反応を行うことができるように、そして次いで試

50

料が、検出のためにアレイを含む反応室に加えられるように、マイクロ流体の構成要素をもつキャップまたはふたを含むことができる。

【0046】

好適例において、バイオチップは複数のアレイの場所を有する基材が含まれる。「基材（サブストレート）」または「固形支持体」または他の文法上の同等物によって、ここでは、捕獲リガンドの付着または関連（association）で適当な別個の個々の部位を含むために修飾することができる任意の材料（物質）をも意味する。適切な基材は、金のような金属表面、以下に規定する、ガラス、および修飾されたガラスまたは官能基化されたガラス、ファイバークラス、テフロン（登録商標）、セラミックス、マイカ（雲母）、プラスチック（アクリル、ポリスチレン、およびスチレンおよび他の物質の共重合体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリウレタン、Teflon<sup>TM</sup> [テフロン（商標）] およびその誘導体、等を含む）、GETEK（ポリプロピレンオキシドおよびファイバークラスのブレンド）、等、多糖類、ナイロンまたはニトロセルロース、樹脂、シリカ（二酸化ケイ素）、またはシリコンおよび修飾されたシリコンを含むシリカに基づく物質、炭素、金属、無機ガラスおよび様々なポリマーが含まれ、プリント回路基板（PCB）材料が特に好まれる。

10

【0047】

本システムは、特定の有用性をアレイ形式（フォーマット）において見出され、すなわちそこで、アドレス指定可能な検出電極のマトリクスが存在する（ここでは概して、「パッド」、「アドレス」または「マイクロロケーション（場所）」と称する）。ここでは、「アレイ」によって、アレイ形式の複数の捕獲リガンドが意味され、アレイのサイズは、アレイの組成および最終用途に依存する。約2から何千までも異なる捕獲基材が含まれるアレイを作成することができる。

20

【0048】

好適例において、検出電極は基材上で形成される。そのうえ、ここでの議論は概して、金の電極の使用に向けられるが、この技術における者によって理解されるように、他の電極を同様に用いることができる。ここに、および引用する参考文献において概説されるように、基材は多種多様な物質を含むことができる。

【0049】

概して、好適な物質には、プリント回路基板材料が含まれる。回路基板材料は、電極のパターンを形成し、そして相互接続するために、伝導性（導電）層で被覆され、そしてリソグラフィ（石版印刷）技術、特にフォトリソグラフィ技術を用いて加工される絶縁性基材を含むものである（時々この技術において、相互接続またはリードとして言及される）。絶縁性基材は概して、常にではないが、重合体である。この技術において既知であるように、1つまたは複数の層は、「二次元の」（例は、すべての電極および相互接続が平面）または「三次元の」（ここでは電極は1つの表面にあり、そして相互接続はボード（基板）を他の側に通じ抜けることができ、またはここでは電極が複数の表面上にある）いずれかの基板を形成するために用いられうる。三次元システムはしばしば、ドリルあけ（穿孔）またはエッチングの使用に頼り、そして「基板を通しての」相互接続が作成されるように、次いで銅のような金属での電気めっきが続く。回路基板材料は、すでに基材に付着した、銅箔のようなホイルを、必要に応じて添加された追加の銅とともに（例えば相互接続のために）、例えば、電気めっきによって備わることが多い。銅の表面は、次いで、例えば、接着層の付着を許すために、例えば、エッチングを通して、粗化される必要があるかもしれない。

30

40

【0050】

したがって、好適例において、本発明は、複数の電極、好ましくは、金の電極が含まれる基材を含むバイオチップ（時々「チップ」と称する）を提供する。電極の数は、アレイのために概説されるようなものである。ここに概説されるように、各々の電極は好ましくは自己組織化単分子層を含む。好適例において、ここに概説されるように、単分子層形成性種のうちの1種には、捕獲リガンドが含まれる。そのうえ、各々の電極は、相互接続を

50



もち、それは、一端部にて電極に付着され、そして電極を制御することができる装置に最終的に付着される。つまり、各々の電極は、独立してアドレス指定可能である。

【0051】

最後に、本発明での組成物は、マイクロ流体の構成要素およびロボットの構成要素（例えば、米国特許第6,942,771号および第7,312,087号明細書および関連したケースを参照し、その双方を参照することによってここに全体としてそのまま組み込む）を含む多種多様な追加的構成要素、およびコンピュータを利用する（computers utilizing）信号処理技術を含む検出システム（例えば、米国特許第6,740,518号明細書を参照し、参照することによってここにその全体としてそのまま組み込む）を含むことができる。

A. 自己組織化単分子層スパーサー

【0052】

若干の具体例において、電極は任意にさらにSAMを含む。「単分子層」または「自己組織化単分子層」または「SAM」によって、ここでは、表面上で自発的に化学吸着される分子の比較的整えられた（ordered）アセンブリが意味され、そこでは、分子が互いにおよそ平行して、そして表面に対して大体直角に方向付けられる（oriented）。分子の各々は、表面に接着する官能基を含み、そしてそのある部分は比較的整えられたアレイを形成するために単分子層において隣接分子と相互作用する。つまり、「混合された」単分子層は異質な単分子層を含み、すなわち、少なくとも2つの異なる分子が単分子層を作り上げる。ここに概説されるように、単分子層の使用は、その表面に対する生体分子の非特異性の結合の量を減らし、そして核酸の場合には、電極からのオリゴヌクレオチドの距離の結果としてオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションの効率を上昇させる。このように、単分子層は、電極面から離れて標的酵素の維持（メンテナンス）を容易にする。そのうえ、単分子層は、電荷担体を電極の表面から遠ざけて保つのに役立つ。このように、この層は、電極およびReAMsの間、または電極および溶媒の範囲内の荷電種の間で電気的接触を防止するのを助ける。そのような接触は、試料において存在しうる荷電種を介した、直接的な「短絡」または間接的な短絡を招くことがある。したがって、単分子層は好ましくは電極表面上の均一な層において、最低限の「ホール（穴）」が存在するように、きつく詰められる（tightly packed）。単分子層は、このように、電極への溶媒の可触性（accessibility）を妨げる物理的なバリア（障壁）としてはたらく。

【0053】

若干の具体例において、単分子層は伝導性のオリゴマーを含む。ここにおいて、「伝導性のオリゴマー」によって、実質伝導性（導電性）オリゴマー、好ましくは、直線状を意味し、その若干の具体例は「分子ワイヤー」として文献に言及される。ここでは、「実質伝導性」によって、オリゴマーが100Hzにて電子を移動（transferring）することができることを意味する。概して、伝導性のオリゴマーは、実質重なり合う  $\pi$ -軌道、すなわち、伝導性のオリゴマーのモノマー単位の間でのように共役した  $\pi$ -軌道をもつけれども、伝導性オリゴマーはまた、1種またはそれよりも多くのシグマ（ $\sigma$ ）結合も含むかもしれない。加えて、伝導性のオリゴマーは、関係するEAM中にか、またはそれから電子を注入し、または受け取るためのその能力によって機能的に規定されうる。さらにまた伝導性のオリゴマーは、ここに規定されるように、絶縁体よりも伝導性である。加えて、本発明での伝導性のオリゴマーは、電気活性ポリマーから区別され、それらは自身で電子を供与するか、または受け入れうる。

【0054】

伝導性のオリゴマーのより一層詳細な説明は、国際公開（WO）第1/1999/57317号において見出され、参照することによってここに全体としてそのまま組み込む。とりわけ、WO/1999/57317の第14から21頁までの構造1から9までで示す伝導性のオリゴマーは、本発明においての使用が見出される。若干の具体例において、伝導性のオリゴマーは、以下の構造を有する。すなわち

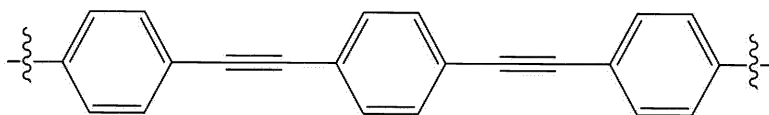
10

20

30

40

## 【化 3】



## 【 0 0 5 5 】

そのうえ、単分子層での伝導性オリゴマーの少なくとも若干の終端は、電子的に露出する。「電子的に露出する」によって、ここでは、終端に近接近するEAMの設置 (placement) の際、および適した信号による開始の後、EAMの存在に依存する信号が検出されうることが意味される。伝導性のオリゴマーは、終端基をもつか、またはそうでなくてよい。このように、好適例において、追加の終端基がなく、そして伝導性のオリゴマーは、例えば、アセチレン結合のような終端基を伴って終る。あるいはまた、若干の具体例において、終端基が加えられ、時々ここでは「Q」として描かれる。終端基は、種々の理由のために用いることができ、例えば、EAMsの検出のために伝導性のオリゴマーの電子的な利用可能性に貢献すること、または他の理由のため、例えば、非特異的な結合を防ぐために、SAMの表面を変えることがある。例えば、負に荷電された基は、標的被分析物がDNAまたはRNAのような核酸であるとき、核酸がはじかれ (repelled)、または表面上で横になるのを防止し、ハイブリダイゼーションを容易にするように、負に荷電された表面を形成するために終端上に存在しう。好適な終端基は、 $-NH$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、および $-CH_3$ のようなアルキル基、および (ポリ) エチレングリコールのような (ポリ) アルキルオキサイドを含み、 $-OCH_2CH_2OH$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_2H$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_3H$ 、および $-(OCH_2CH_2O)_4H$ が好ましい。

## 【 0 0 5 6 】

1種の具体例において、異なる種類の終端基とともに伝導性のオリゴマーの混合物を用いることが可能である。このように、例えば、終端基の若干は検出を容易にしえ、そして若干は非特異的な結合を防ぎうる。

## 【 0 0 5 7 】

若干の具体例において、電極は不動態化薬剤をさらに含み、好ましくは、電極表面上の単分子層の形態である。若干の被分析物のために、結合性リガンドが電極から少し離れているとき、被分析物の結合性 (すなわち、ハイブリダイゼーション) の効率は増加しうる。そのうえ、単分子層の存在は、表面への非特異的な結合を減少させることができる (それは終端基の使用によって、ここに概説されるように、さらに容易にすることができる)。不動態化薬剤の層は、電極の表面から離れた結合性リガンドおよび/または被分析物の維持を容易にする。そのうえ、不動態化薬剤は、電荷担体を電極の表面から遠ざけて保つのに役立つ。このように、この層は、電極および電子移動部分の間で、または電極および溶媒の範囲内の荷電種の間での電気的接触を防止するのを助ける。そのような接触は、試料において存在することがある荷電された種を介して、直接的な「短絡」または間接的な短絡を招くことがある。したがって、不動態化薬剤の単分子層は、電極表面上の均一な層において、最低限の「穴」が存在するように、好ましくはきつく詰められる。あるいはまた、不動態化薬剤は単分子層の形態でなくてよいが、伝導性のオリゴマーの詰め込みまたは他の特徴を助けるために存在してよい。

## 【 0 0 5 8 】

不動態化薬剤 (passivation agent) は、このように、電極に対する溶媒接触性をブロック (阻止) する物理的なバリアとしてはたらく。そのように、不動態化薬剤はそれ自身、実際に(1)伝導性、または(2)不伝導性、すなわち絶縁性の、分子のいずれかでありうる。このように、1種の具体例において、不動態化薬剤は、ここに記述されるように、電極に対する電荷の移動を阻止し、または減少させるために、終端基を伴い、または伴わない伝導性のオリゴマーである。伝導性でありうる他の不動態化薬剤には、 $-(CF_2)_n-$ 、 $-(CHF)_n-$ 、および $-(CFR)_n-$ が含まれうる。好適例において、不動態化薬剤は絶縁体部分である。

## 【 0 0 5 9 】

若干の具体例において、単分子層は絶縁体を含む。「絶縁体」は、実質不伝導性のオリゴマー、好ましくは、直線状である。「実質不伝導性の」によって、ここでは、絶縁体を

通しての電子移動の速度が、伝導性のオリゴマーを通しての電子移動の速度よりも遅いことを意味される。換言すると、絶縁体の電気抵抗は、伝導性のオリゴマーの電気抵抗よりも高い。しかし、 $-(CH_2)_{16}$ 分子のように、概して絶縁体であると考えられるオリゴマーさえ、遅い速度であるが、まだ電子を移動させうることに注目すべきである。

#### 【0060】

若干の具体例において、絶縁体は約 $10^{-7}$   $-1\text{cm}^{-1}$ またはそれよりも低い伝導性、Sを持ち、約 $10^{-8}$   $-1\text{cm}^{-1}$ 未満が好ましい、または、Gardner (ガードナー)ら、Sensors and Actuators (センサー・アンド・アクチュエーター) A 51 (1995) 57-66を、参照することによってここに組み込む。

#### 【0061】

概して、絶縁体は、アルキルまたはヘテロアルキルオリゴマーまたはシグマ結合を有する部分であるが、任意の特定の絶縁体分子も芳香族基または1つまたはそれよりも多くの共役された結合を含みうる。ここで、「ヘテロアルキル」によって、少なくとも1つのヘテロ原子、すなわち、鎖に含まれる窒素、酸素、硫黄、リン、シリコンまたはホウ素を有するアルキル基が意味される。あるいはまた、絶縁体は、1つまたはそれよりも多くのヘテロ原子の付加を有する伝導性のオリゴマーと全く類似してよく、それは、電子移動を、好ましくは大幅に抑制するか、または遅くするのにはたらく。好ましくは、アルキルまたはヘテロアルキルの鎖は長さで約4から約18個の原子まであり、そしてより一層好ましくは、長さで約6から約16個までの原子である /

#### 【0062】

不動態化薬剤は、絶縁体を含め、ここで規定するように、電極上の、部分または伝導性のオリゴマーの詰め込み、絶縁体の親水性または疎水性、および可とう性（柔軟性）、すなわち、絶縁体の回転による、ねじれによる、または長さ方向の可とう性を変えるためにR基で置換されうる。例えば、分枝したアルキル基を用いる。そのうえ、不動態化薬剤の末端は、絶縁体を含め、単分子層の露出された表面に影響を与えるために、追加の基を含むことができ、時々ここでは末端基（「TG」）と称する。例えば、荷電されたか、中性の、または疎水性の基の付加は、試料からの非特異的結合を抑制するか、または被分析物、その他の結合の動力学に影響を及ぼすために行ってよい。例えば、末端上に荷電された基があってよく、それは荷電された表面を形成し、一定の標的被分析物の結合を促す（encourage）か、または妨げる（discourage）か、表面上で横たわるのに反発し、または防

#### 【0063】

不動態化薬剤の長さは、必要に応じて変動する。概して、上記で概説するように、不動態化薬剤の長さは伝導性のオリゴマーの長さと同じ長さ、またはそれらよりも長い長さであることができ、溶媒に対してより一層接触可能（アクセス可能）な結合性リガンドを招く。

#### 【0064】

単分子層は、絶縁体を含む、不動態化薬剤の単一の種類、または異なる種類を含みうる。

#### 【0065】

適切な絶縁体は、この技術で既知であり、そして制限されないが、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CRH)_n-$ 、および $-(CR_2)_n-$ 、エチレングリコールまたは酸素の代わりに他のヘテロ原子、すなわち、窒素またはイオウ（イオウ誘導体は電極が金であるとき、好まれない）を用いる誘導体が含まれる。好ましくは、絶縁体は、金への付着のためのチオールまたはジスルフィド末端を有する形態 $-(CH_2)_n-$ である。また好ましくは、絶縁体の代替端部（alternative end）は、親水性（hydrophilic）基で、オリゴエチレングリコール、 $-OH$ 、または $-COOH$ で終わる。

#### 【0066】

若干の具体例において、電極は金属表面であり、および電気化学が行われる相互接続またはその能力をもつことは必ずしも必要でない。

10

20

30

40

50

## B. アンカー基

## 【0067】

本発明は、アンカー基を含む化合物を提供する。「アンカー」または「アンカー基」によって、ここでは、本発明の化合物を電極に付着する化学基が意味される。

## 【0068】

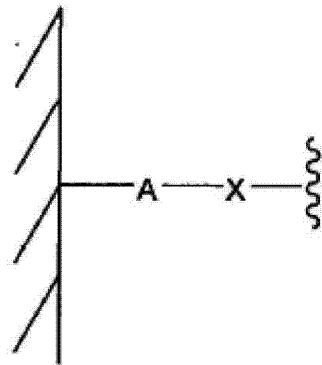
この技術における者によって理解されるように、アンカー基の組成は、それが付着する表面の組成に依存して異なる。金電極の場合、ピリジニルアンカー基およびチオールに基づくアンカー基は、特定の使用を見出す。

## 【0069】

伝導性のオリゴマーの共有結合的な付着は様々なやり方で成し遂げることができ、電極および使われる伝導性のオリゴマーに依存する。概して、若干のリンカーの種類が、以下に「A」として構造1において描かれるように用いられ、そこでは、Xは伝導性のオリゴマーであり、そして斜線の表面は電極である。すなわち

## 【化4】

構造1



## 【0070】

この具体例において、Aはリンカーまたは原子である。「A」の選択 (choice of) はある程度で電極の特徴に依存する。このように、例えば、Aは、金電極を用いるとき、イオウ部分でありうる。あるいはまた、金属酸化物電極を用いるとき、Aは、酸化物の酸素に付着されたシリコン (シラン) 部分でありうる (例えば、Chen (チェン) ら、Langmuir (ラングミュア) 10:3332-3337 (1994年); Lenhard (レーンハード) ら、J. Electroanal. Chem. (ジャーナル・オブ・エレクトロアナリティカル・ケミストリー) 78:195-201(1977年)を参照し、参照することによってそれらの双方を明示的に (expressly) 組み込む)。カーボンに基づく電極を用いるとき、Aはアミノ部分であることができ (好ましくは、1級アミン、例えば、Deinhammer (ダインハンマー) ら、Langmuir 10:1306-1313 (1994))。このように、好ましいA部分には、制限されないが、シラン部分、イオウ部分 (アルキルイオウ部分を含む)、およびアミノ部分が含まれる。

## 【0071】

若干の具体例において、電極はカーボン電極、すなわち、ガラス状のカーボン電極であり、そして付着は、アミン基の窒素を介してである。代表的な構造は米国特許出願公開第20080248592号の構造15で描かれ、ここに参照することによってその全体についてそのまま組み込むが、しかし、特にそこで記述されるような構造および異なるアンカー基の記載および付随するテキストについては別である。再度、追加的な原子は存在しえ、すなわち、リンカーおよび/または終端基である。

## 【0072】

米国特許出願公開第20080248592号の構造16は、上記のように参照によってここに組み込まれ、酸素原子は、金属酸化物電極の酸化物からのものである。Si原子はまた、他の原

子も含んでよく、すなわち、置換基を含むシリコン部分である。他の電極へのSAMの、他の付着は、この技術において既知であり、例えば、Napier (ネイピア) ら、Langmuir、1997を参照し、インジウムスズ酸化物電極に対する付着、およびまたインジウムスズ酸化物電極へのリン酸塩の化学吸着である (H. Holden Thorpe (ホールデン・ソープ)、CHI conference (CHIコンフェレンス)、1998年5月4~5日までのものはなし)。

【0073】

1種の好適例において、インジウムスズ酸化物 (ITO) が電極として用いられ、そしてアンカー基はホスホン酸塩含有種である。

1). ピリジニルアンカー基

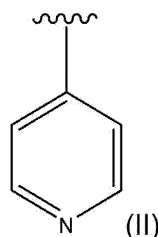
【0074】

1種の局面において、本発明は、ピリジンおよびその誘導体の使用を、本発明での化合物を表面に付着させるために提供する。

【0075】

若干の具体例において、アンカーはピリジル基を含み、式(II)の構造を有する。すなわち

【化5】



式中、ここに規定されるように、環上の炭素がR基を用いて任意に、そして無関係に置換することができる。ピリジンは、ベンゼンに構造的に関連する複素環芳香族の有機化合物であり、そこでは、6員環における1種のCH基が窒素原子と置き換えられる。ピリジンは、錯体化学におけるリガンドとして用いることができる。リガンドとして、それは通常「py」と略される。本発明はピリジンの窒素原子の上で、金属表面と結合する孤立電子対の能力を利用する。ピリジンに基づく化合物の1種の利益は、それらが空気安定性 (air stable) なことである。Curtis (カーティス) ら、Inorg. Chem. (インオルガニック・ケミストリー) 24:385-397(1985年); Callahan (キャラハン) ら、Inorg. Chem. 14:1443-1453 (1975); Lavalley (ラヴァリイ) およびFleischer (フライシャー)、J. Am. Chem. Soc. (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー) 94:2583-2599 (1972年); およびJwo (ジウー) ら、J. Am. Chem. Soc. 101:6189-6197 (1979)を、参照することによってそのすべてを組み込む。

【0076】

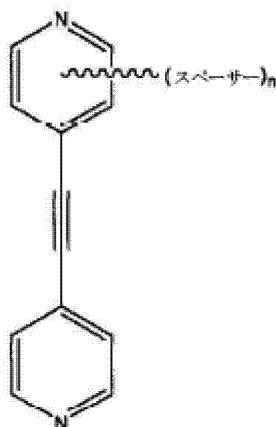
若干の具体例において、ピリジル基はビピリジル基 (ビスピリジルアセチレン、BPA) を含み、アセチレン基によって分けられる、下で示す2つのピリジル基を含む。すなわち

10

20

30

## 【化 6】



10

この具体例では、ここに規定されるように、どちらの環上の炭素でも、任意におよび無関係に、R基を用いて置換することができる。ここに規定されるように、環のうちの1種はスペーサーへの連結を含み、または、図の若干において示すように、ピリジル基に対して付着する1種よりも多くのスペーサーがありうる（例えば、 $n=1$ またはそれよりも多い、2つは若干の具体例において特定の使用を見出す）。

2). イオウアンカー基

20

## 【0077】

構造1において単一部分として描く、伝導性のオリゴマーは、1種よりも多くの「A」部分を有する電極に付着されうるが、「A」部分は同じか、または異なることができる。このようにして、例えば、電極が金電極であり、そして「A」がイオウ原子または部分であるとき、複数のイオウ原子は、伝導性のオリゴマーを電極に付着するのに、概して、構造2、3および4で下に描くように用いることができる。この技術における者によって理解されるように、他のそのような構造を作成することができる。構造2、3および4において、A部分はまさにイオウ原子であるが、置換されたイオウ部分もまた用いる。

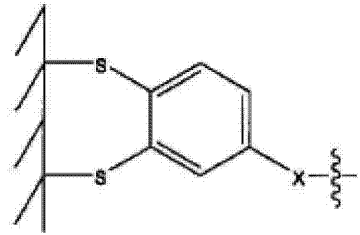
## 【0078】

30

このように、例えば、電極が金電極であり、そして「A」が概して、構造6で下に描かれるように、イオウ原子、または部分であるとき、複数のイオウ原子は、伝導性のオリゴマーを電極に付着するのに、概して、構造2、3および4において下に描くように用いる。この技術における者によって理解されるように、他のそのような構造を作成することができる。構造2、3および4において、A部分はまさにイオウ原子であるが、置換されたイオウ部分も用いる。

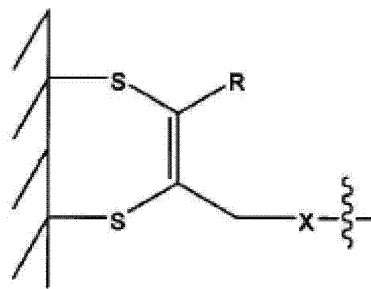
## 【化 7】

構造2



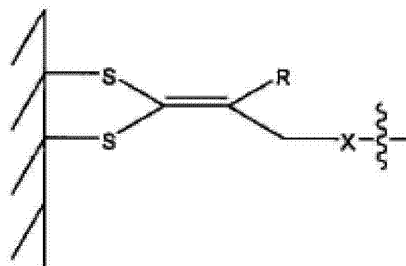
10

構造3



20

構造4



30

## 【0079】

また、構造4に似て、電極に付着された3つのイオウ部分を有する単一の炭素原子において終結する伝導性のオリゴマーを持つことが可能でありうることに注目すべきである。

## 【0080】

別の局面では、本発明は、共役されたチオールを含むアンカーを提供する。共役されたチオールアンカーを有する若干の模範的な複合体を、図4において示す。若干の具体例において、アンカーは、アルキルチオール基を含む。若干の例は、図4Aおよび4Bに示される。図4Bにおいて描く2つの化合物は、それぞれ、カルベンおよび4-ピリジルアラニンに基づく。

40

## 【0081】

別の局面では、本発明は、金電極のような電極上での被分析物検出のために電気活性部分の構築においてアンカー性基としてはたらく共役された多足性のチオ含有性の化合物を提供する。つまり、スパーサー基は（それは、EAMs、ReAMCs、または「空の」単分子層形成性種に付着することができ）、2つまたはそれよりも多くのイオウ原子を用いて付着さ

50

れる。ここに記載するように、これらの多足性のアンカー基は線状または環状であることができる。

【0082】

若干の具体例において、アンカー基は「二足性」であり、金の表面に付着する2つのイオウ原子を含み、そして線状であるが、若干の場合には、他の多足性を有するシステムを含むことは可能でありうる（例は「三足性（tripodal）」）。そのような多足性のアンカー基は増加した安定性を表示し、および/または立体的に要求される頭部基（headgroup）を有するチオール含有のアンカーからSAMを調製するためのより一層大きな足跡（footprint）を許容する。

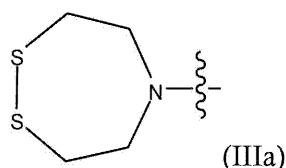
【0083】

若干の具体例において、アンカーは環状ジスルフィド（「二足（bipod）」）を含む。若干の場合において、他の多足性を有する環システムのアンカー基を含むことが可能でありうる（例は「三足性」）。以下に議論するように、環の原子の数は、例えば、5から10まで変動することができ、そしてまた多環式（multicyclic）アンカー基を含む。

【0084】

若干の具体例において、アンカー基は、頂点窒素原子（apex nitrogen atom）および以下に示すように、分子内ジスルフィド結合を有する7員環である[1,2,5]-ジチアゼパン（dithiazepane）単位を含む。すなわち

【化8】



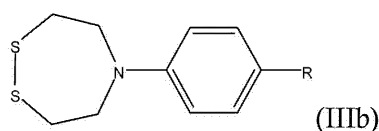
【0085】

構造（IIIa）において、また、リングの炭素原子を追加的に置換することができることは注目すべきである。この技術における者によって理解されるように、他の員環もまた含まれる。そのうえ、多環式環構造を用いることができ、それは環状ヘテロアルカンで、他の環状アルカン（環状ヘテロアルカン類を含む）または芳香環構造で置換された上記に示す[1,2,5]-ジチアゼパンのようなものを含むことができる。

【0086】

若干の具体例において、アンカー基およびスペーサーの一部は、以下に示す構造を有する。

【化9】



【0087】

ここでの「R」基は、EAMの遷移金属構成要素のために終端調整性リガンドを伴う共役されたオリゴフェニルエチニレン単位を含む、任意の置換基であることができる。

【0088】

アンカーは、二足性の中間体（I）（式IIIとしての化合物、式中R=I）から合成され、それはLi（リー）ら、Org. Lett.（オルガニック・レターズ）4：3631-3634(2002年)において記述され、参照することによってここに組み込む。また、Wei（ウェイ）ら、J. Org. Chem.（ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー）69：1461-1469(2004年)を参照し、ここで参照することによって組み込む。

【0089】

イオウ原子の数は、ここに概説されるように、スペーサーあたり、1つ、2つ、および3つを利用する特定の具体例と共に変動することができる。



### C. 電気活性部分

#### 【0090】

アンカー基に加え、本発明は、電気活性部分を含む化合物を提供する。「電気活性部分 (EAM)」または「遷移金属複合体」または「酸化還元活性分子」または「電子移動部分 (ETM)」によって、ここでは、可逆的に、または半可逆的に1つまたはそれよりも多くの電子を移動させることが可能な金属含有の化合物が意味される。電子のドナーおよびアクセプターの能力が関連することを理解すべきであり、つまり、一定の実験的な状況の下で電子を失うことができる分子は、異なる実験的な状況の下で電子を受け入れることができる。

#### 【0091】

可能性がある遷移金属複合体の数が非常に多いこと、および電子移動化合物の技術における熟練した者は本発明において多数の化合物を利用することができることを理解すべきである。ここで、「遷移性金属」によって、金属の原子が電子の一部分または完成されたシェルをもつ金属が意味される。本発明において用いるための適切な遷移金属には、制限されないが、カドミウム (Cd)、銅 (Cu)、コバルト (Co)、パラジウム (Pd)、亜鉛 (Zn)、鉄 (Fe)、ルテニウム (Ru)、ロジウム (Rh)、オスミウム (Os)、レニウム (Re)、白金 (platinum) (Pt)、スカンジウム (Sc)、チタン (Ti)、バナジウム (V)、クロミウム (Cr)、マンガン (Mn)、ニッケル (Ni)、モリブデン (Mo)、テクネチウム (Tc)、タングステン (W)、およびイリジウム (Ir) が含まれる。つまり、第1の一連の遷移金属、白金族の金属 (Ru、Rh、Pd、Os、IrおよびPt) は、Fe、Re、W、MoおよびTcと同様に (along with)、特定の使用を本発明において見出す。特に好ましいものは、ルテニウム、オスミウム、鉄、白金 (platinum) およびパラジウムが含まれ、酸化状態における変化による調整部位の数を変化させない金属であり、オスミウム、ルテニウムおよび鉄が特に好ましく、そしてオスミウムは、多くの具体例において特定の使用が見出される。若干の具体例において、鉄は好ましくない。概して、遷移金属はTMまたはMとしてここに描く。

#### 【0092】

遷移性金属および調整性リガンドは金属複合体を形成する。「リガンド」または「調整性リガンド」(「L」としてここで図において描かれる)によって、ここで、原子、イオン、分子、または概して、その電子の1つまたはそれよりも多くを、配位共有結合を通して、1つまたはそれよりも多くの中心原子またはイオンへの共有結合を通して寄付するか、それとの共有結合を通してその電子を共有する官能基が意味される。

#### 【0093】

金属の他の調整部位を、捕獲リガンドに (直接または間接的に、リンカーを使う) か、あるいは、電極に (より一層十分に以下に記載するように、スペーサーを多用し) か、双方に対する遷移金属複合体の付着のために用いる。このように、例えば、遷移金属複合体が結合性リガンドに直接的に取り付けられる (joined) と、金属イオンの調整部位の1つ、2つまたはそれよりも多くが、結合性リガンドによって (または間接的に取り付けられる場合、リンカーによって) 供給される調整原子によって占められうる。加えて、または代わりに、金属イオンの調整部位の1つまたはそれよりも多くは、遷移金属複合体を電極に付着させるのに用いるスペーサーによって占められうる。例えば、より一層十分に以下に記載するように、遷移金属複合体が結合性リガンドとは別の電極に付着されるとき、 $1(n-1)$  以外の金属 (n) の調整部位のすべては、極性のリガンドを含みうる。

#### 【0094】

より一層十分にここに記述されるように、適切な小さな極性リガンドは、概して、ここで「L」として描かれ、2つの一般的なカテゴリーに分類される。1種の具体例において、小さな極性リガンドは、概して、乏しい脱離基としての、または良好なシグマドナーとしての特徴、および金属の同一性のために、金属イオンと効果的に不可逆的に結合する。これらのリガンドは、「置換的に (substitutionally) 不活性」と称されうる。代わりに、より一層十分に以下に記載するように、小さな極性リガンドは、標的被分析物の結合の際

10

20

30

40

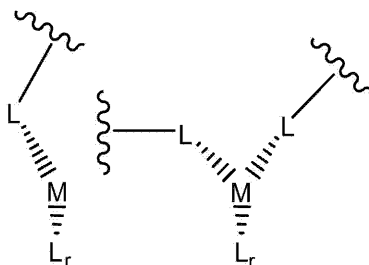
50

、被分析物が1種またはそれよりも多くの調整原子を金属のために提供しうるように、可逆的に金属イオンに結合することができ、小さな極性リガンドが効果的に置き換えられ、それはそれらの良好な脱離基の特性または乏しいシグマドナー特性のためである。これらのリガンドは、「置換的に不安定」と称されうる。リガンドは好ましくは双極子を形成し、それはこれが高い溶媒再配置エネルギーに寄与するからである。

【0095】

遷移性金属複合体の構造の若干を以下に示す。

【化10】



10

【0096】

Lは、調整原子を金属イオンの結合のために提供する共通(コ)リガンドである。この技術における者によって理解されるように、共通リガンドの数および性質は金属イオンの配位数に依存する。単-、二-または多座の共通リガンドを、任意の位置でも用いる。このように、例えば、金属が六の配位数をもつとき、伝導性のオリゴマーの終端からのL、核酸からの寄与されるL、およびrは、六まで加わる。このように、金属が六の配位数をもつとき、rはゼロ(すべての調整原子が他の二つのリガンドによって提供されるとき)から四までに及ぶことができ、それはすべての共通リガンドが単座であるときである。このようにして、概して、rは0から8まであり、金属イオンの配位数および他のリガンドの選定に依存する。

20

【0097】

1種の具体例において、金属イオンは六の配位数をもち、および双方の伝導性のオリゴマーに付着するリガンドおよび核酸に付着するリガンドは少なくとも二座であり、つまり、rは、好ましくはゼロ、一(すなわち、残りの共通リガンドは二座であり)または二である(二つの単座の共通リガンドが使われる)。

30

【0098】

この技術において理解されるように、共通リガンドは同じか、または異なることができる。適切なリガンドは、二つのカテゴリーに分類され、すなわち、調整原子(概して、シグマ( )ドナーとして出版物に言及される)としての窒素、酸素、イオウ、炭素またはリンの原子(金属イオンに依存する)を用いるリガンドおよびメタロセンリガンド(概して、パイ( )ドナーとして出版物において言及され、そして $L_m$ としてここに描かれる)のような有機金属のリガンドである。適切な窒素を提供するリガンドはこの技術においてよく知られ、そしてそれには、制限されないが、シアノ(C N)、 $NH_2$ ; NHR; NRR ; ピリジン; ピラジン; イソニコチンアミド; イミダゾール; ビピリジンおよびビピリジンの置換された誘導体; テルピリジン(terpyridine)および置換された誘導体; フェナントロリン、特に1,10-フェナントロリン(phenと省略)、および4,7-ジメチルフェナントロリンおよびジピリドール(dipyridol) [3,2-a : 2',3'-c] フェナジン(dppzと省略)のようなフェナントロリンの置換された誘導体; ジピリドフェナジン; 1,4,5,8,9,12-ヘキサアザトリフェニレン(hatと省略); 9,10-フェナントレンキノンジイミン(phiと省略); 1,4,5,8-テトラアザフェナントレン(tapと省略); 1,4,8,11-テトラ-アザシクロテトラデカン(cyclamと省略)およびイソシアン化物が含まれる。置換された誘導体は、融合した誘導体を含めて、用いる。若干の具体例において、ポルフィリンおよびポルフィリン族(ファミリー)の置換された誘導体がいられうる。例えば、Comprehensive Coordination Chemistry (コンプリヘンシブ・コーディネーション・ケミストリー), Ed. Wilkinson et al. (ウィルキンソンら編), Pergamon Press (ペルガモン・プレス社), 198

40

50

7年, Chapters (チャプター) 13.2 (pp 73-98), 21.1 (pp. 813-898)および21.3 (pp 915-957)を参照し、それらのすべてを参照することによって明示的にここに組み込む。

【0099】

この技術において理解されるように、ドナー(1)が金属と結合し、およびドナー(2)が周囲の媒体(溶媒、タンパク質、その他)と相互作用するのに使用可能である任意のリガンドドナー(1)-ブリッジ-ドナー(2)は、特にドナー(1)およびドナー(2)がパイシステムを通して接合する場合、シアノス(cyanos)(Cはドナー(1)、Nはドナー(2)、パイシステムはCN三重結合である)の場合のように、本発明において用いることができる。1種の例はピピリミジンであり、それはピピリジンとそっくりに見えるが、媒体との相互作用のために「裏面(バックサイド)」上でNドナーを有する。追加の共通リガンドには、制限されないが、シアン酸塩、イソシアン酸塩( $-N=C=O$ )、チオシアン酸塩、イソニトリル、 $N_2$ 、 $O_2$ 、カルボニル、ハロゲン化物、アルコキシド(alkoxyide)、チオラート(thiolates)、アミド、リン化物、およびスルフィノ、スルホニル、スルホアミノ、およびスルファモイルのようなイオウ含有化合物が含まれる。

10

【0100】

若干の具体例において、多重のシアノスが、異なる金属との複合体に対する共通リガンドとして用いられる。例えば、7つのシアノスは、 $Re(III)$ に結合し、8つは、 $Mo(IV)$ および $W(IV)$ を結合する。このようにして、6つまたはそれよりも少ないシアノスおよび1つまたはそれよりも多くのL、を有する $Re(III)$ 、または7つまたはそれよりも少ないシアノスおよび1つまたはそれよりも多くのLを有する $Mo(IV)$ または $W(IV)$ を、本発明において用いることができる。 $W(IV)$ を有するEAMシステムは、それがより一層不活性で、調製するのがより一層簡単で、より一層好都合な還元電位であるため、他に勝る特定の利点をもつ。概して、より一層大きなCN/L比率がより一層大きなシフトを与えることである。

20

【0101】

炭素、酸素、イオウおよびリンを用いる適切なシグマ供与性(sigma donating)リガンドは、この技術において既知である。例えば、適切なシグマカーボンドナーは、Cotton(コットン)およびWilkinson(ウィルケンソン)、Advanced Organic Chemistry(アドバンスド・オルガニック・ケミストリー)、第5版、John Wiley & Sons(ジョン・ワイリー・サンズ社)、1988年において見出され、参照することによってここに組み込み、例えば、第38頁を参照。同様に、適切な酸素リガンドには、クラウンエーテル、水およびこの技術において既知の他のものが含まれる。ホスフィン類および置換されたホスフィン類も適切であり、CottonおよびWilkinsonの第38頁を参照。

30

【0102】

酸素、イオウ、リンおよび窒素の供与性リガンドは、ヘテロ原子を調整原子としてはたらかせるのを可能にするような方法で付着される。

【0103】

若干の具体例において、有機金属化合物リガンドが用いられる。酸化還元部分、そして、複素環式または環外の置換基のようなドナー原子を伴う結合された有機リガンドを有する種々の遷移金属配位化合物としての使用のための有機化合物に加えて、パイ結合された有機リガンドを有する多種多様な遷移金属有機金属化合物合成物が利用可能である(Advanced Inorganic Chemistry(アドバンスド・インオルガニック・ケミストリー)、第5版、CottonおよびWilkinson、John Wiley & Sons、1988、第26章; Organometallics, A Concise Introduction(オルガノメタリックス、ア・コンサイス・イントロダクション)、Elschenbroich(エルシェンブロイヒ)ら、第2版、1992、VCH; および Comprehensive Organometallic Chemistry(コンプリヘンシブ・オルガノメタリック・ケミストリー)II、A Review of the Literature(ア・レビュー・オブ・ザ・リテラチャー)1982-1994、Abel(アベル)ら編、第7巻、章7、8、10および11、Pergamon Press(ペルガモン・プレス)を参照し、参照することによってここに明示的に組み込む)。そのような有機金属化合物リガンドには、シクロペンタジエニドイオン $[C_5H_5(-1)]$ のような環式芳香族化合物、および種々の環置換され、そして環融合された誘導体で、インデリイド(indenylide)(-1

40

50

イオンのようなものが含まれ、それらは、ビス(シクロペンタジエイル(cyclopentadienyl))金属化合物、(すなわちメタロセン)のクラス(部類)を与え;例えば、Robins(ロビンス)ら、J. Am. Chem. Soc. 104: 1882-1893 (1982); およびGassman(ガスマン)ら、J. Am. Chem. Soc. 108: 4228-4229 (1986)を参照し、参照することによって組み込む。これらのうち、フェロセン[ $(C_5H_5)_2Fe$ ]およびその誘導体は、多種多様な化学(Connelly(コネリー)ら、Chem. Rev. 96: 877-910 (1996)、参照することによって組み込む)および電気化学(Geiger(ガイガー)ら、Advances in Organometallic Chemistry (アドバンシーズ・イン・オルガノメタリック・ケミストリー) 23: 1-93; および、Geiger(ガイガー)ら、Advances in Organometallic Chemistry 24: 87、参照することによって組み込む)電子移動または「酸化還元」反応において用いられる典型例である。様々な第1、第2および第3の周期の遷移金属のメタロセン誘導体は、リボース環または核酸のヌクレオシド塩基に共有結合して付着される酸化還元部分としての潜在的な候補である。他の潜在的に適切な有機金属化合物リガンドはベンゼンのような環状アレーンを含み、ビス(アレーン)金属化合物、およびそれらの、環置換され、そして環融合された誘導体が産生され、それらのビス(ベンゼン)クロミウムは典型例である。アリル(-1)イオン、またはプタジエンのような他の非環式の結合されたりガンドは、潜在的に適切な有機金属化合物を産生し、そしてすべてのそのようなリガンドは、他のパイ結合され、そしてデルタ結合されたりガンドを伴う伝導において、有機金属化合物の一般的な部類を構成し、そこでは炭素結合に対する金属がある。架橋性有機リガンド、および追加の非架橋リガンドを有し、ならびに金属-金属の結合を伴う、および伴わないそのような化合物の種々の二量体およびオリゴマーの電気化学的研究は、核酸分析において潜在的な候補酸化還元部分である。

10

20

#### 【0104】

共通リガンドの1種またはそれよりも多くが有機金属化合物リガンドであるとき、リガンドは概して、有機金属リガンドの炭素原子の1種を介して付着されるが、付着は複素環リガンドのために他の原子を介してでありうる。好ましい有機金属リガンドは、メタロセンリガンドを含み、置換された誘導体およびメタロセンオフアンが含まれる(metallocenophanes)(上記、CottonおよびWilkinsonの第1174頁を参照)。例えば、メチル・シクロペンタジエニルのようなメタロセンリガンドの誘導体は、ペンタメチルシクロペンタジエニルのような多重メチル基が好ましく、メタロセンの安定性を増加させるのに用いることができる。好適例において、メタロセンの2つのメタロセンリガンドのわずか1つが誘導体化される。

30

#### 【0105】

ここに記述するように、リガンドの任意のな組合せを用いうる。好適な組合せは以下を含み、すなわち、a)すべてのリガンドは、窒素供与性リガンドであり、b)すべてのリガンドは有機金属リガンドであり、およびc)伝導性オリゴマーの終端でのリガンドはメタロセンリガンドであり、そして核酸により提供されるリガンドは窒素供与性リガンドであり、他のリガンドを有し、必要ならば、窒素供与性リガンドまたはメタロセンリガンド、または混合物のいずれでもある。

#### 【0106】

通例(As a general rule)、非大環状(non-macrocyclic)キレート化剤を含むEAMは、金属の存在が多重のプロリガンドが多重の酸化状態を与えるために一緒に結合するのを許すので、非大環状キレート合成物を形成するために金属イオンと結合する。

40

#### 【0107】

若干の具体例において、窒素供与性プロリガンドが使われる。適切な窒素供与性プロリガンドは、この技術においてよく知られ、およびそれには、制限されないが、 $NH_2$ ; NHR; NRR; ピリジン; ピラジン; イソニコチンアミド; イミダゾール; ビピリジンおよびビピリジンの置換された誘導体; テルピリジンおよび置換された誘導体; フェナントロリン類、特に1,10-フェナントロリン(phenと省略)、および4,7-ジメチルフェナントロリンおよびジピリドール(dipyridol)[3,2-a:2',3'-c]フェナジン(dppzと省略)のような

50

フェナントロリンの置換された誘導体；ジピリドフェナジン；1,4,5,8,9,12-ヘキサアザトリフェニレン（hatと省略）；9,10-フェナントレンキノンジイミン（phiと省略）；1,4,5,8-テトラアザフェナントレン（tapと省略）；1,4,8,11-テトラ-アザシクロテトラデカン（cyclamと省略）およびイソシアン化物が含まれる。また、置換された誘導体は、融合された誘導体を含めて、用いる。金属イオンを配位的に飽和させず、そして別のプロリガンドの追加を必要とする大環状（macrocylic）リガンドは、この目的では非大環状であると考えられる点に留意する必要がある。この技術における者によって理解されるように、配位的に飽和された化合物を形成するために、多数の「非大環状」リガンドを共有結合で付着することが可能であるが、それは環状骨格を欠く。

【0108】

10

若干の具体例において、単座（例は、少なくとも1種のシアノリガンド）、二座、三座、多座のリガンドの混合物（飽和させるまで）は、EAMsの構築物において使用することができる。

【0109】

概して、それは遷移金属複合体が溶媒接触可能であるかどうかについて決定するリガンドの組成物または特徴である。「溶媒接触可能な遷移金属複合体」または文法上の等価物によって、ここでは少なくとも1つ、好ましくは2つ、およびより一層好ましくは3つ、4つまたはそれよりも多くの小さな極性リガンドを持つ遷移金属複合体を意味する。極性リガンドの実際の数、金属イオンの配位数(n)に依存する。極性リガンドの好ましい数は、(n-1)および(n-2)である。例えば、六座配位（hexacoordinate）金属で、Fe、Ru、およびOsのようなもののために、溶媒接触可能な遷移金属複合体は、好ましくは1つから5つまでの小さな極性リガンドをもち、2から5までが好ましく、そして3から5までが特に好ましく、下記により一層十分に記述するように、他の部位のための必要条件に依存する。PtおよびPdのような四座配位金属は、好ましくは1つ、2つまたは3つの小さな極性リガンドをもつ。

20

【0110】

「溶媒接触可能」および「妨げられた溶媒」が相対語であることを理解すべきである。つまり、高い応用エネルギー（applied energy）では、溶媒接触可能な遷移金属複合体さえ、電子を移すように誘導されうる。

【0111】

30

EAMsの若干の例を、ここに記述する。

1). シアノに基づく複合体

【0112】

1局面において、本発明は、遷移金属および少なくとも1種のシアノ（-C≡N）リガンドを有するEAMsを提供する。金属の価数およびシステムの立体配置（コンフィギュレーション）（例は、調整原子に寄与する捕獲リガンド（capture ligand contributing a coordination atom）、その他）に従い、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのシアノリガンドを用いることができる。概して、ほとんどのシアノリガンドを使う具体例が好適であり、また、これはシステムの立体配置に依存する。例えば、図15において描くように、オスミウムのような六座金属を用いるEAMは、別に捕獲リガンドから付着され、5つのシアノリガンドを許し、第6の調整サイトが付着リンカーの終端によって占められる。六座金属が付着リンカーおよび捕獲リガンドを提供する調整原子の双方をもつとき、4つのシアノリガンドがあることができる。

40

【0113】

若干の具体例において、図において描かれるように、付着リンカーおよび/または捕獲リガンドは、単一の調整原子よりも多くのものを提供することができる。このようにして、例えば、図17において、付着リンカーは、2つの調整原子に寄与するビピリジンを含む。

【0114】

若干の具体例において、シアノリガンド以外のリガンドを、少なくとも1種のシアノリ

50

ガンドとの組合せにおいて用いる。

## 2) Ru-Nに基づく複合体

### 【0115】

1局面において、本発明は新しい基本設計概念をRu-Nに基づく複合体のために提供し、そこでは、調整（配位）は単座、二座、三座、または多座であることができた。このように、調整リガンドL（それは、共有結合的にアンカーおよび捕獲リガンドに接続する）の数は、1、2、3、または4であることができる。例の若干のものは、図5Aに示される。

### 【0116】

電荷中性性リガンドは、この技術において既知の任意の適切なりガンドで、ジチオカルバマート、ベンゼンジチオレートのようなもの、またはここに記述されるようなシッフ塩基であることができる。捕獲リガンドおよびアンカーは、同じフレームワーク上か、または別であることができる。

### 【0117】

本発明の別の局面では、EAMリガンドの基本設計概念の各々の構成要素は、Ru錯体化学よりもむしろ、共有結合を通して接続される。基本設計概念の構築物は、ここで提供され、現代の合成有機化学方法論に頼ることができる。重要な設計的配慮（design consideration）には、アンカーおよび捕獲リガンドの構成要素対調整性リガンド構成要素において存在する官能基の必要な直交反応性（orthogonal reactivity）が含まれる。好ましくは、全体の化合物を合成することができ、そして酸化還元活性遷移性金属が合成の最後の工程近くでリガンドに対して調整される。ここに提供される調整性リガンドは、ルテニウムペンタアミン前駆体のための十分に確立された無機の方法論に頼る。Gerhardt（ゲールハルト）およびWeck（ベック）、J. Org. Chem. 71: 6336-6341 (2006)；Sizova（シゾバ）ら、Inorg. Chim. Acta.（インオルガニカ・キミカ・アクタ）、357: 354-360 (2004)；およびScott（スコット）およびNolan（ノラン）、Eur. J. Inorg. Chem. 1815-1828 (2005)を参照し、参照することによってここですべてを組み込む。Ru-ペンタアミン複合体を有するEAMの基本設計概念の若干の例を、以下の図5Bにおいて示す。

### 【0118】

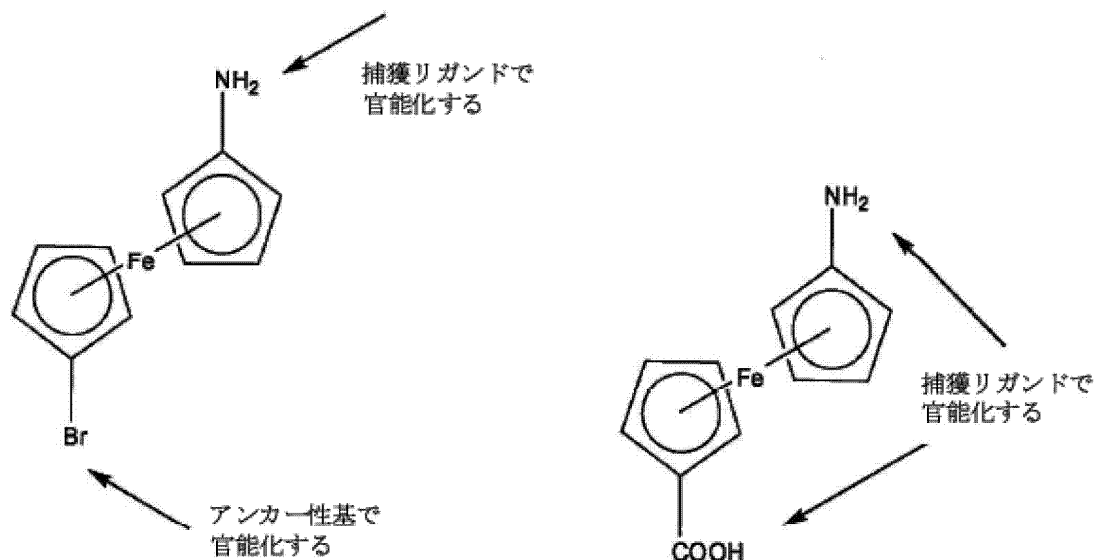
この技術における熟練者によって理解することができるように、ここに提供する化合物のアンカー構成要素はアルキルおよび多足性に基づく（multipodal-based）チオールの間で交換することができる。

## 3) フェロセンに基づくEAMs

### 【0119】

若干の具体例において、EAMsは置換されたフェロセンを含む。フェロセンは空気安定性である。それは、双方の捕獲リガンドおよびアンカー性基で、簡単に置換することができる。標的タンパク質をフェロセンの上の捕獲リガンドに結合する際、それはフェロセンのまわりで環境を変えるだけでなく、また、シクロペンタジエニル環がスピニング（回転）するのを防ぎ、それはおよそ4kJ/モルだけエネルギーを変える。国際公開WO/1998/57159；Heinze（エインゼ）およびSchlenker（シュレンカー）、Eur. J. Inorg. Chem. 2974-2988 (2004)；HeinzeおよびSchlenker、Eur. J. Inorg. Chem. 66-71 (2005)；およびHollman（ホールマン）-Wiberg（ウィーベリ）、Inorganic Chemistry, Academic Press（アカデミック・プレス社）、第34版、1620でのものを、参照することによって組み込む。

## 【化 1 1】



10

## 【0 1 2 0】

若干の具体例において、アンカーおよび捕獲リガンドを、より一層簡単な合成のために同じリガンドに付着する。若干の具体例において、アンカーおよび捕獲リガンドは異なるリガンドに付着される。

20

## 【0 1 2 1】

ここに開示する新しい基本設計概念を構築するのに用いることができる多くのリガンドがある。それらには、制限されないが、カルボン酸塩、アミン、チオレート、ホスフィン、イミダゾール、ピリジン、ビピリジン、テルピリジン、tacn (1,4,7-トリアザシクロノナン)、salen (N,N -ビス(サリチリデン)エチレンジアミン)、acacen (N,N -エチレンビス(アセチルアセトンイミネート (acetylacetoniminat) (-))、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、DTPA (ジエチレントリアミン五酢酸)、Cp (シクロペンタジエニル)、ピンサー (はさみ) リガンド類、およびスコルピオネート類 (scorpionates) が含まれる。若干の具体例において、好ましいリガンドはペンタアミンである。

30

## 【0 1 2 2】

ピンサーリガンドは、キレート性リガンドの特定の種類である。ピンサーリガンドは、金属の対辺上ならびに間におけるものの結合を造り出すために、それ自体で金属中心の周りをラップする (くるむ)。金属芯電子に及ぼす効果のピンサーリガンド化学は、アミン、ホスフィン、および混合されたドナーリガンドと似ている。これは、金属の活性を仕立てることができる独特の化学的状況を作る。例えば、そのような高い要求が、ピンサーリガンドを適応するために、複合体の立体構造 (sterics) 上にあるので、金属が中で参加することができる反応は制限され、そして選択的である。

## 【0 1 2 3】

スコルピオネートリガンドは、facの様式において金属と結合する三座リガンドを言う。スコルピオネート類の最もよく知られる部類は、トリス(ピラゾリル)ハイドロホウ酸塩またはTpリガンドである。CpリガンドはTpに対するイソロバル (isolobal to Tp) である。

40

## 【0 1 2 4】

若干の具体例では、以下の制限が望ましく、すなわち、金属複合体は、溶媒と近くで接触が許される小さな極性リガンドをもつべきである。

## 4) 電荷中和性リガンド

## 【0 1 2 5】

別の局面において、本発明は、荷電されたりガンドを含む金属複合体をもつ組成物を提供する。中性から荷電されたものまで、または荷電されたものから中性にまで変化するシ

50

ステムのための再配置エネルギー（例は、 $M(L)_n^{+} \leftrightarrow M(L)_n^0$ ;  $M(L)_n^{-} \leftrightarrow M(L)_n^0$ ）は、水分子および周囲のイオンが、未荷電の状態への、またはそれからの変化に適応するために「再配置」をより一層多くされなければならないので、電荷が単純に変化する（例は、 $M(L)_n^{2+} \leftrightarrow M(L)_n^{3+}$ ）システムのためのものより大きくてよい。

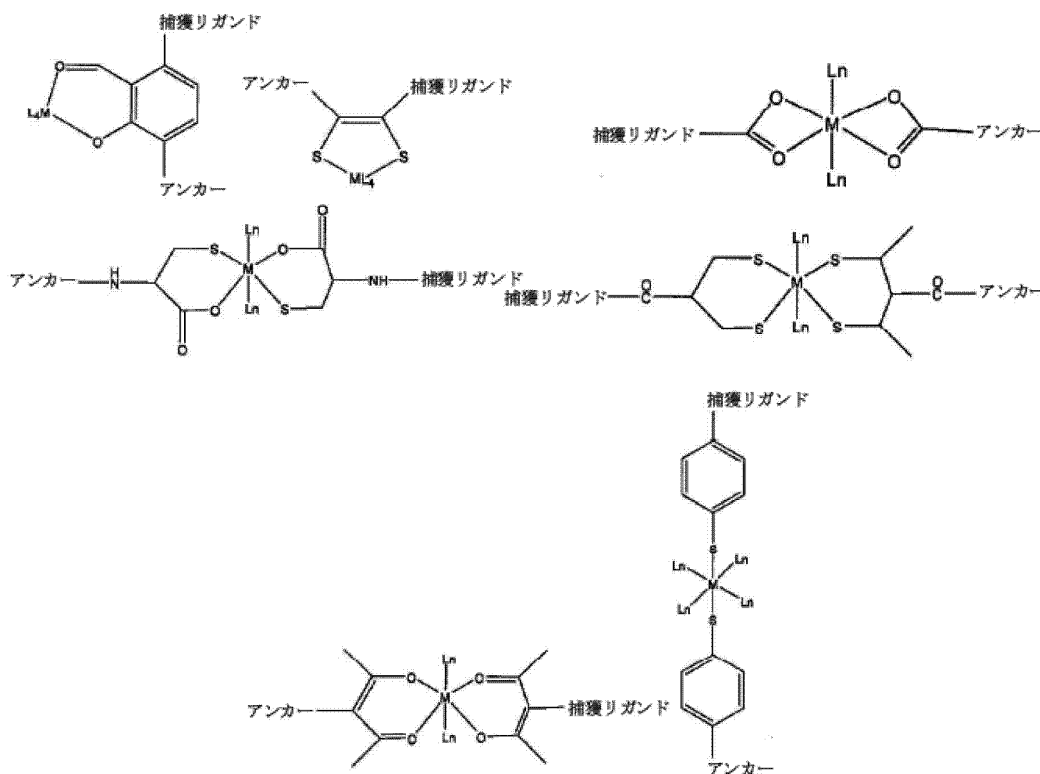
#### 【0126】

若干の具体例において、荷電されたりガンドの陰イオン化合物は、アンカーおよび捕獲リガンドを金属中心に付着するのに用いることができる。金属複合体で、内側の複合体スフィア（球）にハロゲン化物イオンXを含むものは、荷電されたりガンドと反応し、制限されないが、チオール（R-SH）、チオラート類（thiolates）（RS-E；E=脱離基、すなわち、トリメチルシリル-基）、炭酸、ジチオール、炭酸塩、アセチルアセトネート、サリチル酸塩、システイン、3-メルカプト-2-（メルカプトメチル）プロパン酸が含まれる。この反応のための駆動力はHXまたはEXの形成である。陰イオンリガンドが、双方の捕獲リガンドおよびアンカーを含む場合、1種の置換反応が必要とされ、そして従って、金属複合体は、それが反応して、内側のスフィアにおいて1つのハロゲン化物リガンドをもつ必要がある。アンカーおよび捕獲リガンドが分けて導入される場合、出発物質は概して、内側の配位圏（スフィア）において2つのハロゲン化物を含む必要がある。Seidel（サイデル）ら、Inorg. Chem 37: 6587-6596 (1998)；Kathari（キャサリ）およびBusch（ブッシュ）、Inorg. Chem. 8: 2276-2280 (1978)；Isied（イシイド）およびKuehn（キューン）、J. Am. Chem. Soc. 100: 6752-6754；およびVolkers（フェルカーズ）ら、Eur. J. Inorg. Chem. 4793-4799 (2006)を、参照することによってすべてをここに組み込む。

#### 【0127】

適切な金属複合体のための例は、次のものである（以下に描く構造が多重の単座（ユニデンデート）のリガンドを示し、そして多座のリガンドはシアノリガンドのような単座のリガンドの代わり、またはそれとの組合せであることができることに注目すべきである）。すなわち

#### 【化12】

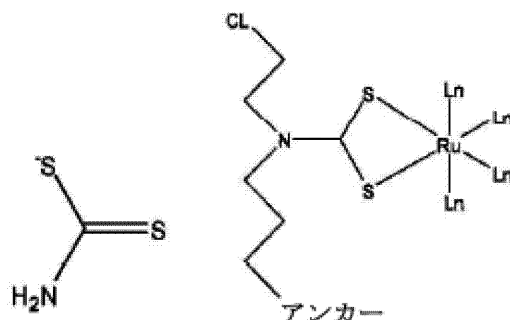


#### 【0128】



若干の具体例において、ジチオカルバマートが、以下の例のもののように、電荷中和性リガンドとして用いられる。すなわち

【化 1 3】

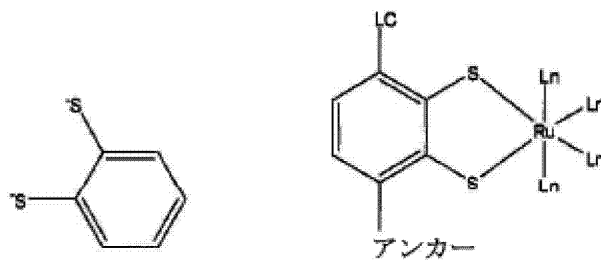


10

【0 1 2 9】

若干の具体例において、ベンゼンジチオレートが、次の例のもののような、電荷中和性リガンドとして用いられる。すなわち

【化 1 4】



20

【0 1 3 0】

上記に描く構造では、Lnは座標リガンド (coordinate ligand) であり、そしてn=0または1である。

30

【0 1 3 1】

若干の具体例において、EAMはシッフ塩基のタイプの複合体を含む。「シッフ塩基」または「アゾメチン」によって、ここでは、アリールまたはアルキルの基で、-水素ではないものに接続する窒素原子を有する炭素-窒素の二重結合が含まれる官能基が意味される。シッフ塩基は一般式 $R_1R_2C=N-R_3$ 、式中、 $R_3$ はシッフ塩基を安定なイミンにさせるフェニルまたはアルキルの基である。シッフ塩基は、ヘミアミナールを形成する求核付加によって芳香族アミンおよびカルボニル化合物から合成することができ、次いでイミンを生成するために脱水が続く。

【0 1 3 2】

Acacenはその窒素および酸素の原子を通した周辺水分子に対する水素結合を形成することができる小さな平坦四座リガンドであり、それは再配置エネルギー効果を高める。それは多くの官能基 (機能性) で修飾することができ、制限されないが、カルボン酸およびハロゲン化物が含まれ、acacen-リガンドを捕獲リガンドに、およびアンカー基に接合するのに用いることができる。このシステムは、各種の異なる金属中心がEAMsにおいて利用させるのを許す。リガンドがその2つの酸素および2つの窒素の原子と結合するので、4つの調整部位だけが占められる。金属中心に従い、これは2つの追加の調整部位を開かせる。これらの調整部位は、各種の有機および無機のリガンドによって占められることができる。これらの追加の開放した部位は、内側のスフィアの置換 (substitution) のために用いることができ (例は、不安定な $H_2O$ または $NH_3$ は、タンパク質結合によって置き換えることができ) または外側のスフィアの影響のために (例は、 $CO$ 、 $CN$ はH結合に影響することがで

40

50

きる)、捕獲リガンドを標的に結合する際に、可能性あるシフトが最適化される。WO/1998/057158、WO/1997/21431、Louie (ルーイ) ら、PNAS 95: 6663-6668 (1999)、および Bot tcher (ベッチャー) ら、Inorg. Chem. 36: 2498-2504 (1997) を、参照することによってここにすべてを組み込む。

#### 【 0 1 3 3 】

若干の具体例において、salen-複合体を同様に用いる。Syamal (シヤマル) ら、Reactive and Functional Polymers (リアクティブ・アンド・ファンクショナル・ポリマー) 39: 27-35 (1999)。

#### 【 0 1 3 4 】

若干のacacenに基づく複合体およびsalenに基づく複合体の構造を以下で示し、そこでは、捕獲リガンドでの官能化のために適切なリガンド上の位置および/またはアンカーをアスタリスク (星印) でマークする。

10

#### 【 化 1 5 】

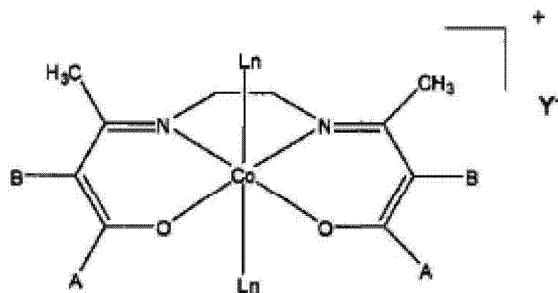


20

#### 【 0 1 3 5 】

コバルトの複合体を形成するために、リガンドとしてacacenを用いることの1種の例は次のものである。すなわち

#### 【 化 1 6 】



30

式中では、AおよびBは置換基であり、L<sub>n</sub>は調整性リガンドで、およびn=0または1であり、そしてYは対イオンである。

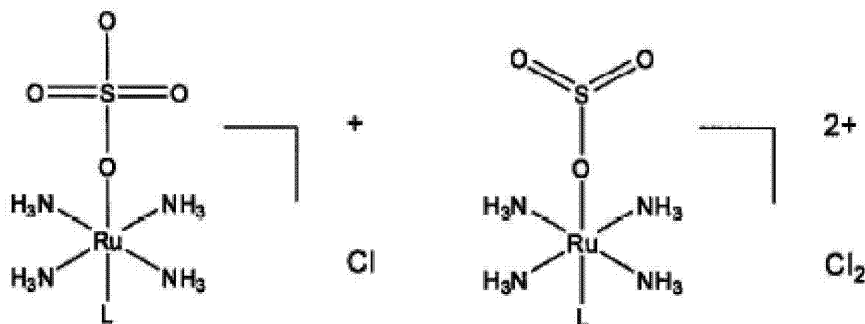
#### 5) スルファト (Sulfato) リガンド類

40

#### 【 0 1 3 6 】

若干の具体例で、EAMはスルファトの複合体を含み、制限されないが、[L-Ru(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>および[L-Ru(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>が含まれる。SO<sub>4</sub>-Ru(III)-複合体は空気安定性である。リガンドLは、捕獲リガンドおよびアンカーを含む。硫酸塩リガンドは、アミンよりも極性で、そして負に荷電される。表面の複合体は、従って周囲水分子からの寄与により、双方の[L-Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-L]および[L-Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>よりも大きな再配置エネルギーをもつ。IsiedおよびTaube、Inorg. Chem. 13: 1545-1551 (1974)を、ここで参照することによって組み込む。

## 【化 1 7】



10

## 6) 多重の金属を有するEAM

## 【0 1 3 7】

本発明の1種の局面では、多重の金属中心が単一のリガンド複合体に組み込まれ、そしてそれによって信号が増える。この配置（アレンジメント）は、標的あたりの金属の比率を上昇させ、より一層高い感度を招く。

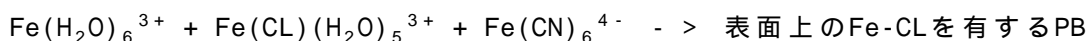
## 【0 1 3 8】

nの若干の具体化で、多重の金属中心は興味のある（標的の）被分析物との大きな相互作用を可能にするためにアンカー性部分の捕獲リガンドの近くに存在する。被分析物あたり1つよりも多くのリポーター金属をもつことで、信号を雑音比率にまで押し上げることができ、装置の感度を増加させた。そのような例の1種は図19において示される。

20

## 【0 1 3 9】

若干の具体例において、プルシアンブルー（Prussian blue、PB）が用いられる。プルシアンブルーは、化学的または電気化学的に、単純な鉄のシアニ化物の前駆体から形成することができる、無機の、3次元ポリマー（下記参照）である。MnおよびVおよびRuのような他の金属はまた、PB様のフィルム（薄膜）中に組み込まれた。50-100nmの厚さのフィルムは迅速に形成される。捕獲リガンドを有する鉄（または他の似た金属）の複合体は、フィルムの形成の間、この複合体を前駆体と組み合わせることによって、フィルムの表面上に組み込むことができる。すなわち

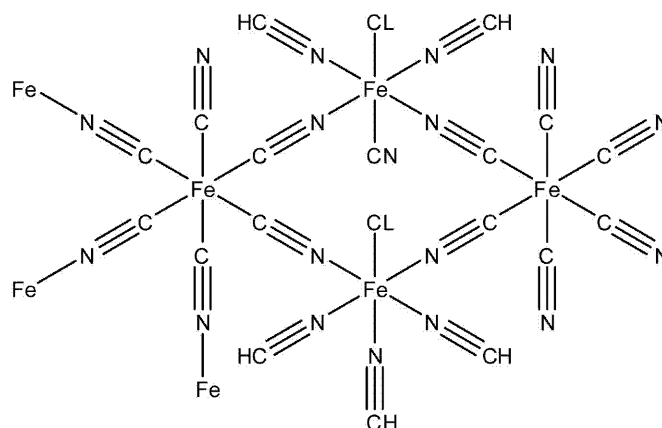


30

## 【0 1 4 0】

標的被分析物（タンパク質のようなもの）が結合するとき、シアノ基および表面の上の他の水分子への水の水素結合は、崩壊され（disrupted）、そしてまさに捕獲リガンドによるものよりも多くの金属に影響を及ぼす。電気化学的信号は、この増幅のために急激に変化する。図6Aを参照。若干の具体例において、タンパク質結合前の信号のバックグラウンド除去は、有利でありうる。

## 【化 1 8】



40

## 【0 1 4 1】

上記に示す例において、鉄の金属上のアキシャル位（軸の位置）は、表面に対して直角

50

に配置される捕獲リガンドで官能化される。単一の標的を官能基化された表面に結合させることは、隣接しただけでなく直接付着された金属中心である金属に影響を与える。

【0142】

Fe-CL複合体は、それが外面上だけに組み込まれ、そして過度の欠陥を引き起こさないように、フィルムの初期の形成後に加えられる。フィルム厚は、化学反応の進行する時間によって、または、電気化学的に形成される場合にどれだけ多くの電流が溶液に適用されるかによって、制御することができる。

【0143】

代わりに、PBのアイランド（島）は、捕獲リガンドを伴うか、または伴わないアルカンまたは共役されたSAMのエリア（領域）の間で成長することができる。これは、ナノパターニングを必要とし、そして試料溶液において外来の種からの電気化学的信号を防止するのを助ける。

【0144】

用いることができる金属には、制限されないが、ルテニウム、鉄、レニウム、およびオスミウムが含まれ、各々に関連した適切なリガンド構造を有する。

【0145】

複数の金属が同じ複合体において存在するとき、多重の金属中心の間の連結性は概して金属の間で一般に「クロストーク（漏話）」を可能にしてはならないが、むしろ絶縁するべきである。

#### 7) クラウンエーテルリガンド

【0146】

1種の局面において、本発明は極性基で、クラウンエーテル（CEs）のようなものを、金属中心に近接して導入される組成物を提供する。これは、標的被分析物（例は、タンパク質）をEAMに結合する際、潜在的シフトを増やすことができ、そして従ってプローブの感度を増すことができた。

【0147】

クラウンエーテルは、複素環の化学的化合物であり、それは、それらの最も単純な形態において、エチレンオキシドの環状オリゴマーである。任意の単純なクラウンエーテルの重要な繰り返し単位は、エチレンオキシ（ethyleneoxy）、すなわち、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ であり、それは、ジオキサンにおいて二回、および18-クラウン-6において六回繰り返される。概して、 $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ タイプの大員環であり、そこでは、 $n \geq 4$ が「クラウン」エーテルとして、それらのより一層長い体系的名称によるよりもむしろそのように称され、すなわち、例として、18-クラウン-6の体系的名称は、「1,4,7,10,13,16-ヘキサオキサシクロオクタデカン」である。クラウンエーテルの名称における最初の数は環（サイクル）における原子の数に言及し、そして第2の数は酸素であるそれらの原子の数に言及する。

【0148】

また、本発明によって想定されるのはクラウンエーテルの誘導体である。

【0149】

この具体例は、それが第2のスフィア部分をタンパク質結合性事象に先立ちEAMのルテニウム中心に結合させたことに基づく。クラウンエーテル水素をペンタアンミンルテニウム複合体に結合させておくことがアセトニトリルにおいて著しく負（ $\sim 100$  mVまで）の酸化還元電位をシフトすることが示された。Ando（アンドウ）、Coordination Chemistry Reviews、248: 185-203（2004）、およびその中での引用；Andoら、Polyhedron（ポリヘドロン）、11: 2335-2340（1992）；Zang（ツアン）ら、Inorg. Chem., 4738-4743（1994）；Todd（トッド）ら、Inorg. Chem., 32: 2001-2001（1993）；Dong（ドン）ら、J. Am. Chem. Soc., 115: 4379-4380（1993）、すべてをここで参照することによって組み込む。

【0150】

本出願人はここに提供されているEAMへのタンパク質結合による酸化還元電位の正の（ポジティブな）シフトを観察し、このようにして、クラウンエーテルの使用はこの効果を増幅する。タンパク質結合に先立って、金属中心に結合した若干の電子供与性（donating

10

20

30

40

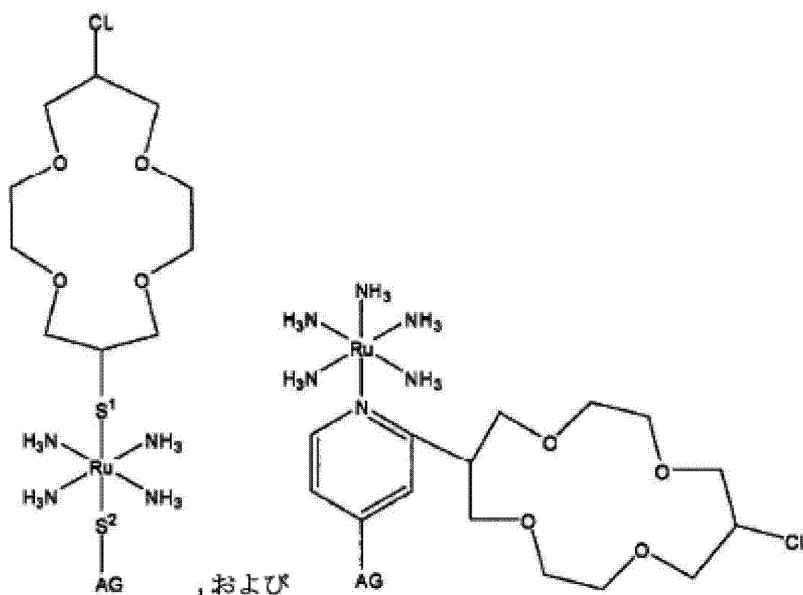
50

部分(すなわち、クラウンエーテル)を有することによって、我々の初期のポテンシャルをより一層負(ネガティブ)に動かすことによる「不正工作をし(stacks the deck)」、タンパク質結合の際、クラウンエーテルが置き換えられ(第2のスフィアの調整を変化させ)、より一層大きな正の電位シフトを与える。

【0151】

理論に束縛されることなく、増加された潜在的シフトのための理由はおそらく、つぎのようである。すなわち、CEsは、周囲水分子に対して水素結合を形成する。CEsはCEの酸素原子と結合するアルカリ金属イオン(例は、電解質における $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ )と結合することが知られている。水において、CE、イオンおよび対イオン(例は、 $\text{Cl}^-$ )は、周囲水分子で水和する。標的を捕獲リガンドに結合した際、遷移金属複合体を囲んでいる水分子は、CE、アルカリ金属イオンおよびアルカリ金属イオンの対イオンを水和させる水分子と同様に置き換えられる(replaced)。図6Aおよび6Bを参照。ずっと多くの(many more)水分子が置き換えられるという事実は、結合事象において観察される、可能性あるシフトを増加させる。若干の場合に、親水性からより一層の疎水性までの環境の変化は、実際にCEからアルカリ金属塩( $\text{K}^+$ および $\text{Na}^+$ イオンのようなもの)ならびに水分子を追い出し、そして1.0 Vもの可能性あるシフトを予想することができる。Electrochimic acta(エレクトロキミカ・アクタ)、2001、2733、ここに参照することによって組み込む。図7を参照。若干の例は次のようである。すなわち

【化19】



式中、 $\text{S}^1$ および $\text{S}^2$ はスペーサーであり、CL=捕獲リガンドであり、そして、AG=アンカー基である。

#### 8) ピリジン-チオエーテル/エーテル-リガンド類

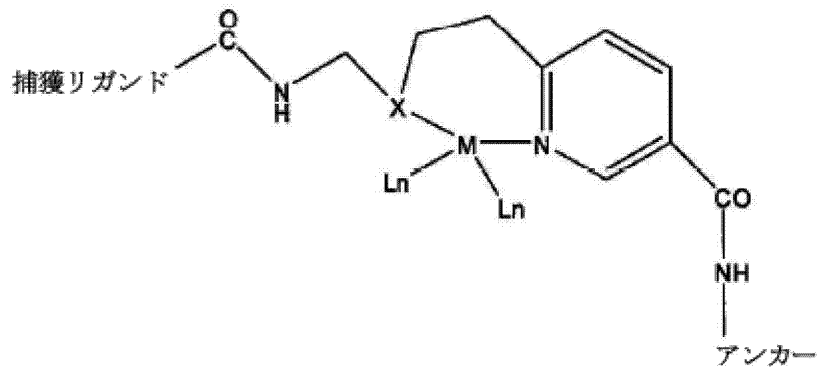
【0152】

若干の具体化において、ピリジンチオエーテル/エーテル-リガンド類が、EAMの合成において用いられる。これらのリガンドシステムは、ピリジン窒素およびチオエーテル/エーテルの官能性を介して種々の金属中心と結合することができる。理論に束縛されることなく、EAMを標的に結合させる際、金属-チオエーテル/エーテルの結合が開裂されて、そして例は、ハロゲン化合物が金属中心と結合する可能性があり、それは内側のスフィア効果であり、電気化学ポテンシャルにおける大きなシフトが導かれる。

【0153】

そのような複合体のための例の1種は、以下に(bellow)示される。すなわち

【化 2 0】



10

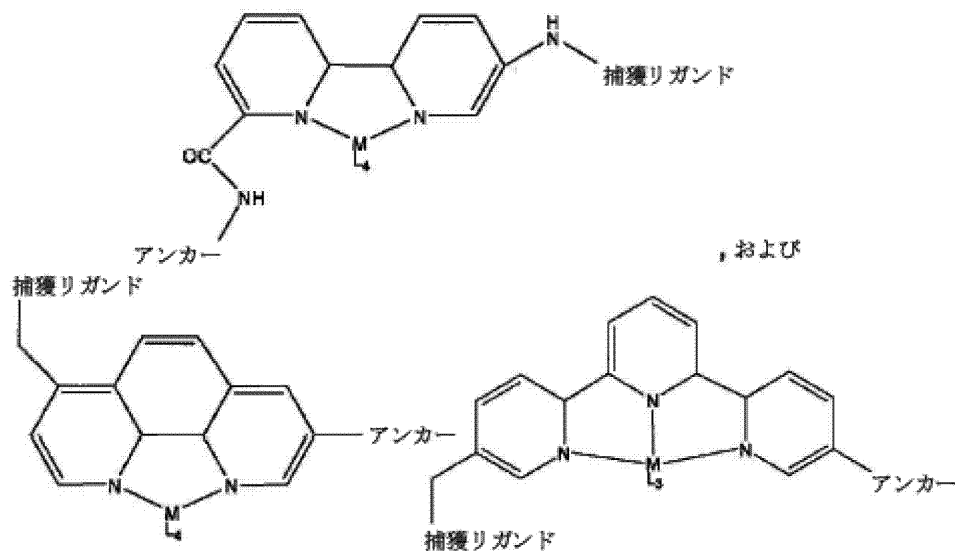
式中、Ln=金属中心の調整リガンド、L=0または1、およびX=OまたはS。

【 0 1 5 4】

若干の具体例において、ピピリジンおよび他の多座の窒素に基づくリガンドで、1,10フェナントロリンまたはテルピリジンのようなものが用いられる。これらの種類のリガンドのための例を以下に示す。すなわち

【化 2 1】

20



30

#### D. スペーサー基類

【 0 1 5 5】

40

若干の具体例において、EAMまたはReAMCは、付着リンカーまたはスペーサー（「スペーサー-1」）を介してアンカー基（それは、電極に付着する）に共有結合的に付着され、それはさらに、概して、電極への付着リンカーの結びつき（association）を許す機能的な部分を含む。例えば、米国特許第7,384,749号を参照し、ここに参照することによってその全体をそのまま、そして特に付着リンカーに関する議論のために組み込む）。金電極の場合には、イオウ原子が官能基（この付着は、この発明の目的のためにコバレント（電子対を共有するもの）であると思われ）として用いることができることに注目する必要がある。「スペーサー」または「付着リンカー」によって、ここに、電極の表面を離れて酸化還元活性複合体を保持する部分が意味される。若干の具体例において、ここに概説されるように、スペーサーは伝導性のオリゴマーであるが、しかし、以下に概説されるように、

50

適切なスペーサー部分は不動態化薬剤および絶縁体を含む。若干の場合においては、スペーサー分子は、SAM形成性種である。スペーサー部分は、実質的に非伝導性であってよいが、好ましくは（しかし、必要でない）、酸化還元活性分子および電極（ $H_{AB}$ ）の間での電子接合は電子移動の速度を制限しない。

【0156】

そのうえ、ReAMCsが利用されるとき、その場合には、付着リンカーを、捕獲リガンドの調整原子および捕獲リガンドそれ自体の間で用いることができる。同様に、付着リンカーを、図12-14において示されるように、分枝することができる。加えて、付着リンカーは、それらがReAMCにおいて関連しないとき、捕獲リガンドを電極に付着するのに用いることができる。

【0157】

付着リンカーの1端部は、EAM/ReAMC/捕獲リガンドに連結され、そして他端部（この技術における者によって理解されるが、それはどちらについても正確な終端である必要はない）は電極に付着される。

【0158】

酸化還元活性分子を含んでいる伝導性のオリゴマーの共有結合的付着（および他のスペーサー分子の付着）は、様々なやり方において成し遂げることができ、用いられる電極および伝導性のオリゴマーに依存する。例えば、構造12-19および米国特許出願公開第20020009810における添付のテキストを参照し、ここに参照することによってその全体をそのまま組み込む。

【0159】

概して、スペーサーの長さは、米国特許第6,013,459、6,013,170および6,248,229、ならびに7,384,749号明細書において伝導性のポリマーおよび不動態化薬剤について概説され、そのすべてを参照することによって全体としてそのままここに組み込む。この技術における者によって理解されるように、スペーサーがあまりに長くなる場合、酸化還元活性分子および電極の間の電子接合は迅速に減少する。

E. 捕獲リガンド類

【0160】

様々な分子は、捕獲リガンドとして本発明において用いることができる。「捕獲リガンド」または「結合性リガンド」または「捕獲結合性リガンド」または「捕獲結合性種」または「捕獲プローブ（探針）」によって、個々で標的被分析物と結合する標的被分析物の存在について探るのに用いる化合物が意味される。概して、検出の目的のために、捕獲リガンドは、電極への標的被分析物の付着を許す。より一層十分に以下で概説されるように、捕獲プローブへの標的被分析物の付着は直接（すなわち、標的被分析物が捕獲リガンドに結合し）または間接的（1つまたはそれよりも多くの捕獲エキステンダー（増量剤）リガンドが用いられる）でありうる。「共有結合的に付着した」によって、ここで、2つの部分が、少なくとも1つの結合によって、シグマ結合、パイ結合および調整結合を含めて、付着されることが意味される。

【0161】

若干の具体例において、結合は特異的であり、そして捕獲リガンドは結合対の一部である。「特異的に結合」によって、ここでリガンドが被分析物を、試験試料の被分析物および他の構成要素または汚染物質を区別するのに十分な特異性で結合することが意味される。しかし、この技術における者によって理解されるように、被分析物を、高度に特異的でない結合を用いて検出することは可能であり、例えば、それらのシステムは異なる捕獲リガンド、例えば異なるリガンドのアレイを用いることができ、そして任意の特定の被分析物の検出は、結合性リガンドのパネルに対する結合のその「サイン」を介してであり、「電子鼻」が働く様式と似ている。これは、特定の有用性を化学的被分析物の検出において見出す。結合は、非特異的な結合を取り除くための洗浄工程を含む、アッセイの条件下で結合したままなのに十分でなければならない。この結合は、非特異性の結合を取り除くための洗浄工程を含む、アッセイの条件下で結合したままであるのに十分でなければならな

10

20

30

40

50

い。概して、結合性リガンドに対する被分析物の分離定数は、少なくとも $10^{-4}$ - $10^{-6}\text{M}^{-1}$ の範囲にあり、好ましい範囲は $10^{-5}$ から $10^{-9}\text{M}^{-1}$ で、そして特に好ましい範囲は $10^{-7}$ - $10^{-9}\text{M}^{-1}$ である。

#### 【0162】

この技術における者によって理解されるように、捕獲リガンドの組成は標的被分析物の組成に依存する。多種多様な被分析物に対する捕獲リガンドは、既知であり、または既知の技術を用いて簡単に見出すことができる。例えば、被分析物が一本鎖核酸であるとき、捕獲リガンドは相補的核酸でよい。同様に、被分析物は核酸結合性タンパク質であることができ、そして捕獲結合性リガンドは一本鎖または二重鎖核酸であり、あるいはまた、被分析物が一本鎖または二重鎖核酸であるとき、結合性リガンドは核酸-結合性タンパク質でありうる。被分析物がタンパク質であるとき、結合性リガンドはタンパク質または小分子を含む。好適な結合性リガンドタンパク質には、ペプチドが含まれる。例えば、被分析物が酵素であるとき、適切な結合性リガンドは基材（基板）およびインヒビター（抑制剤）を含む。この技術における者に理解されるように、被分析物として、または結合性リガンドとしてのいずれでも、関係する任意の2つの分子を用いる。適切な被分析物/結合性リガンドの対には、制限されないが、抗体/抗原、レセプター/リガンド、タンパク質/核酸、酵素/基質および/またはインヒビター、そして糖質（炭水化物）（糖タンパク質（グリコプロテイン）および糖脂質が含まれ）/レクチン、タンパク質/タンパク質、タンパク質/小分子が含まれ、そして糖質およびそれらの結合性パートナーはまた、適切な被分析物結合性リガンド対でもある。これらは、野生型または派生的なシーケンスでよい。好適例において、結合性リガンドは、細胞表面レセプターの一部（特に細胞外一部分）であり、それは、多量体を形成することで知られ、成長ホルモン受容体、ブドウ糖輸送体（特にGLUT 4レセプター）、トランスフェリン受容体、上皮細胞増殖因子受容体、低密度リボタンパク質受容体、高密度リボタンパク質受容体、上皮細胞増殖因子受容体、レプチン受容体、インターロイキン受容体で、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15およびIL-17レセプターのようなもの、ヒト成長ホルモン受容体、VEGF受容体、PDGF受容体、EPO受容体、TPO受容体、毛様体神経栄養因子受容体、プロラクチン受容体およびT-細胞受容体のようなものが含まれる。

#### 【0163】

ここに記述するように、捕獲リガンドは共有結合を介して調整性リガンドおよび/またはアンカーに付着することができる。捕獲結合性リガンドの付着の方法は概して、この技術において知られているように行われ、そして付着リンカーおよび捕獲結合性リガンドの組成に依存する。概して、捕獲結合性リガンドは官能基の各々上での使用を通して付着リンカーに付着され、それは次いで付着のために用いることができる。付着のための好ましい官能基は、アミノ基、カルボキシ基、オキシ基およびチオール基である。これらの官能基は次いで、直接または、リンカーの使用を通して、「Z」としてここに時々描かれ、付着することができる。リンカーは、この技術において既知であり、例えば、ホモ-またはヘテロ-二官能性リンカーとしてよく知られている（1994 Pierce Chemical Company catalog（ピアス・ケミカル社、カタログ）、technical section on cross-linkers（クロスリンカーのテクニカルセクション）、第155-200頁を参照し、ここに参照することによって組み込む）。好ましいZリンカーには、制限されないが、アルキル基（ヘテロ原子部分を含む置換されたアルキル基およびアルキル基を含む）が含まれ、短いアルキル基、エステル類、アミド、アミン、エポキシ基およびエチレングリコールおよび誘導体が好ましい。Zはまたスルホン基でよく、スルホンアミドを形成する。

#### 【0164】

このように、タンパク質、レクチン、核酸、小さな有機分子、糖質、その他を含む捕獲結合性リガンドを加えることができる。

#### 【0165】

若干の具体例において、抗体またはその断片が、捕獲リガンドとして用いられる。ここで「抗体」によって、特異的に抗原と結合することができる免疫グロブリンと呼ばれるグ



リコシル化されたタンパク質のファミリー（族）のメンバー（一員）が意味される。用語「抗体」は全長のもを含み、同様に抗体断片も含み、そしてこの技術において既知のように、Fab、Fab2、単鎖抗体（例えばFv）、キメラ抗体、ヒト化した抗体およびヒト抗体、その他を含み、そして、全体の抗体の修飾または組換えDNA技術を使って新たに合成されたもの、およびその派生物のいずれによっても生産される。

【0166】

しかし、若干の具体例において、全体の抗体は好ましくない。これは、抗体があまりに嵩高い（大きい）からで、トランスデューサーとの干渉が導かれる。このようにして、若干の具体例において、抗体断片およびミニトープ類（mimitopes）が捕獲リガンドとして用いられる。

10

【0167】

ここで「エピトープ」によって、抗原の抗体認識の実際の部位が意味される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定基部位」と取り換えて用いられる。

【0168】

「ミニトープ類」または「ミモトープ（mimotope）」によって、ここに、生物学的に重要な部位、例は、エピトープ、または酵素活性部位、または受容体結合部位の空間的構造をもつペプチドが意味される。

【0169】

若干の具体例において、捕獲リガンドは、抗体代替物（antibody alternatives）を含み、アビマー（avimer）を含むが、これに限られない。ここで「avimer」によって、インビトロエキソシヤッフリングおよびファージ提示によってヒト細胞外受容体ドメインの大きなファミリーから発展する（evolved from）タンパク質が意味される。それは、概して、結合性および抑制性の特性を有する多ドメインタンパク質である。Silverman（シルヴァーマン）ら、Nature Biotechnology（ネイチャー・バイオテクノロジー）23: 1556-1561（2005）、ここに参照することによって組み込む。

20

【0170】

若干の具体例において、捕獲リガンドは、オリゴマーペプチドを含む。これらのペプチドはこの技術において既知の技術を用いて得ることができ、制限されないが、ファージ提示、Sidhu（シドゥ）ら、Methods Enzymol., 328, 333 - 363（2000）、および1ピース1ペプチドが含まれる。例えば、ペプチドはバイオパニング（Biopanning）を用いて得ることができる。Giodano（ジオダノ）ら、Nat Med. 7: 1249-53（2001）、ここに、参照することによって組み込む。

30

【0171】

標的被分析物が核酸または核酸結合性タンパク質であるとき、捕獲リガンドは核酸でありえ、あるいはまた、概してここに参照することによって組み込む米国特許第5,270,163、5,475,096、5,567,588、5,595,877、5,637,459、5,683,867、5,705,337号および関連した特許において記述されているように、核酸「アプタマー」は実質的に任意の標的被分析物に対しての結合のために開発することができる。同様に、ワイドボディの出版物が、コンビナトリアルケミストリー（組み合わせ化学）の方法に基づく結合性パートナーの開発に関して存在する。この具体例では、捕獲リガンドが核酸であるとき、好ましい組成物および技術は国際出願PCT US97/20014において概説され、ここに参照することによって組み込む。

40

【0172】

若干の具体例において、捕獲リガンドはアプタマーを含む。ここで「アプタマー」によって、一本鎖、部分的に一本鎖、部分的に二重鎖または、二重鎖ヌクレオチド配列、有利には複製可能（replicatable）なヌクレオチド配列が意味され、特に、Watson（ワトソン）-Crick（クリック）の塩基対形成または三重鎖形成以外の機構によって選ばれた非オリゴヌクレオチド分子または分子の群を認識することができる。ここに明らかにされるアプタマー類には、制限がなく、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド類似物、修飾されたヌクレオチドおよび骨格の修飾、枝分れ部位および

50

非ヌクレオチド残基、グループまたはブリッジを含むヌクレオチドが含まれる規定された配列セグメントおよび配列が包含される。本発明でのアプタマー類には、部分的に、そして完全に一本鎖および二重鎖ヌクレオチド分子および配列、合成RNA、DNAおよびキメラのヌクレオチド、ハイブリッド、デュプレックス（二本鎖）、ヘテロデュプレックス、および任意のリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはそのキメラのカウンターパートおよび/または対応する相補的な配列、プロモーターまたは、アプタマー分子または配列のすべてまたは一部を増幅、転写または複製するのに必要なプライマー-アニーリング配列が含まれる。アプタマーは、特に、可溶性な、不溶性な、または固定化された選ばれた分子（例は、リガンド、受容体およびエフェクター（効果器）分子）と特異的に結合することができる。あるいはまた、用語「アプタマー」は、特定の結合と明確に異なる機構によって、化学的に穏やかな（chemically bland）表面の形状に特有の認識ができるヌクレオチドを含む。まさにこの発明でのアプタマー類は、特に、選ばれた標的分子（例は、リガンドまたは受容体）の化学的アイデンティティ（同一性）よりもむしろ化学的に穏やかな表面（例は、シリコンチップまたはカーボンナノ構造）を含む構造的形状または表面上の特長を認識するために選定されうる。アプタマーは、それ自体だけに（unto itself）分子であり、またはヌクレオチド分子または分子、例は、合成ヘテロポリマー、多価ヘテロポリマーのハイブリッド構造またはアプタマーの多分子装置を含む規定された配列セグメントまたはアプタマーの配列の群が含まれる配列セグメントでありうる。

#### IV. 本発明の組成物を作成する方法

##### 【0173】

この技術における者によって理解されるように、組成物はこの技術において既知の様々な技術を用いて作成することができる。例えば、米国特許第6,013,459号、6,248,229、7,018,523、7,267,939号明細書、米国特許出願番号第09/096593および60/980,733、米国仮出願で、本出願と並行して出願される「Electrochemical Assay for the Detection of Enzymes（酵素の検出のための電気化学的アッセイ）」と題し、特に合成と関係した教示のために、それらの開示を参照。

##### 【0174】

1種の具体例において、図3に描くように、本発明の組成物を作成する。この具体例で、捕獲リガンドの付着のために官能基を含む種が備わる電極が用いられ、そしてその組成物が作成された後、相補的官能基を有する捕獲リガンドが添加され、捕獲リガンドの表面への基本的に自然発生的な付加がもたらされる。この技術における者によって理解されるように、用いることができる多種多様な官能基/相補的官能基がある。適切な官能基には、制限されないが、マレイミド、イミドエステル、N-ヒドロキシサクシニミジル、ハロゲン化アルキル、アリールハロゲン化物、アルファ-ハロ・アシルおよびピリジル（pyridyl）ジスルフィドが含まれる。概して、対応する/相補的な官能基は、スルフヒドリル、アミン、アミン、スルフヒドリル、スルフヒドリル、スルフヒドリルおよびスルフヒドリルのそれぞれである。この技術における者によって理解されるように、これらの官能基の方向性（オリエンテーション）をスイッチする（切替える）ことが可能であり、例は、スルフヒドリルが、付着リンカー上で存在し、そしてマレイミドは捕獲リガンドとして用いる生体分子に加えられる。

##### 【0175】

ここに注目されるように、付着の方法は、2つの構成要素上で存在する反応基に依存する。模範的な具体例において、本発明でのハプテンの反応性官能基および反応性部分の官能基は、求電子剤および求核剤を含み、それらは、その間の共有結合のつながりを生じさせることができる。あるいはまた、反応性官能基は、光活性化することができる基を含み、それは適切な波長の光を伴うイルミネーション（照明）の後でだけ化学的に反応性になる。典型的に、反応性官能基および反応性パートナー（反応性の相手）の間の共役反応は、反応性官能基の1種またはそれよりも多くの原子を招き、または反応性パートナーは、2つの構成要素を付着する新しい連結に組み込まれる。官能基および連結の選ばれた例を表

1に示し、そこでは、求電子基および求核基の反応は共有結合のつながりを産生する。

【表 1】

表 1: 求電子および求核の反応性基を有する有用な共有結合の連結への若干のルートの例

求電子基	求核基	得られる共有結合連結
活性化エステル*	アミン/アニリン	カルボキサミド
アシルアジド**	アミン/アニリン	カルボキサミド
ハロゲン化アシル	アミン/アニリン	カルボキサミド
ハロゲン化アシル	アルコール/フェノール	エステル
アシルニトリル	アルコール/フェノール	エステル
アシルニトリル	アミン/アニリン	カルボキサミド
アルデヒド	アミン/アニリン	イミン
アルデヒドまたはケトン	ヒドラジン	ヒドラゾン
アルデヒドまたはケトン	ヒドロキシルアミン	オキシム
ハロゲン化アルキル	アミン/アニリン	アルキルアミン
ハロゲン化アルキル	カルボン酸	エステル
ハロゲン化アルキル	チオール	チオエーテル
ハロゲン化アルキル	アルコール/フェノール	エーテル
アルキルスルホン酸塩	チオール	チオエーテル
アルキルスルホン酸塩	カルボン酸	エステル
アルキルスルホン酸塩	アルコール/フェノール	エーテル
無水物	アルコール/フェノール	エステル
無水物	アミン/アニリン	カルボキサミド
アリアルハロゲン化物	チオール	チオフェノール
アリアルハロゲン化物	アミン	アリアルアミン
アジリジン	チオール	チオ・エーテル
ボロナート	グリコール	ボロナートエステル
カルボン酸	アミン/アニリン	カルボキサミド
カルボン酸	アルコール	エステル
カルボン酸	ヒドラジン	ヒドラジド
カルボジイミド	カルボン酸	N-アシル尿素または無水物
ジアゾアルカン	カルボン酸	エステル
エポキシド	チオール	チオエーテル
ハロアセトアミド	チオール	チオエーテル
ハロトリアジン	アミン/アニリン	アミノトリアジン
ハロトリアジン	アルコール/フェノール	トリアジニルエーテル
イミドエステル	アミン/アニリン	アミジン
イソシアン酸塩	アミン/アニリン	尿素
イソシアン酸塩	アルコール/フェノール	ウレタン
イソチオシアン酸塩	アミン/アニリン	チオ尿素
マレイミド	チオール	チオエーテル
ホスホラミダイト	アルコール	リン酸塩エステル
シリルハロゲン化物	アルコール	シリルエーテル
スルホン酸塩エステル	アミン/アニリン	アルキルアミン
スルホン酸塩エステル	チオール	チオエーテル
スルホン酸塩エステル	カルボン酸	エステル
スルホン酸塩エステル	アルコール	エーテル
スルホニル基ハロゲン化物	アミン/アニリン	スルホンアミド
スルホニル基ハロゲン化物	フェノール/アルコール	スルホン酸塩エステル

10

20

30

40

50

## 【0176】

\* 活性化されたエステル類はこの技術において理解されるように、概して、式-CO を有し、式中、 は良好な脱離基（例は、オキシサクシニミジル（ $-\text{OC}_4\text{H}_4\text{O}_2$ ）オキシスルホサクシニミジル（ $-\text{OC}_4\text{H}_3\text{O}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ）、-1-オキシベンゾトリアゾリル（ $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{N}_3$ ）；または、ニトロ、フルオロ、クロロ、シアノ、またはトリフルオロメチル、またはその組合せのような電子求引性置換基によって、1またはそれよりも多くの回数置換されたアリールオキシ基またはアリールオキシであって、活性化されたアリールエステル類を形成するのに用いられるもの；または、カルボジイミドによって活性化されたカルボン酸で、無水物または混合された無水物- $\text{OCOR}^a$ または- $\text{OCNR}^a\text{NHR}^b$ を形成するもの（式中、 $\text{R}^a$ および $\text{R}^b$ は、それらが同じか、または異なってよく、それは $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ ペルフルオロアルキル、または $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ アルコキシである）；またはシクロヘキシル、3-ジメチルアミノプロピル、またはN-モルホリノエチル）。

\*\* アシルアジドはまたイソシアン酸塩に再配置することができる。

## 【0177】

官能基および相補的官能基はまた、柔軟性または立体的な堅さのために、リンカーを含むこともでき、場合によってはまたは他の理由でありうる。

## 【0178】

図は官能基および相補的な官能基の存在を描くが、場合によっては、付加が、これらの基からの原子の損失を招き、そしてこのようにこれが、全体の官能基および相補的な官能基が最終的な組成において存在するときに、ある状況を描くことは意味されない。

## 【0179】

加えて、図は「単官能基」のリンカー、例は、マレイミドの使用を描く。ホモ-またはヘテロの二官能性基のいずれも利用する追加的な工程を含むことも可能である（1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross linkers, pages 155-200を参照し、ここに参照することによって組み込む）。例えば、1種の終端上でイオウ原子および他の端部上でアミノ基を含む付着リンカーは、アミンと反応する二官能性基のリンカーと反応することができ、そしてその後、アミノ基を含む捕獲リガンドを加えることができる。

## 【0180】

別の具体例において、本発明の組成物は、各々の構成要素を合成し、そして通常、同時に、それらを電極に添加することによって作成される。つまり、図12Aの具体例において、例えば、付着リンカー（イオウ原子のような付着の機能的な部分を有するもの）、リガンド、遷移金属および結合性リガンドを含むREAMCが作成され、そして電極に加えられる（任意にSAM形成性種を有する）。同様に、2つまたは3つの構成要素のシステムは、図1Bにおいて、付着リンカーおよび付着官能基を有するEAMを含む第1の種、捕獲リガンドを有する付着リンカーを含む第2の種、およびSAM形成性種の任意の第3の種を伴い、それらは電極に対して、通常、同時に、加えられる。場合によっては、構成要素は順に加えることができ、そして場合によっては、余分のSAM形成性種（および/または他の構成要素）を任意の加熱とともに加えることで行われるポスト合成工程は電極の上で良好なパッキング（包装）を確実にするために行うことができる。

## 【0181】

若干の具体例において、リガンドは官能性をもつことができ、それはアンカーおよび捕獲リガンドを、金属複合体が形成されたあと、それに加えることが許される。

## 【0182】

若干の具体例において、化合物は段階を追って合成される。このように、捕獲リガンドおよびアンカーは、順にEAMのリガンドに加えられる。

## 【0183】

若干の具体例において、捕獲リガンドおよびアンカーは、付随してEAMに加えられる。

## 【0184】

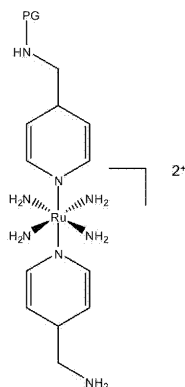
若干の具体例において、「クリップ」は、最初にEAMに加えられ、そして捕獲リガンド

およびアンカー基は後に「クリップ」に加えられる。ここで「クリップ」によって、共有結合的にEAMに付着することができる基または部分が意味され、そしてそれに、捕獲リガンドおよび/またはアンカー基を加えることができた。

【0185】

クリップの1種を以下で示す。

【化22】



式中、PG=保護基である。

【0186】

若干の具体例において、そこではペンタアンミンを調整性リガンドとして用い、捕獲リガンドを最初に加えることができ、そしてアンカー基を捕獲リガンドに加える。

【0187】

本発明の組成物は、様々な研究、臨床的、品質管理、実地試験セッティングにおいて用い

【0188】

ここに提供される例は、説明目的だけのためであり、そして本発明の範囲を制限する意味ではない。さらに、ここで引くすべての参考文献は、その中のすべての関連した内容のために、参照することによって組み込む。

#### V. 本発明の組成物を用いる方法

##### A. 標的被分析物および試料

【0189】

1局面において、本発明は、標的被分析物の検出において有用な方法および組成物を提供する。「標的被分析物」または「被分析物」または文法上の等価物は、ここで、検出される任意の分子または化合物を意味し、そしてそれは結合性の種（例は、以下に規定する捕獲リガンド）と結合することができる。適切な被分析物には、制限されないが、環境上、または臨床上の化学物質または汚染物質または生体分子のような小さい化学的分子が含まれ、制限されないが、農薬、殺虫剤、毒素、治療上のおよび乱用される薬物、ホルモン類、抗生物質、抗体、有機物質、等が含まれる。適切な生体分子には、制限されないが、タンパク質（酵素、免疫グロブリンおよびグリコプロテインを含み）、核酸、脂質、レクチン、糖質、ホルモン類、全体細胞（原核生物の（病原性細菌のようなもの）および真核生物の細胞を含み、哺乳類の腫瘍細胞を含む）、ウイルス、孢子、その他が含まれる。特に好ましい被分析物は、タンパク質であり、酵素；薬物、細胞；抗体；抗原；細胞膜抗原および受容体（神経、ホルモン、栄養、および細胞表面レセプター）またはそれらのリガンドを含む。

【0190】

若干の具体例において、標的被分析物はシトクロムP450、アビジン/ストレプトアビジン、SEB、PSA-（プロテアーゼ）、トリプシン（trypsin）/キモトリプシン（chymotrypsin）（プロテアーゼ）、炭疽菌の孢子およびE. coli（エシェリキア・コリ）0157:H7である。

【0191】

若干の具体例において、標的被分析物はタンパク質である。この技術における者によ

て理解されるように、本発明を用いて検出する多数の可能性があるタンパク性標的被分析物がある。ここでは「タンパク質」または文法上の等価物によって、タンパク質、オリゴペプチドおよびペプチド、誘導体および類似物で、非自然に発生するアミノ酸およびアミノ酸類似物を含むタンパク質を含むもの、およびペプチド模倣薬の構造が意味される。側鎖は、(R)または(S)の立体配置のいずれでもよい。好適例において、アミノ酸は(S)またはL-立体配置である。以下に議論するように、タンパク質が捕獲リガンドとして用いられるとき、試料の汚染物質による劣化を遅らせるためにタンパク質の類似物を利用することは望ましい場合がある。

#### 【0192】

適切なタンパク質標的被分析物には、制限されないが、(1)免疫グロブリン、特にIgE、IgGsおよびIgMs、および特に治療上または診断上関連した抗体で、制限されないが、例えば、ヒトアルブミン、アポリボタンパク質（アポリボタンパク質Eを含む）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、コルチゾール、 $\alpha$ -フェトプロテイン、チロキシン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、アンチトロンピン、製薬に対する抗体（抗てんかん作用の（antiepileptic）薬物（フェニトイン、プリミドン、カルバリエゼピン（carbamazepine）、エトサクシミド、バルプロ酸、およびフェノバルビトール（phenobarbital））、心臓作用薬（強心剤）（ジゴキシン、リドカイン、プロカインアミド、およびジソピラミド）、気管支拡張薬（テオフィリン）、抗生物質（クロラムフェニコール、スルホンアミド）、抗うつ薬、免疫抑制剤、乱用される薬物（アンフェタミン、メタンフェタミン、カンナビノイド、コカインおよびアヘン剤）および任意の多くのウイルスに対する抗体（オルソミクソウイルス（例は、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例は、呼吸器合胞体（RS）ウイルス、ムンプス（耳下腺炎）ウイルス、はしかウイルス）、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、トガウイルス（例は、風疹ウイルス）、パルボウイルス、ポックスウイルス（例は、痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス）、エンテロウイルス（例は、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス）、肝炎ウイルス（A、BおよびCを含む）、ヘルペスウイルス（例は、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス）、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、ハンタウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルス（例は、狂犬病ウイルス）、レトロウイルス（HIV、HTLV-Iおよび-IIを含む）、パパーバウイルス（例は、乳頭腫ウイルス）、ポリオーマウイルス、およびピコルナウイルス、などを含む）、および細菌（関心のある多種多様な病原性の、および非病原性の原核生物がまれ、それには；バチルス属；ビブリオ属、例は、*V. cholerae*（コレラ菌）；エシェリキア（大腸菌類）、例は、*Enterotoxigenic E. coli*（毒素原性大腸菌）、赤痢菌、例は、*S. dysenteriae*（志賀赤痢菌）；サルモネラ属、例は、*S. typhi*（チフス菌）；マイコバクテリウム、例は、*M. tuberculosis*（結核菌）、*M. leprae*（ライ菌）；クロストリジウム属、例は、*C. botulinum*（ボツリヌス菌）、*C. tetani*（破傷風菌）、*C. difficile*（クロストリジウム・ディフィシル）、*C. perfringens*（ウェルシュ菌）；コリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）、例は、*C. diphtheriae*（ジフテリア菌）；連鎖球菌属、*S. pyogenes*（化膿性連鎖球菌）、*S. pneumoniae*（肺炎球菌）；ブドウ球菌属、例は、*S. aureus*（黄色ブドウ球菌）；ヘモフィルス属、例は、*H. influenzae*（インフルエンザ菌）；ナイセリア属、例は、*N. meningitidis*（髄膜炎菌）、*N. gonorrhoeae*（淋菌）；エルシニア属、例は、*G. lamblia*（ランブル鞭毛虫）、*Y. pestis*（ペスト菌）、シュールドモナス属、例は、*P. aeruginosa*（緑膿菌）、*P. putida*（ブチダ菌）；クラミジア属、例は、*C. trachomatis*（トラコーマクラミジア）；ボルデテラ属、例は、*B. pertussis*（百日咳）；トレポネーマ属、例は、*Treponema palladium*（梅毒トレポネーマ）；およびその他）に対する抗体が含まれ；(2)酵素（および他のタンパク質）で、制限されないが、心臓病の指標またはそのための処置として使われる酵素で、クレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノ転移酵素、トロポニンT、ミオグロビン、フィブリノゲン、コレステロール、トリグリセリド、トロンビン、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）を含み；膵臓疾患の指標で、アミラーゼ、リパーゼ、キモトリプシンおよびトリプシ

10

20

30

40

50

ンを含み；肝機能酵素およびタンパク質で、コリンエステラーゼ、ビリルビンおよびアルカリ性ホスファターゼ（phosphatase）を含み；アルドラーゼ、前立腺酸性ホスファターゼ、末端デオキシヌクレオチド転移酵素およびHIVプロテアーゼのような細菌およびウイルスの酵素；(3)ホルモン類およびサイトカイン（その多くは、細胞レセプターのためのリガンドとしてはたらく）で、エритроポイエチン（EPO）、トロンボポエチン（TPO）、インターロイキン（IL-1からIL-17を通して含む）、インシュリン、インシュリン様増殖因子（IGF-1および-2を含む）、上皮細胞増殖因子（EGF）、形質転換増殖因子（TGF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ を含む）、ヒト成長ホルモン、トランスフェリン、上皮細胞増殖因子（EGF）、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、レプチン、VEGF、PDGF、毛様体神経栄養因子、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、カルシトニン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、コルチゾール（cortisol）、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体（leutinizing）ホルモン（LH）、プロゲステロン（progesterone）、テストステロン；および(4)他のタンパク質（ $\alpha$ -フェトプロテイン、癌胎児抗原CEAを含む）が含まれる。

#### 【0193】

加えて、抗体が検出されうる任意の生体分子は、同様に直接検出することができ、つまり、ウイルスまたは細菌の細胞、治療上のおよび乱用される薬物の検出、その他が直接行われうる。

#### 【0194】

適切な標的被分析物は、糖質（炭水化物）を含み、制限されないが、胸部（乳）がん（CA15-3、CA 549、CA 27.29）、ムチン様癌腫関連の抗原（MCA）、卵巣がん（CA125）、膵がん（DE-PAN-2）、および結腸直腸および膵性がん（CA 19、CA 50、CA242）のためのマーカー（標識）が含まれる。

#### 【0195】

この技術における者によって理解されるように、多数の被分析物を本方法を用いて検出することができ、基本的に、結合性リガンドが以下に記述され、作成されるかもしれない任意の標的被分析物も、本発明の方法を用いて検出する。

#### 【0196】

若干の具体例で、標的被分析物は、MRSAに関連したタンパク質である。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）（また、多重抵抗性（multiple-resistant）*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）またはオキサシリン耐性黄色ブドウ球菌（ORSA）とも称する）は、ヒトにおいて処置するのが難しい感染の原因である。MRSAはラクタムと呼ばれる抗生物質の大きな集団に耐性がある黄色ブドウ球菌の種であり、それには、ペニシリンおよびセファロスポリンが含まれる。

#### 【0197】

有機体は地域関連（Community-Associated）MRSA（CA-MRSA）または健康管理関連（Health Care-Associated）MRSA（HA-MRSA）として下位範疇化されることが多いが、この区別は複雑である。若干のものは、他の著者がバクテリア自体の遺伝子の特徴によってCA-MRSAを決定する一方、MRSA感染を患っている患者に関連した基準によってCA-MRSAが規定された。CA-MRSA株は、1990年代後期に最初に報告され、これらのケースは、健康管理セッティングへの曝露の欠如によって規定された。次の数年で、CA-MRSA感染症が、高齢の、およびより一層良好に調査されたヘルスケア関連の株と異なったMRSAの株によって引き起こされたことが明白になった。新しいCA-MRSA株は、アメリカ合衆国において迅速に広がり、都市の緊急治療室でこれらの感染のために治療を求める個体の間で培養された皮膚感染の最も一般的な原因になった。これらの菌株は、アスリート、刑務所および刑務所抑留者、兵士、ネイティブアラスカン（アラスカ先住民）およびネイティブアメリカンで普通に、そして都心で子供たちに皮膚感染を起こす。

#### 【0198】

MRSAは、普通の細菌の黄色ブドウ球菌の抵抗性変種である。それは、メチシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、およびオキサシリンを含め、ベータラクタマーゼ耐性ベータ

10

20

30

40

50

ラクタム抗生物質での処置を生き残るための能力を発展させた。MRSAは、特に病院関連の（院内で起こる）感染症において厄介である。病院で、開いた創傷を有する受動体（患者）、侵襲性装置、および弱められた免疫系は、感染のために、一般市民より一層大きな危険性がある。適切な衛生上の手法に従わない病院スタッフは、患者から患者へ細菌を移すかもしれない。指示される場合、MRSA感染症またはMRSAコロニー形成を有する患者への訪問客は提供された手袋、ガウン、およびマスクを用いて病院隔離プロトコルに従うように勧められる。そのようなプロトコルに従わない訪問客は、細菌をカフェテリア、バスルーム、およびエレベーターに広めることになる。

#### 【0199】

若干の具体例で、MRSA関連のタンパク質は、ペニシリン結合タンパク質2a（PBP2a）である。PBP2 はmecA遺伝子によってコードされたタンパク質であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌およびコアグラゼ（凝固促進酵素）陰性ブドウ球菌（coagulase-negative staphylococci）の膜において存在する。PBP2 の調製は、この技術において既知の方法で、Hardy Diagnostics（ハーディ・ダイアグノスティック社）（Santa Maria（サンタマリア）、CA（米国カリフォルニア州））によって配布されるPBP2 キットのためのMRSA Latex Test（ラッテックス・テスト）において記述されるプロトコルのようなものを用いて遂行することができる。

#### 【0200】

若干の具体例で、標的はMRSAのPBP2aタンパク質であり、そして捕獲リガンドはPBP2aと結合することができる部分である。

#### 【0201】

「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または文法上の等価物は、ここで、共有結合的に一緒に連結される少なくとも2つのヌクレオチドが意味される。本発明での核酸は概して、リン酸ジエステル結合を含むが、場合によっては、以下で概説されるように、核酸の類似体は、代替りのバックボーン（骨格）をもつことがあり、例えば、ホスホラミド（Beaucage（ボーケージ）ら、Tetrahedron（テトラヘドロ）49（10）：1925（1993）およびその中の言及；Letsinger（レットシンガー）、J. Org. Chem. 35: 3800（1970）；Sprinzl（スプリンツェル）ら、Eur. J. Biochem. 81: 579（1977）；Letsingerら、Nucl. Acids Res. 14: 3487（1986）；Sawai（サワイ）ら、Chem. Lett. 805（1984）、Letsingerら、J. Am. Chem. Soc. 110: 4470（1988）；およびPauwels（ポーウェル）ら、Chemica Scripta 26: 141 91986）、ホスホロチオネート（Mag（マグ）ら、Nucleic Acids Res.、19: 1437（1991）；および米国特許第5,644,048号明細書）、ジチオリン酸（Briu（ブリウ）ら、J. Am. Chem. 111: 2321（1989）（O-メチルホスホロアミダイト（methylphosphoramidite）リンケージ）（Eckstein（エクスタイン）、Oligonucleotides and Analogues（オリゴヌクレオチドおよび類似体）：A Practical Approach（実際的なアプローチ）、Oxford University Press（オックスフォード大学出版部）参照）、およびペプチド核酸骨格およびリンケージ（Egholm（エゴルム）、J. Am. Chem. Soc. 114:1895（1992）；Meier（マイアー）ら、Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008（1992）；Nielsen（ニールセン）、Nature, 365:566（1993）；Carlsson（カールソン）ら、Nature 380:207（1996）参照、それらのすべてを参照することによって組み込む）が含まれる。他の類似体の核酸は、正の骨格（positive backbone）（Denpcy（デンブシ）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097（1995）；非イオン性骨格（米国特許第5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141および4,469,863号明細書；Kiedrowski（キードロウシ）ら、Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423（1991）；Letsinger ら、J. Am. Chem. Soc. 110:4470（1988）；Letsinger ら、Nucleoside & Nucleotide 13:1597（1994）；Chapters 2および3, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research（アンチセンス研究における糖質修飾）”, Y.S. Sanghui（サングイ）およびP. Dan Cook（P.ダン・クック）；Mesmaeker（メスマエカー）ら、Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395（1994）；Jeffs（ジェフス）ら、J. Biomolecular NMR 34:17（1994）；Tetrahedron Lett. 37:743（1996））および非リボース骨格、米国特許第5,235,033および5,034,506号明細書に記載さ

10

20

30

40

50



れているものを含み、およびChapters 6および7, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y.S. SanghuiおよびP. Dan Cook.

Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included with in the definition of nucleic acids (1またはそれよりも多い炭素環式糖を含む核酸はまた核酸の定義内に含まれる) (Jenkins (ジェンキンス) ら, Chem. Soc. Rev. (1995) p p169-176参照) を有するそれらを含む。いくつかの核酸の類似体は、Rawls (ラウルズ), C & E News June 2, 1997年第35頁に記述される。これらの参考文献のすべては、参照することによってここに明示的に組み込む。リボース-リン酸塩骨格のこれらの修飾は、ETMsの付加を容易にし、または生理的環境でのそのような分子の安定性および半減期を増加するために行われうる。

10

#### 【0202】

この技術における者によって理解されるように、これらの核酸の類似体のすべては本発明での使用が見出されうる。そのうえ、自然に発生する核酸および類似体の混合物を作成することができ、例えば、伝導性のオリゴマーまたはEAM付着の部位で、類似体構造を用いる。あるいはまた、異なる核酸の類似体の混合物、および自然に発生する (occurring) 核酸および類似体の混合物を作成しうる。

#### 【0203】

核酸は、指定されるように、一本鎖または二重鎖であるか、または双方の二重鎖または一本鎖の配列の部分を含みうる。核酸は、DNA (ゲノムおよびcDNAのいずれも)、RNAまたはハイブリッドでよく、ここで、核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの任意の組合せ、およびウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン (xanthine) ヒポキサンチン (hypoxanthine)、イソシトシン、イソグアニン、その他の塩基の任意の組合せを含む。概して、米国特許第5,681,702号明細書に記述されているように、好ましい具体例は、他のプローブで、標的配列よりもむしろ相補的にされている核酸においてイソシトシンおよびイソグアニンを利用し、これが非特異的ハイブリダイゼーションを減らす。ここに用いるように、「ヌクレオシド」という語はヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体だけでなくヌクレオチド、そしてアミノ修飾されたヌクレオシドのような修飾されたヌクレオシドを含む。そのうえ、「ヌクレオシド」には、非自然に発生する類似体構造を含む。このように、例えば、ペプチド核酸の個々の単位は、各々が塩基を含み、ここではヌクレオシドと称する。

20

30

#### 【0204】

若干の具体例で、核酸標的被分析物は好ましくない。

#### 【0205】

概して、試料は本発明の組成物に加えられる。1局面において、本発明は、試料で標的酵素を検出する方法を提供する。「試料 (サンプル)」または「試験試料」によって、ここに、検出される被分析物または被分析物を含む組成物が意味される。サンプルは異質であることがあり、いろいろな構成要素、すなわち異なるタンパク質を含む。あるいはまた、サンプルは同種でありえ、1種の構成要素を含む。サンプルは、自然発生性で、生物学的物質、または人工物質であることができる。物質は、天然または変性した形態であることができる。サンプルは、単細胞または複数の細胞、血液サンプル、組織サンプル、皮膚サンプル、尿サンプル、水サンプル、または土壌サンプルでありうる。若干の具体例において、サンプルは単細胞の内容物、または複数の細胞の内容物を包含する。サンプルは生きている有機体で、真核生物、原核生物、哺乳類、ヒト、酵母 (イースト)、または細菌のようなもの由来でありえ、またはサンプルはウイルス由来であることができる。サンプルは任意の処置を伴わず、または必要に応じて伴って用いることができる。

40

#### 【0206】

若干の具体例において、標的被分析物は、試験サンプル中に含まれ、存在する場合、標的被分析物が捕獲結合性リガンドと結合する状況下で、本発明の組成物に加えられる。これらの状況は、概して、生理的状況である。概して、複数のアッセイ混合物は、種々の濃度に対する異なった反応を得るために、異なる濃度と共に平行して運転する。典型的に、

50

これらの濃度のうちの1種は、陰性コントロールとして用いられ、すなわち、0濃度で、または検出レベルよりも低い。そのうえ、任意のいろいろな他の試薬も、スクリーニング（ふるい分け）アッセイに含まれる。これらには、塩類、中性タンパク質のような試薬、例は、アルブミン、洗剤、等で、最適な結合を容易にし、および/または非特異的な、または背景相互作用を減らすのに用いられるものを含む。また、さもなければ、アッセイの効率を改善する試薬で、プロテアーゼインヒビター（抑制剤）、ヌクレアーゼ抑制剤、抗微生物薬剤、その他のようなものが用いられる。構成要素の混合物は、任意の順序で加えることができ、必要な結合を提供する。

#### 【0207】

この技術における者によって理解されるように、多数の被分析物は本方法を用いて検出され、基本的に、捕獲リガンドで、以下に記載し、作成されるもののための任意の被分析物が、本発明の方法を用いて検出される。

10

#### 【0208】

加えて、この技術における者は、信号の損失に頼るアッセイにおいて本発明の組成物を用いることも可能であることを認める。例えば、酸化還元活性分子が抑制されるとき、最初の測定がされ、そして次いで、システムは標的被分析物の導入の結果として変化し、溶媒抑制された分子が溶媒接触可能にされ、信号の損失がもたらされる。これはいくつかのやり方において行われ、それはこの技術における者によって理解される。

#### 【0209】

若干の具体例において、標的被分析物が存在するとき、第1の測定が採られる。例えば、高い塩濃度または熱の状況を用いて、標的被分析物をその後除去し、そして次いで、第2の測定をする。信号の損失の定量化はアッセイの基礎として役立つことができる。

20

#### 【0210】

あるいはまた、標的被分析物は酵素でありうる。この具体例では、酸化還元（レドックス）活性分子は、酵素基材または類似体の存在によって抑制された溶媒を作成し、好ましくは、しかし要求されないが、レドックス活性分子に好ましくは、1つまたはそれよりも多くのリガンドとして、共有結合的に付着される。標的酵素の導入の際に、レドックス活性分子が溶媒を接触可能にするように、酵素は、基材が開裂され、またはさもなければ立体的に変わるために、基材と関係する。この変化は次いで検出することができる。この具体化は、それが信号の増幅をもたらすという点で有利であり、それは単一の酵素分子が多重の溶媒接触可能な分子を招くことができるからである。これは、特定の使用を細菌または他の病原体の検出において見出し、それらは酵素、特にスカベンジャープロテアーゼまたはカルボヒドラーゼを分泌する。

30

#### 【0211】

若干の具体例で、標的被分析物はプロテアーゼである。プロテアーゼは6つの群に分類され、すなわち、セリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、およびグルタミン酸プロテアーゼである。概して、プロテアーゼは、タンパク質のアミノ酸配列に従い、特定のペプチド結合（例は、限られたタンパク質分解のための特定のセグメント）を壊すことができ、またはアミノ酸（無制限のタンパク質分解）に完全なタンパク質を分解することのいずれもできる。活性は破壊的な変化であり、タンパク質の機能をだめにするか、その主要な構成要素にまでそれを消化し、それは機能の活性化でありえ、またはそれはシグナリング経路の信号であることができる。

40

#### 【0212】

若干の具体例で、標的酵素はエンドペプチターゼである。ここで、「エンドペプチターゼ」によって、タンパク質基板の範囲内でペプチド結合を壊すペプチダーゼが意味され、それは、タンパク質基材の一方または双方の終端からのペプチド結合を壊すエキソペプチダーゼと対照的である。エンドペプチターゼは、触媒メカニズムに基づいてサブクラスに分けられ、すなわち、セリンエンドペプチターゼ、システインエンドペプチターゼ、アスパラギン酸エンドペプチターゼ、メタロエンドペプチダーゼ、および他のエンドペプチタ

50

ーゼである。

【0213】

(1). セリンエンドペプチダーゼ

【0214】

このクラスは、2つの異なったファミリー（族）を含む。哺乳類の酵素で、キモトリプシン、トリプシンまたはエラスターゼまたはカリクレインのようなものを含むキモトリプシン族、およびサブチリシンのような細菌の酵素を含むサブスチリシン（subtilisin）族がある。一般的な三次元（3D）構造は2つの族で異なり、しかし、それらは、同じ活性部位の幾何学をもち、そして触媒作用は同じメカニズムによって進行する。セリンエンドペプチターゼは、基質残基と相互作用する種々の酵素サブサイトにおいてアミノ酸置換に関連がある異なる基質特異性を示す。若干の酵素は基質との延長した相互作用部位をもつ一方、他は、P1基質残基に制限される特異性をもつ。

10

【0215】

(2). システインエンドペプチダーゼ

【0216】

この族はパパイン、アクチニジンまたはプロメラインのような植物プロテアーゼ、いくつかの哺乳類のカテプシンを含み、リソソームカテプシンおよびカテプシン類B、L、S、H、J、NおよびOが含まれ；シトソルのカルパイン（カルシウムを活性化された）ならびに、いくつかの寄生的なプロテアーゼ（例は、トリパノソーマ属、住血吸虫属）およびカスパーゼを含み、インターロイキン変換酵素（ICE）が含まれる。

20

【0217】

(3). アスパラギン酸エンドペプチターゼ

【0218】

ほとんどのアスパラギン酸エンドペプチターゼはペプシン族に属する。ペプシン族は、ペプシンおよびキモシンならびにリソソームカテプシンDおよび処理酵素で、レニン、および一定の菌類プロテアーゼ（ペニシロペプシン（penicillopepsin）、リゾプスペプシン（rhizopuspepsin）、エンドチアペプシン（endothiapepsin））のような消化酵素を含む。第2の族は、レトロペプシンとも呼ばれるエイズウイルス（HIV）からのプロテアーゼのようなウイルスエンドペプチターゼを含む。

30

【0219】

セリンおよびシステインプロテアーゼと対照的に、四面体の中間体が存在するけれども、アスパラギン酸エンドペプチターゼによる触媒作用が共有結合中間体を含まない。求核攻撃は、2つの同時陽子移動によって達成され、すなわち、水分子からの1つから2つのカルボキシル基の二分子まで、および第2の二分子からの1つから並列のCO-NH結合開裂を有する基質のカルボニル酸素までである。

【0220】

(4). メタロエンドペプチターゼ

【0221】

メタロエンドペプチターゼは、細菌、真菌、ならびにより一層高等な有機体において見出される。それらはそれらの配列およびそれらの構造において大いに異なるが、大多数の酵素は触媒的に活性な亜鉛原子を含む。場合によっては、亜鉛は活性を失わずにコバルトまたはニッケルのような別の金属と取り替えられうる。細菌のサーモリシンはよく特徴づけられ、そしてその結晶学的な構造は亜鉛が2つのヒスチジンおよび1つのグルタミン酸によって結合されることを示す。多くの酵素は配列HEXXHを含み、それは2つのヒスチジンリガンドを亜鉛に提供し、その一方、第3のリガンドが、グルタミン酸（サーモリシン、ネプライシン、アラニルアミノペプチダーゼ）またはヒスチジン（アスタシン）のいずれでもある。他の族は、Zn原子の結合の異なったモードを示す。触媒メカニズムは、切れやすい結合のカルボニル基の上で、亜鉛結合水分子の攻撃の後、非共有結合四面体の中間体の形成を導く。この中間体はさらに、脱離基へのグルタミン酸陽子の移動によって分解される。

40

50

## 【 0 2 2 2 】

特定の関心は、アデノシンデアミナーゼ、アンジオテンシン変換酵素、カルシニユリン、メタロベータラクタマーゼ、PDE3、PDE4、PDE5、腎臓ジペプチダーゼ、およびウレアーゼを含むメタロ（金属）酵素である。

## 【 0 2 2 3 】

1種の具体例で、メタロエンドペプチターゼは、MMP-1からMMP-17までを通して、特にMMP-1、MMP-2、MMP-7およびMMP-9を含むマトリクスメタロプロテイナーゼである。

## 【 0 2 2 4 】

(5). 細菌/毒素エンドペプチダーゼ

## 【 0 2 2 5 】

通常、細菌の起源の毒素エンドペプチターゼは、宿主（ホスト）有機体において破壊的で、および時々致命的な影響をもつことがある。より一層よく知られた細菌のエンドペプチターゼ毒素の若干を、表1において下に挙げる。

## 【 0 2 2 6 】

## 【表 2】

表 2 (Table 1) 細菌エンドペプチダーゼ

有機体/毒素	作用のモード	標的 (開裂部位)	病気
炭疽菌/致死因子	メタロプロテアーゼ	MAPKK1/MAPKK2 (多重)	炭疽病
ボツリヌス菌/ニューロトキシン A	亜鉛メタロプロテアーゼ	SNAP-25 (ANQ/RAT)	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン B	亜鉛メタロプロテアーゼ	VAMP/シナプトブレビン (ASQ/FET)	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン C	亜鉛メタロプロテアーゼ	シンタキシン (TKK/AVK)	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン D	亜鉛メタロプロテアーゼ	VAMP/シナプトブレビン (DQK/LSE)	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン E	亜鉛メタロプロテアーゼ	SNAP-25 (IDR/IME)	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン F	亜鉛メタロプロテアーゼ	VAMP/シナプトブレビン	ボツリヌス症
ボツリヌス菌/ニューロトキシン G	亜鉛メタロプロテアーゼ	VAMP/シナプトブレビン (TSA/AKL)	ボツリヌス症
エルシニア属病原性因子 YopJ	システインプロテアーゼ	未知	
エルシニア属病原性因子 YopT	システインプロテアーゼ	プレニル化システイン	
サルモネラ属病原性因子 AvrA	未知	未知	サルモネラ症
破傷風菌/破傷風毒素	亜鉛メタロプロテアーゼ	VAMP/シナプトブレビン (ASQ/FET)	破傷風

## 【 0 2 2 7 】

ボツリヌス菌のニューロトキシン (BoNTs、血清型A-G) および破傷風菌の破傷風ニューロトキシン (TeNT) は細菌の毒素の2つの例であり、それらはエンドペプチターゼである。BoNTsは最も一般的には初期および食物性ボツリヌス症と関係し、および腸にある間、神経毒と、毒素分子に保護と安定性を提供すると思われる1つまたはそれよりも多くの関係するタンパク質から構成される大きな複合体として自然に存在する。TeNTは、創傷中の植物性破傷風菌から合成され、他の任意のタンパク質成分と複合体を形成しないようにみえる。

#### 【0228】

BoNTsは、特に神経シナプス膜でシナプス小囊のドッキングをコントロールする小さなタンパク質を開裂させる、非常に特異的な亜鉛依存的なエンドプロテアーゼである。BoNT AおよびBoNT Eは、特異的に25kDのシナプトソームの関係するタンパク質 (SNAP-25 (スナップ)-25) を開裂させ、BoNT Aで残基Q197およびR198の間で開裂させる。SNAP-25は、神経伝達物質放出の規制に関与するシナプス前プラズマ膜タンパク質である。異なるタンパク質アイソフォームをコードする2つの代わりの転写物変異体が、ヒトにおけるこの遺伝子のために記述され、SNAP25A (GenBank (ジェンバンク) 受入番号NP\_003072) およびSNAP25B (GenBank受入番号NP\_570824) である。BoNT Cは、膜タンパク質シンタキシンおよびSNAP-25を開裂させる。BoNT B、D、FおよびGは、細胞内小囊関係の膜関連タンパク質 (VAMP、またシナプトブレビンと称される) に特有である。Schiavo (スキアボ) ら、JBC 266: 23784-87 (1995); Schiavoら、FEBS Letters 335: 99-103 (1993)を参照し、ここに、それらを全体としてそのまま参照することによって組み込む。

10

20

#### 【0229】

いくつかの試験管内のアッセイは、固定化された合成ペプチド基材の開裂に基づいて展開された。Hall (ホール) ら、J Clin Microbiol 34: 1934-8 (1996); Witcome (ウィットカム) ら、Appl Environ Microbiol 65: 3787-92 (1999)、およびAnne (アン) ら、Ana. Biochem 291: 253-61 (2001)。

#### 【0230】

BoNTsおよびTeNTはコード化されるプラスミド (TeNT、BoNTs/A、G、およびおそらくB) またはコード化されるバクテリオファージ (BoNTs/C、D、E、F) のいずれでもあり、そして神経毒は150kDaの不活性ポリペプチドとして合成される。BoNTsおよびTeNTは、溶解した細菌の細胞から放出され、それから神経毒ポリペプチドにおいて露出されたループのタンパク質分解の開裂によって活性化される。各々の活性神経毒分子は、1つの重鎖 (100kDa) および軽鎖 (50kDa) からなり、ジスルフィド結合によって単一の鎖間によって連結される。BoNTsおよびTeNTの双方の重鎖は、2つのドメインを含み、すなわち、分子のN末端半分に位置付けされる毒素の移動のために必要な領域および重鎖のC末端の範囲内で位置付けされる細胞結合性ドメインである。BoNTsおよびTeNTの双方の軽鎖は、分子の亜鉛依存的なプロテアーゼ活性のために必要とされる亜鉛結合性モチーフを含む。

30

#### 【0231】

BoNTsおよびTeNTの細胞標的は、シナプス前原形質膜へのシナプス小囊、および従って神経伝達物質の放出のために必須なものにドッキングし、および融合するために必要とされる一群のタンパク質である。BoNTsは、末梢神経系と関係した運動ニューロンのシナプス前膜の上の受容体と結合する。これらのニューロンにおいて標的タンパク質のタンパク質分解はアセチルコリンの放出を抑制し、それによって筋収縮を防止する。BoNTs/B、D、FおよびGは、小囊関係の膜タンパク質を開裂させ、そしてシナプトブレビン、BoNT/AおよびEはシナプトソームの関係タンパク質SNAP-25を標的にし、そしてBoNT/CはシンタキシンおよびSNAP-25を加水分解する。TeNTは中枢神経系に影響を及ぼし、2種類のニューロンに入ることによってそうする。TeNTは初期に運動ニューロンのシナプス前膜上の受容体と結合するが、それから脊髄への逆行する小胞輸送によって移動され、そこで神経毒は抑制性介在ニューロンに入ることができる。これらのニューロンにおいての小囊関係の膜タンパク質およびシナプトブレビンの開裂は、グリシンおよびガンマ-アミノ酪酸の放出を中断させ、それは次に、筋収縮を誘発する。BoNTまたはTeNTの中毒 (弛緩性の、および痙攣性

40

50

麻痺のそれぞれ)の対照的な臨床症状は、影響を受ける特定のニューロンおよびブロックされた神経伝達物質のタイプの直接的な結果である。

【0232】

特定の関心は、BoNT/LC(血清型C)、および特にBoNTC/LC(他のLC血清型と比較して)である。最初に、BoNTC/LCは特に重要なバイオテロリズムの脅威をもたらし、それはそれがヒト神経細胞中に長い半減期をもつからである。第2に、おそらくこのLCプロテアーゼが機能することを膜に要求するよう見えるので、BoNTC/LCのための試験管内のアッセイが目下存在しない。神経細胞環境では、BoNTC/LCは、シンタキシンを開裂させ、膜タンパク質がシナプス前膜にシナプス小嚢融合のために必要とされる。

【0233】

他の例には、エルシニア属病原性因子YopJおよびYopT、ならびにサルモネラ菌AvrA(アヴラ)が含まれる。

【0234】

他の標的被分析物には、制限されないが、凝固因子レベル(出血性または血栓症の状況)、糞便のエラスターゼ(すい臓の外分泌性の活性、例は、嚢胞性線維症または慢性膵炎)、PSA、VEGFおよびEGFR(直腸癌での腫瘍反応)、MMP-9(食道癌および初期の脳卒中マーカーの腫瘍マーカー)、MMP-13(初期の脳卒中マーカー)、カテプシンB(癌)、カテプシンG(気腫、慢性関節リウマチ、炎症)、プラスミノゲンアクチベーター(活性剤)(血栓症、慢性炎症、癌)、ウロキナーゼ(癌)が含まれる。

【0235】

若干の具体例で、標的被分析物は、トロポニン(心臓トロポニンIおよびT)である。トロポニンは、平滑筋でなく、骨格および心筋において筋収縮に不可欠な3つの調節タンパク質の複合体である。トロポニンは骨格の筋肉および心筋の双方で見出され、しかし、トロポニンの特定のバージョンは筋肉のタイプの間で異なる。トロポニン(心臓トロポニンIおよびT)の2つのサブタイプは、非常に感受性で、心臓筋肉(心筋)への損傷の特異的な指標である。それらは、胸の痛みを伴う患者において不安定な狭心症および心筋梗塞(心臓発作)の間を区別するために、血液において測定される。心筋梗塞を患った患者は、損傷を受けた心筋の領域をもち、そして血液において心臓トロポニンレベルを上げた。

【0236】

同様に、別の具体例は、競合タイプのアッセイを利用する。この具体例では、結合性リガンドは、検出が望まれる実際の分子と同じであり、つまり、結合性リガンドは、実は標的被分析物または類似体である。レドックス活性分子が溶媒抑制となるように、結合性リガンドの結合性パートナーは表面に加えられ、電子移動が起こり、そして信号を発生させる。それから、実際の試験サンプルは、電極に結合するのと同じかまたは似た標的被分析物を含み、加えられる。試験サンプル被分析物は、結合性パートナーを争い、信号において表面上の結合性パートナーの損失を起こし、そして結果として減少させる。

【0237】

似た具体例は標的被分析物(または類似体)を利用し、好ましくはより一層大きな部分に共有結合的に付着する(「部分をブロックする」こと)。被分析物のブロッキング部分の複合体は、標的被分析物を結合する結合性リガンドに結合し、レドックス活性分子を抑制された溶媒にするのに役立つ。試験サンプルの標的被分析物の導入は、被分析物のブロッキング部分の複合体を争うのに役立ち、より一層大きな複合体を放出させ、そしてより一層溶媒接触可能な分子をもたらす。

【0238】

本発明は、さらに機器を、AC検出方法を用いて、被分析物を検出するために、提供する。機器は、少なくとも最初の測定またはサンプル電極、および2番目の測定または対電極を有する試験チャンバーを含む。3つの電極システムも役に立つ。第1および第2の測定電極は、試験サンプルの受け取り領域接触し、液体試験サンプルの存在において、2つの電極が電気接点にあることができる。

【0239】

10

20

30

40

50

さらに別の具体例で、最初の測定電極は、レドックス活性複合体を、共有結合的にセンサーを介して付着され、そして好ましくはここに記述するように、伝導性のオリゴマーを介して含む。あるいはまた、最初の測定電極は、共有結合的に付着されたレドックス活性分子および結合性リガンドを含む。

【0240】

機器は、試験チャンバーに、つまり、測定電極に電氣的に接続された電源を更に含む。好ましくは、電源は、必要ならば、ACおよびDCの電圧を送ることができる。

【0241】

具体例で、機器は入力された信号および出力信号を比較することができるプロセッサを更に含む。プロセッサは電極に接合し、そして出力信号を受け取るために立体配置され、そしてこのようにして標的被分析物の存在を検出する。

10

B. イニシエーション（開始）

【0242】

1局面において、本発明は、標的被分析物を検出する方法を提供する。

【0243】

存在するならば、標的被分析物が捕獲リガンドと結合するという状況の下で、標的被分析物は、試験サンプル内に含まれ、溶媒接触可能なレドックス活性複合体または溶媒接触可能なレドックス活性分子および捕獲リガンドの混合物のいずれかを含む電極に加えられる。これらの状況は、概して生理的状況である。通常、複数のアッセイ混合物は、種々の濃度に対する差別的な反応を得るために、異なる濃度を伴って平行して運転される。典型的に、これらの濃度のうちの1つは、陰性コントロールとして用いられ、すなわち、0濃度で、または検出のレベルより低い。そのうえ、任意の種類の他の試薬でも、スクリーニングアッセイに含まれる。これらは、塩類、中性のタンパク質のような試薬、例は、アルブミン、洗剤、などで、最適な結合を容易にし、および/または非特異的な、または背景の相互作用を減らすのに用いられるものを含む。また、さもないれば、アッセイの効率を改善し、プロテアーゼインヒビター（阻害剤）、ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物薬剤、その他を用いる。構成要素の混合物は、必要な結合を提供する任意の順序で加えることができる。

20

【0244】

若干の具体例で、標的被分析物は、可逆的に捕獲リガンドと、すなわち、非共有結合的に、タンパク質-抗原のタンパク質相互作用-抗体、酵素-基質（または若干の抑制剤）または受容体-リガンド相互作用においてのように結合する。

30

【0245】

好ましい具体例で、標的被分析物は、不可逆的に結合性リガンドを、例えば、共有結合的に結合する。例えば、若干の酵素-インヒビターの相互作用は、不可逆と考えられる。代わりに、共有結合をもたらすシステムの以降の操作で、被分析物はまず最初に可逆的に結合する。例えば、結合後の化学的な架橋結合を、この技術における者に理解されるように行うことができる。例えば、ペプチドは、様々な二官能性薬剤で、マレイミド安息香酸（maleimidobenzoic acid）、メチルジチオ酢酸（methyldithioacetic acid）、メルカプト安息香酸、S-ピリジルジチオプロピオン酸塩、その他のようなものを用いて架橋結合することができる。あるいはまた、標的被分析物上の機能的に反応性の基および結合性リガンドは共有結合の付着を形成するために誘導される。

40

【0246】

結合性部分への被分析物の結合の際、溶媒接触可能なレドックス活性分子は、溶媒を抑制させたものにする。ここで、「溶媒抑制されたレドックス活性分子」によって、溶媒抑制されたレドックス活性分子の溶媒の再配置エネルギーが、溶媒接触可能なレドックス活性分子の溶媒再配置エネルギーより少ないことが意味される。上記したように、これがいくつかのやり方で起こりうる。若干の具体例において、標的被分析物は、その小さな極性のリガンドの調整原子を、溶媒接触可能なレドックス活性分子が少なくとも1種の、および好ましくはいくつかを失うように提供する。あるいはまた、若干の具体例において、レ

50

ドックス活性分子に対する標的被分析物の近くは、リガンド交換がもたらされないで、むしろ溶媒を、金属イオン（すなわち、第1または第2の調整スフィア）の周りのエリアから排除し、そのようにして、必要な溶媒再配置エネルギーを効果的に下げる。

【0247】

若干の具体例で、必要な溶媒再配置エネルギーは、レドックス活性分子の $E^0$ において減少が、約100mVだけ、好ましくは少なくとも約200mV、および少なくとも約300-500mVが特に好ましく、もたらされるのに十分に減少する。

【0248】

若干の具体例で、必要な溶媒再配置エネルギーは、少なくとも100mVだけ、好ましくは少なくとも約200mV、および特に好ましくは、少なくとも約300-500mVである。

10

【0249】

若干の具体例において、必要な溶媒再配置エネルギーは、溶媒接触可能なレドックス活性分子および電極の間での電子移動（kET）の率と比較し、溶媒抑制されたレドックス活性分子および電極の間での電子移動の率の変化をもたらすのに十分に減少する。具体例において、この率の変化は、約3のファクターについてよりも大きく、好ましくは、少なくとも約10のファクターで、および特に好ましくは少なくとも約100またはそれよりも多くのファクターである。

【0250】

溶媒再配置エネルギーの決定は、この技術における者によって理解されるように行う。手短に言うと、Marcus theory（マーカス論）で概説されるように、電子移動率（kET）を多数の異なる推進力（または自由エネルギー、 $-G^\circ$ ）で定め、率が自由エネルギーに等しい点である。これは、ほとんどの場合、溶媒再配置エネルギーに相当すると扱うことができ、Gray（グレイ）ら、Ann. Rev. Biochem. 65: 537 (1996)を参照し、ここで参照することによって組み込む。

20

【0251】

溶媒抑制されたレドックス活性分子は、標的被分析物の存在を示し、電子移動を開始、および溶媒抑制されたレドックス活性分子および電極の間で電子移動の信号の特徴を検出することによって検知される。

【0252】

電子移動は通常、電子的に開始され、電圧が好まれる。電位（可能性）は、修飾された核酸プローブを含むサンプルに適用される。正確なコントロールおよび適用された電位における変動は定電位電解装置を介することができ、そして3つの電極システム（1つの参照、1つのサンプルおよび1つの対電極）または2つの電極システム（1つのサンプルおよび1つの対電極）のいずれかである。これは、一部でレドックス活性分子の選択に、そして一部で用いられる伝導性オリゴマーに依存する、システムのピークの電子移動電位に、適用された電位をマッチングすることを許容する。

30

【0253】

好ましくは、開始および検出は、溶媒接触可能な、および溶媒抑制されたレドックス活性分子の溶媒再配置エネルギーの相対的な違いを最大にするために選ばれる。

C. 検出

40

【0254】

レドックス活性分子および電極の間の電子移動は、様々なやり方で、電子的検出で検出することができ、制限されないが、好ましくは、電流測定法（amperometry）、ボルタンメトリー、静電容量およびインピーダンスが含まれる。これらの方法には、ACまたはDC電流、パルス化した方法、ロックイン技術、およびフィルタリング（ハイパス、ローパス、バンドパス（帯域通過））に基づく時間または周波数依存的方法が含まれる。若干の具体例において、必要とされるすべてのものは、電子移動の検出であり、他において、電子移動の率が定められうる。

【0255】

若干の具体例で、電子的検出用いられ、電流測定法、ボルタンメトリー、静電容量、お

50



よびインピーダンスが含まれる。適切な技術には、制限されないが、電子重量測定、電量分析（制御された電位電量分析および一定の電流の電量分析を含む）；ボルタンメトリー（周期的ボルタ分析法、パルスボルタ分析法（通常のパルスボルタ分析法、方形波ボルタ分析法、示差パルスボルタ分析法、オスターヤング（Osteryoung）方形波ボルタ分析法およびクーロンスタティックパルス（coulostatic pulse）技術）；除去分析（アノディック（anodic）除去分析、カソードイック（cathiodic）除去分析、方形波除去ボルタ分析法）；コンダクタンス測定（電解コンダクタンス、直接の分析）；時間-依存電気化学的分析（クロノアンペロメトリー（chronoamperometry）、クロノポテンシオメトリー、サイクリッククロノポテンシオメトリーおよびアンペロメトリー、ACポログラフィー、クロノグラバメトリー（chronogalvanometry）およびクロノ（時）電量分析）；ACインピーダンス測定；静電容量測定；ACボルタ分析法、およびフォト電気化学が含まれる。

10

#### 【0256】

若干の具体例で、電子移動の監視は、電流測定の検出を介する。検出のこの方法は、本発明の組成物を含む電極および試験サンプルにおいて補助（対）電極の間で電位（別々の基準電極と比較して）を適用することが含まれる。異なった効率の電子移動は、標的被分析物の存在、または不存在で、サンプルにおいて誘導される。

#### 【0257】

電流測定による電子移動を測るための装置は、感受性電流検出を含み、そして電位を、通常、定電位電解装置をコントロールする手段を含む。この電圧は、レドックス活性分子の電位に関して最適化される。

20

#### 【0258】

若干の具体例において、代わりの電子検出モードが利用される。例えば、電位差測定（またはボルタンメトリー）の測定値は、非誘導電流の（non-faradaic）（正味（ネット）電流の流れがない）プロセスを含み、そして伝統的にpHおよび他のイオンは探知器が利用される。似たセンサーは、レドックス活性分子および電極の間で電子移動を監視するのに用いられる。そのうえ、絶縁体（抵抗のようなもの）の、およびコンダクター（伝導率、インピーダンスおよび静電容量（capacitance）のようなもの）の他の特性は、レドックス活性分子と電極の間で電子移動を監視するのに用いることができた。最後に、電流（電子移動のようなもの）も発生させる任意のシステムも小さな磁場を生み出し、それは若干の具体例において監視しうる。

30

#### 【0259】

若干の具体例で、システムは標的の添加の前に有機溶媒でのシステムを運転することによって電極上で溶媒接触可能なレドックス活性分子の量を決定するために測定されうる。これは、センサーまたはシステムの内部の制御として役に立つのに、全く重要である。これは予備的測定値を、似ているが、むしろ、異なるコントロールシステムに依存する、検出のために用いる同じ分子上で、標的の追加前に許容する。このように、検出のために用いる実際の分子は、任意の実験の前に定量化することができる。水が不存在である場合、すなわち、アセトニトリルのような有機溶媒において、システムを実行することは水を除外し、そして実質的に任意の溶媒再配置も否定する。これは、電極の表面にある分子の実際の数の定量化を許容する。サンプルは次いで加えることができ、出力信号が定められ、そして、結合された/結合を解かれた分子の比率が測定される。これは、先の方法に勝る重要な利点である。

40

#### 【0260】

本発明の組成物において観察された電子移動の速い速度の1つの利益が、時間分解能により、電流に基づくモニターの信号対雑音（ノイズ）の結果を大いに高めることができることであると理解されなければならない。本発明での電子移動の迅速な速度は、電子移動開始および完成の間で高い信号およびステレオタイプ遅延の双方がもたらされる。特定の遅れの信号を増幅することによって、電子移動のパルス化された開始の使用および検出の「ロックイン」増幅を通じてのように、信号対騒音での大規模な改善が達成されうる。

#### 【0261】

50

理論によって拘束されないが、標的被分析物が、電極に結合し、直列にレジスターおよびコンデンサーに類似した方法反応しうるように見える。また、レドックス活性分子の $E^0$ は、標的被分析物結合の結果としてシフトすることができる。さらにまた、電子移動の速度に基づいて溶媒接触可能な、および溶媒抑制されたレドックス活性分子を区別することが可能である場合があり、それは標的被分析物の検出のために多数のやり方で順に利用することができる。このようにして、この技術における者によって理解されるように、任意の数の開始検出システムを、本発明において用いることができる。

#### 【0262】

若干の具体例で、電子移動は開始され、そして直流(DC)技術を用いて検出する。上記したように、レドックス活性分子の $E^0$ は、標的被分析物の結合の際、溶媒際組織化エネルギーにおける変化の結果としてシフトすることができる。このようにして、溶媒接触可能なレドックス活性分子の $E^0$ で、そして溶媒抑制された分子の $E^0$ で採取された測定は、被分析物の検出を許容する。この技術での者によって理解されるように、多数の適切な方法は電子移動を検出するのに用いられうる。

10

#### 【0263】

若干の具体例で、電子移動が交流(AC)方法を用いて開始される。電極および第2の電子移動部分の間で電子移動を開始するために、最初の入力電気信号は、システムに適用され、好ましくは少なくともサンプル電極(本発明の複合体を含む)および対電極を介する。電圧を参照および作用電極に印加し、3つの電極システムも用いうる。この具体例では、最初の入力された信号は、少なくともAC構成要素を含む。AC構成要素は、可変的な振幅と周波数でありうる。概して、本方法において用いるために、AC振幅は、約1mVから約1.1Vまでであり、好ましくは約10mVか約800mVまで、そして特に好ましくは約10mVから約500mVまでに及ぶ。AC周波数は約0.01Hzから約10MHzに及び、そして好ましくは、約1Hzからおよそ1MHzまで、および約1Hzから約100kHzである。

20

#### 【0264】

若干の具体例で、最初の入力信号はDC構成要素およびAC構成要素を含む。つまり、サンプルおよび対電極の間の直流オフセット電圧は、第2の電子移動部分の電気化学電位を通してスイープされる。スイープは、システムの最大の反応が見られる直流電圧を確認するのに用いられる。これは、概して、レドックス活性分子の電気化学電位で、またはおよそそれについてのものである。一旦この電圧が定められるなら、スイープまたは1種またはそれよりも多くの均一な直流オフセット電圧が用いられうる。直流オフセット電圧は、約-1Vから約+1.1Vまでが好ましく、約500mVから約+800mVまでが特に好ましく、そして約-300mVから約500mVまでがとりわけ好ましい。直流オフセット電圧の上部で、可変的な振幅および周波数のAC信号構成要素を適用する。レドックス活性分子は、ACの動揺に反応するのに十分に低い溶媒再配置エネルギーをもつ場合、AC電流は電極およびレドックス活性分子の間で電子移動のために生成される。

30

#### 【0265】

若干の具体例において、AC振幅は変動する。理論に束縛されることなく、振幅を増やすことが推進力を増やすように見える。このように、より高い振幅は、より高い過電圧をもたらし、電子移動のより速い速度を与える。このように、概して、同じシステムは、その周波数でより高い過電圧を用いることにより、任意の周波数でも改善された反応(すなわち、より高い出力信号)を与える。このように、振幅は高周波で増加し、システム中で電子移動の速度を上昇させ、より大きな感度をもたらす。そのうえ、上記したように、電子移動の速度に基づいて、溶媒接触可能および溶媒抑制レドックス活性分子の間を区別することは可能でありえ、それは次に、周波数または過電圧のいずれかに基づいて2つを区別するのに用いることができる。

40

#### 【0266】

若干の具体例で、システムの測定値は、少なくとも2つの別々の振幅または過電圧を取り、複数の振幅での測定値が好ましい。上記したように、振幅での変化の結果としての反応での変化が、システムの識別、較正および定量化の基礎を形成しうる。

50

## 【0267】

若干の具体例で、AC周波数は変動する。異なる周波数にて、異なる分子は異なるやり方で反応する。この技術における者によって理解されるように、概して、周波数の増加は出力電流を増やす。しかし、電子が電極およびレドックス活性分子の間に伝わる速度より周波数が大きいとき、より一層高い周波数は、出力信号の損失または減少を招く。若干のポイントでは、周波数は溶媒抑制されたレドックス活性分子を通してでさえ電子移動の速度より大きく、そして次いで出力信号も落下する。

## 【0268】

加えて、AC技術の使用は共有結合的に付着した核酸以外の実体のために任意の単一の周波数での背景信号の有意な現象を許容し、すなわち、不必要な信号の「ロッキングアウト」または「フィルタリング」である。つまり、電荷担体の周波数反応または溶液におけるレドックス活性分子は、その拡散係数によって制限される。したがって、高周波で、電荷担体はその電荷を電極へ移すのに十分速く拡散しないかもしれない、および/または電荷移動動力学は十分に速くない場合がある。すなわち、溶媒が電極に接触可能である場合、これは特に不動態化 (passivation) 層単分子層を利用せず、または部分的または不十分な単分子層しかもたないことで具体例において特に重要である。概説した上記の、DC技術での、電極が溶媒に接触可能である場合の「孔 (ホール)」の存在は、溶媒電荷担体の「短絡」のシステムを招くことがある。しかし、本AC技術を用いて、1種またはそれよりも多くの溶液における電荷担体の周波数反応を防ぎ、1種またはそれよりも多くの周波数を選び、単分子層が存在するか、または存在しないかを選ぶことができる。これは特に重要であり、それは、血液のような多くの生物学的流体が電流測定に関する検出方法に干渉することがあるレドックス活性分子のかなりの量を含むからである。

## 【0269】

若干の具体例で、システムの測定値は、少なくとも2つの別の周波数を取り、複数の周波数での測定値が好ましい。複数の周波数はスキャン (走査) を含む。好適例において、周波数反応は少なくとも2つ、好ましくは少なくとも約5つ、およびより一層好ましくは少なくとも約10の周波数にて定められる。

## D. 信号処理

## 【0270】

電子移動を開始させるために入力信号を送った後、出力信号は受け取られ、または検出される。出力信号の存在および大きさは、以下のものに依存し、入力信号の過電圧/振幅；入力AC信号の周波数；電子移動部分の間の、介在媒体、すなわち、インピーダンスの組成；DCオフセット；システムの環境；および溶媒である。所定の入力信号において、出力信号の存在および大きさは、概して、金属イオンの酸化状態における変化をもたらすことを要求される溶媒再配置エネルギーに依存する。そのようにして、入力信号を送る際、AC構成要素およびDCオフセットを含み、電子は電極およびレドックス活性分子の間に移され、溶媒再配置エネルギーが十分に低いとき、周波数は範囲内にあり、そして振幅は十分で、出力信号がもたらされる。

## 【0271】

若干の具体例で、出力信号はAC電流を含む。上記で概説するように、出力電流の大きさは多数の媒介変数 (パラメーター) に依存する。これらのパラメータを変動させることによって、システムはいくつかのやり方で最適化されうる。

## 【0272】

概して、本発明において発生するAC電流は、約1フェムトアンペア (femtoamp) から約1ミリアンペアまで、約50フェムトアンペアから約100マイクロアンペアまでの電流が好ましく、および約1ピコアンペアから約1マイクロアンペアまでが特に好ましい。

## 【実施例】

## 【0273】

例1. 化合物の合成

化合物200

10

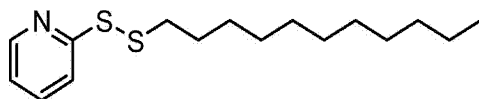
20

30

40

50

## 【化 2 3】



## 【 0 2 7 4】

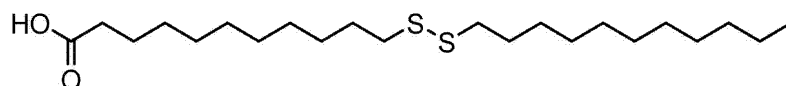
100mLの丸底フラスコに、1-ウンデカネチオール（1.4973g、7.95mmol（ミリモル））および乾燥メタノール（30mL）を加えた。乾燥ジクロロメタン（5mL）を、溶解を援助するために加えた。2,2-ジチオジピリジン（1.7547g、7.96mmol）を粉体として加え、次いでトリエチルアミン（1.15mL、8.27mmol）を加えた。反応混合物を、アルゴンを用いて酸素を除去し、次いで24時間アルゴンの陽圧力の下に室温で撹拌するためにセットした。反応内容物を、ロータリーエバポレーター上で乾燥させ、溶離剤として、酢酸エチル/ヘキサン（1:1）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物200（1.8494g、78%）を得た。

10

## 【 0 2 7 5】

化合物201

## 【化 2 4】



## 【 0 2 7 6】

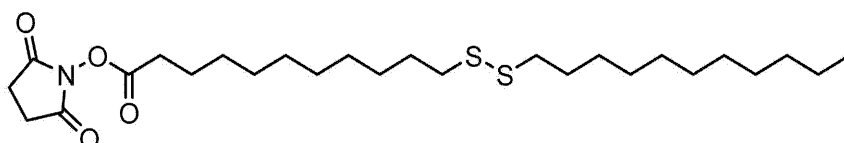
100mLのSchlenk（シュレンク）フラスコに、化合物200（1.8528g、6.23mmol）を乾燥テトラヒドロフラン（30mL）とともに加えた。1-メルカプトウンデカン酸（mercaptoundecanoic acid）（1.5108g、6.92mmol）および4-ジメチルアミノピリジン（0.7710g、6.31mmol）を、固体として、反応フラスコに、次いで追加のテトラヒドロフラン（20mL）を加えた。反応内容物をアルゴンで酸素を除去し、それから、16時間アルゴンの陽圧力の下に室温で撹拌するためにセットした。反応内容物を、ロータリーエバポレーターで乾燥させ、溶離剤として、メタノール/ジクロロメタン（1:9）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物201（1.0207g、40%）を得た。

20

## 【 0 2 7 7】

化合物202

## 【化 2 5】



30

## 【 0 2 7 8】

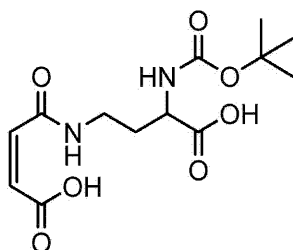
250mLの丸底フラスコに、N-ヒドロキシスクシンイミド（0.1435g、1.25mmol）を、乾燥ジクロロメタン（100mL）とともに添加した。内容物を、溶解を援助するために超音波処理浴室に短く置き、次いで化合物201（0.5078g、1.25mmol）をジクロロメタン溶液（10mL）として一気に加えた。ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.2876g、1.39mmol）のジクロロメタン溶液（10mL）を、23分間にわたり滴下により加え、そして次いで、30分間、泡立たせたアルゴンで脱酸素化を続け、内容物を、17時間アルゴンの陽圧力の下に室温で撹拌するために設定した。反応内容物を、ジシクロヘキシル尿素沈殿物を除去するためにフィルターに通し、20-25mLにまでロータリーエバポレーター上で濃縮し、それから次いで、溶離剤としてジクロロメタンにおいてメタノール（2.5%）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物202（0.3892g、62%）を得た。

40

## 【 0 2 7 9】

化合物203

## 【化 2 6】



## 【 0 2 8 0】

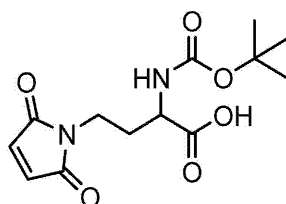
25mLの丸底フラスコに、Boc-D-2,4-ジアミノ酪酸（0.3080g、1.41mmol）および無水マレイン酸（0.1415g、1.44mmol）を氷酢酸（8mL）とともに加えた。反応内容物を、4.5時間アルゴンの陽圧力の下に室温で撹拌させるためにセットした。反応内容物を、すべての揮発性物質を除去し、減圧のライン上で乾燥させ、化合物203（0.4490g）を得た。材料を、更に精製することなく、現状のままで用い；推定純度は、<sup>1</sup>HNMRデータに基づく65%である。

10

## 【 0 2 8 1】

化合物204

## 【化 2 7】



20

## 【 0 2 8 2】

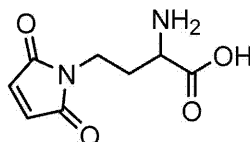
100mLのSchlenkフラスコに、化合物203（0.2919g、0.92mmol）を、乾燥トルエン（40mL）およびトリエチルアミン（400 μL、2.89mmol）とともに加えた。フラスコにDean-Stark（ディーン-スターク）機器を付け、そして横の腕には乾燥トルエンを満たした。全体のセットアップをアルゴンでフラッシュし、そしてフラスコを、4.5時間の間、活発に還流させた。反応内容物を、ロータリーエバポレーター上で乾燥させ、黄褐色の/褐色がかった油を得た。この油を、水（20mL）に溶かし、そしてクエン酸（50mL水溶液）で酸性化した。粗生成物の抽出を、ジクロロメタン/メタノール（9:1）で達成した。有機溶液を、ロータリーエバポレーター上で濃縮し、そして次いで、溶離剤として酢酸エチル/メタノール（4:1）、+微量の酢酸を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物204（0.2647g、96%）を得た。

30

## 【 0 2 8 3】

化合物205

## 【化 2 8】



40

## 【 0 2 8 4】

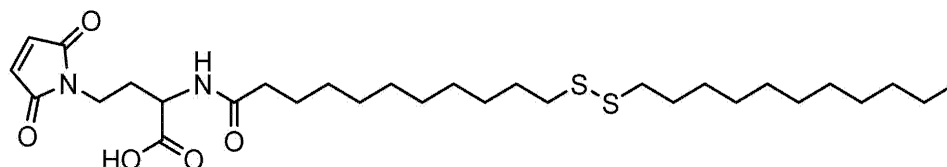
25mLの丸底フラスコに、HCl（ジオキサンにおける4Mの10mL;40mmol）をアルゴンの下で加えた。内容物を、次いで化合物204が含まれる予め冷やされた25mLの丸底フラスコに移し、氷水浴において冷やした。内容物を、45分の間、アルゴンの下で0 で撹拌し、次いで室温に暖め、さらに追加の2時間撹拌した。すべての溶媒および過剰なHClを減圧ラインで除去し、そして粗残分を、溶離剤として水を用いDowex（ダウエックス）1X2-100陰イオン交換樹脂を通過させ、化合物205（0.2004g、98%）を得た。

## 【 0 2 8 5】

50

## 化合物206

## 【化 2 9】



## 【 0 2 8 6】

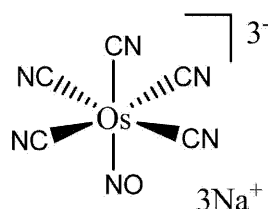
50mLのSchlenkフラスコに、化合物202 (0.0220g、0.044mmol) および乾燥アセトニトリル (6mL) を加えた。化合物203 (0.0105g、0.045mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (8.5の  $\mu\text{L}$ 、0.049mmol) を、順に加え、そして異成分からなる内容物を室温でアルゴンの下に撹拌するためにセットした。30分後、追加のジイソプロピルエチルアミン (8.5  $\mu\text{L}$ 、0.049mmol) を、化合物203の溶解を援助するために反応混合物に加えた。ジメチルアセトアミド (1.5mL) を、均一な溶液を提供するために滴下により加え；内容物をアルゴンでフラッシュし、そして17時間室温で撹拌するためにセットした。反応内容物を、減圧ライン上で乾燥するためにポンプ圧送し、次いでジクロロメタン中に溶解し、そしてクエン酸水溶液で洗浄した。ジクロロメタン (4  $\times$  20mL) による抽出に次いで、メタノール/ジクロロメタン (1:9) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、化合物206 (0.0114g、45%) を得た。

10

## 【 0 2 8 7】

## 化合物207

## 【化 3 0】



20

## 【 0 2 8 8】

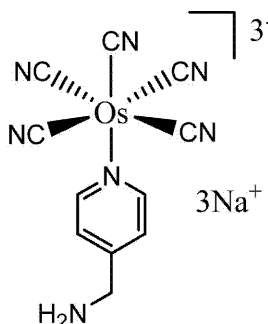
15mLの石英 (クウォーツ) Schlenk管 (チューブ) に、均一な溶液を与えるため、カリウムヘキサシアノオスメート (hexacyanoosmate) (0.3052g、0.61mmol) および亜硝酸ナトリウム (0.8138g、11.8mmol) を水とともに加えた (10mL; pH=4、酢酸)。反応内容物を、次いでテフロン (登録商標) スクリューキャップで封をし、20分の間、アルゴンで酸素を除去した。石英管は、(14)254nmのバルブを備えるライオネット (Rayonet) フォト反応機に置き、そして17時間照射した。反応内容物を50mLの丸底フラスコへ移され、黄色の固体を産生するために、ロータリーエバポレーター上で濃縮した。粗反応混合物を、溶離剤として水を用い、Sephadex (セファデックス) G-15カラム上で精製し、化合物207 (0.1567g、65%) を得た。

30

## 【 0 2 8 9】

## 化合物208

## 【化 3 1】



40

50

## 【0290】

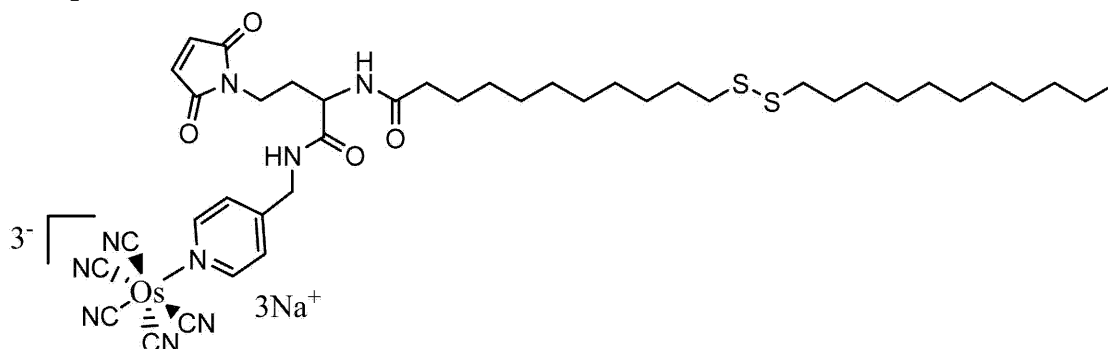
50mLの丸底フラスコに、化合物207 (0.1567、0.40mmol) および水 (2mL) を、均一な溶液を与えるために添加した。4-アミノメチルピリジン (0.4320g、4.0mmol) を液体として加え、それから水酸化ナトリウム水溶液 (3Mの7mL、21mmol) を加えた。反応混合物はアルゴンで酸素を除去され、72時間65℃にまで加熱した。反応内容物を室温にまで冷やし、それから1MのHClを緩徐に添加することによって中和した。溶媒は、ロータリーエバポレーター上で除去し、および粗物質を、溶離剤として水を用いるSephadex G-15のカラム上で精製し、化合物208 (0.0922g、47%) を得た。

## 【0291】

化合物209

10

## 【化32】



20

## 【0292】

50mLのSchlenkフラスコに、化合物206 (0.0114g、0.044mmol)、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルユーロニウム (tetramethyluronium) 四フルオロホウ酸塩 (0.0140g、0.047mmol)、およびN,N-ジメチルホルムアミド (5mL) を加えた。内容物はアルゴンの下で撹拌する。そして、追加のジイソプロピルエチルアミン (7.8のμL、0.045mmol) を加えた。1時間室温で撹拌した後、溶媒をロータリーエバポレーター上で除去し、次いで残留物を、乾燥メタノール (5mL) に溶解した。化合物208 (0.0219g、0.044mmol) を固体として加え、内容物を18時間室温で撹拌した。溶媒をロータリーエバポレーター上で除去し、残りを、溶離剤としてメタノールを用いるLH-20カラム上でクロマトグラフィーによって精製し、化合物209を得た。

30

例2. ペンタシアノオスメート 分枝した分子ワイヤー複合体

## 【0293】

## 一般的考察。

すべての合成操作 (スキームS1) は、特に明記しない限り、標準的なSchlenk技術を使用し、乾いたアルゴン空気の下で実行された。反応媒体について、溶媒をガラスコントウアー (Glass Contours) (Laguna Beach (ラグーナビーチ)、CA (米国カリフォルニア州)) から取得するダウ-グラブス (Dow-Grubbs) 溶媒システム<sup>1</sup>を介して、中性のアルミナ上で乾燥した。これらの溶媒は、使用の前にアルゴンでガスを除去した。

## 【0294】

材料。以前に記述されたように<sup>2,3,4,5</sup>、化合物101、1-エチニル-4-(トリメチルシリルエチニル)ベンゼン、5-(4-ヨードフェニルエチニル)-[1,2,5]ジチアゼパン、および化合物208を合成した。すべての他の試薬を、商業上の供給者から購入し、そして特に明記しない限り、更なる精製なしで用いた。反応はTLCによってモニターし (アルミニウムに支持されたシリカゲルシート60F<sub>254</sub>、EMD Chemicals (EMDケミカル社)、Gibbstown (ギブスタウン)、NJ (米国ニュージャージー州))、スポットをUV光への曝露の際の蛍光消失によって視覚化した。

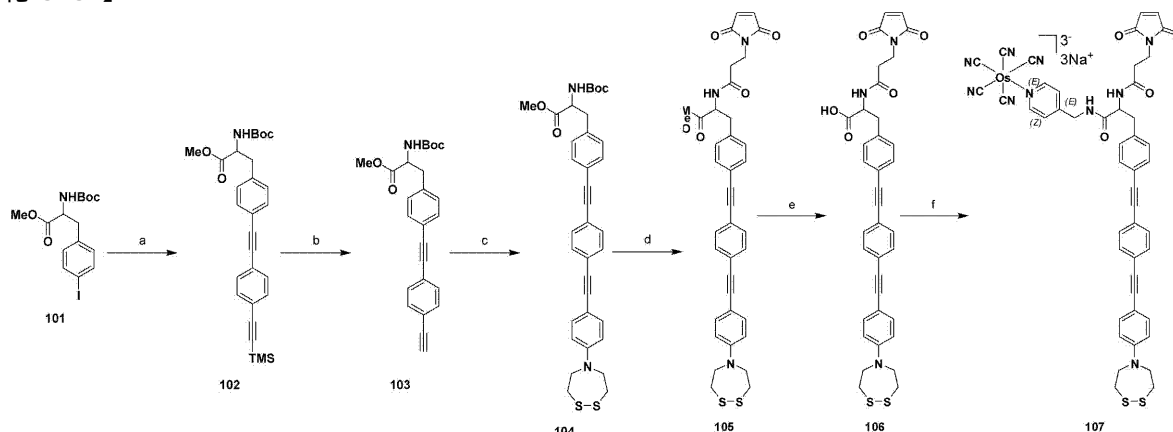
40

## 【0295】

実験法：

スキームS1. 化合物107の合成。

## 【化 3 3】



10

## 【 0 2 9 6 】

反応条件：(a) 1-エチニル-4-(トリエチルシリルエチニル)ベンゼン、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CuI}$ 、 $\text{TEA}$ ；(b) TBAF；(c) 5-(4-ヨードフェニルエチニル)-[1,2,5]ジチアゼパン、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CuI}$ 、 $\text{TEA}$ ；(d)  $\text{HCl}$ 、MP；(e)  $\text{LiI}$ ；(f) EDC、HOBt、208。

## 【 0 2 9 7 】

化合物102。化合物101 (1.44g、3.55mmol)、1-エチニル-4-(トリメチルシリルエチニル)ベンゼン (0.705g、3.55mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (0.062g、0.089mmol) および  $\text{CuI}$  (0.017g、0.089mmol) を、THF (15mL) 中で混合した。 $\text{TEA}$  (2.5mL) を加え、そして反応を  $\text{Ar}$  の空気の下に2.5h r.t. で撹拌するためにセットした。反応混合物を真空内で濃縮し、そして粗残分を、シリカゲル (1:1:5、 $\text{EtOAc}$  :  $\text{DCM}$  : ヘキサン) 上でカラムクロマトグラフィーによって精製し、フレーク状の黄色の固体 (1.51g、3.17mmol、89%) として純粋な生成物を得た。ESI-MS (ポジティブ、 $\text{MeOH}$  :  $\text{DCM}$ )  $m/z$  : 498.10 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMRは化合物102の構造と一致していた。

20

## 【 0 2 9 8 】

化合物103。THF (50mL) 中の化合物102 (1.44g、3.03mmol) をアセトニトリル/ $\text{N}_2$  (1) 浴で、およそ-15℃に冷やした。TBAF (THFの1.0M、4.5mL、4.5mmol) を、注射器によって滴下で加えた。20分後、水 (2mL) を、反応が消えるように加え、そして揮発性物質を真空内で除去した。粗製のオレンジの油を、 $\text{EtOAc}$  (200mL) に溶解し、そして水 (3×100mL) で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、ろ過し、粗残分に濃縮し、それを、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (1:1:3、 $\text{EtOAc}$  :  $\text{DCM}$  : ヘキサン) によって精製し、オフホワイトの固体 (1.22g、3.02mmol、99%) として、純粋な生成物を得た。<sup>1</sup>H NMRは化合物103の構造と一致していた。

30

## 【 0 2 9 9 】

化合物104。化合物103 (0.533g、1.32mmol)、5-(4-ヨードフェニルエチニル)-[1,2,5]ジチアゼパン (0.445g、1.32mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (0.046g、0.066mmol)、および  $\text{CuI}$  (0.006g、0.033mmol) を、THF (5mL) 中で混合した。 $\text{TEA}$  (1.0mL) を加え、そして反応を  $\text{Ar}$  の空気の下で50℃にまで加熱した。22時間の後、揮発性物質を真空内で除去し、そして粗残分を、シリカゲル上でカラムクロマトグラフィー (0.2:0.8:4、 $\text{EtOAc}$  : ヘキサン :  $\text{DCM}$ ) によって精製し、緑がかった黄色の固体 (0.285g、0.470mmol、36%) として純粋な生成物を得た。<sup>1</sup>H NMRは化合物104の構造と一致していた。

40

## 【 0 3 0 0 】

化合物105。化合物104 (0.072g、0.12mmol) を、ジオキサン (3mL) およびアニソール (0.5mL) に溶解した。 $\text{HCl}$  (ジオキサンの4.0M、3mL) を滴下し、そして、反応を1時間 r.t. で撹拌した。揮発性物質は真空内で除去し、そして粗製の黄色の固体を更なる精製なしで用いた。 $\text{NHS}$ -3-マレイミドプロピオネート (MPS) (0.034g、0.13mmol)、 $\text{N,N}$ -ジメチルアセトアミド (4mL)、および  $\text{TEA}$  (50  $\mu\text{L}$ ) を加え、そして反応を一昼夜 r.t. で撹拌させた。15時間後、反応混合物を、水 (75mL) に注ぎ、そして  $\text{DCM}$  (4×50mL) で抽出した。有機相を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、ろ過し、粗製残分にまで濃縮し、それをシリカゲル上でカラ

50



ムクロマトグラフィー（1:2:2、ジエチルエーテル：EtOAc：DCM）によって精製し、黄色の固体（0.040g、0.060mmol、50%）として、純粋な生成物を得た。 $^1\text{H}$  NMRは化合物105の構造と一致していた。

### 【0301】

化合物106。化合物105（0.031g、0.047mmol）および超乾燥したLiI（0.045g、0.34mmol）を、暗所で24時間、乾いたEtOAc（3mL）中で還流した。反応混合物を、EtOAc（100mL）とともにHCl（aq）（0.1M、10mL）に注いだ。有機相をHCl（aq）（0.1M、2×50mL）で洗浄して、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させ、ろ過し、粗製残分にまで濃縮し、それを、シリカゲル上でカラムクロマトグラフィー（0.1：0.5：9.4、酢酸：MeOH：DCM）によって精製し、黄色の固体（0.020g、0.031mmol、66%）として純粋な生成物を得た。ESI-MS（ネガティブ、MeOH） $m/z$ ：684.39（ $\text{M}+\text{Cl}$ ）。 $^1\text{H}$  NMRは化合物106の構造と一致していた。

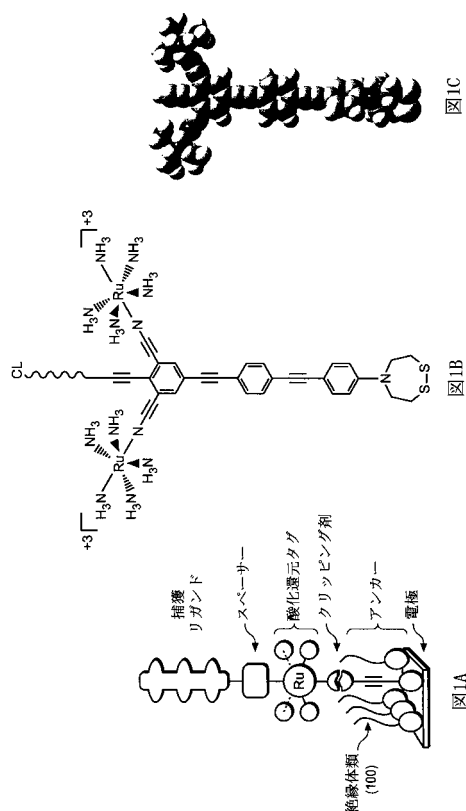
10

### 【0302】

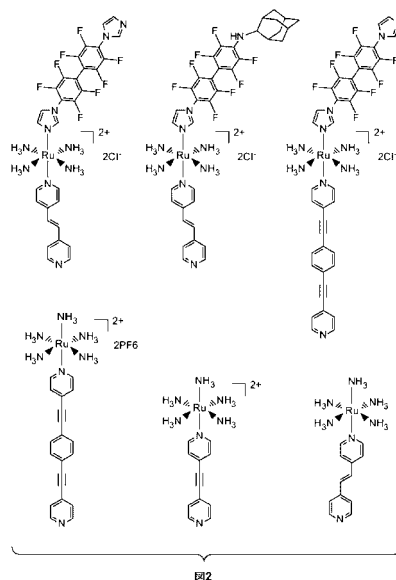
化合物107。化合物106（0.007g、0.011mmol）および化合物208（0.006g、0.013mmol）を、MeOH（2.5mL）およびTHF（0.5mL）の中に懸濁させる。フラスコを超音波処理し、そして混合物を氷浴で4℃に冷却した。THF（0.5mL）中の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（106に対して0.1当量（equiv））を添加し、次いでN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N-エチルカルボジイミド・HCl（0.002g、0.011mmol）およびTEA（3μL）を添加し、そして反応物を撹拌して一昼夜r.t.で暖かくするのを許容する。溶媒を真空内で除去し、そして残分を、溶離剤としてメタノールを用いてLH-20カラム上でのクロマトグラフィーによって精製し、化合物107を得る。

20

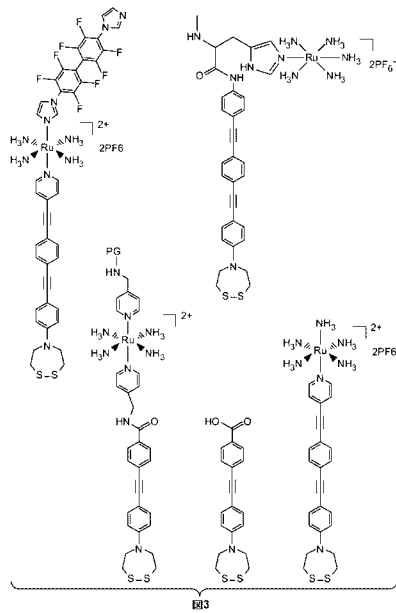
【図1】



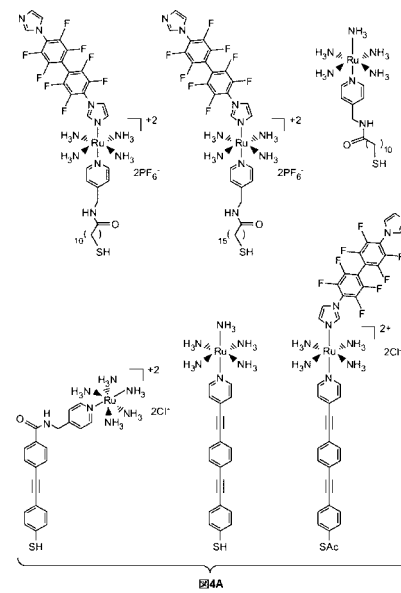
【図2】



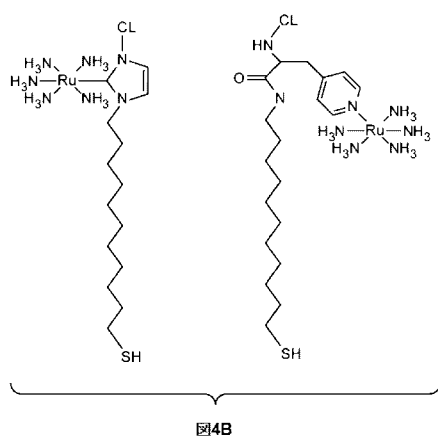
【図 3】



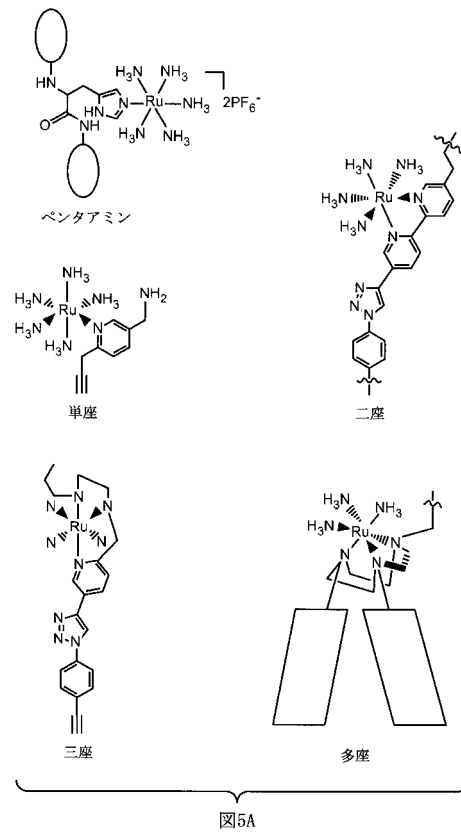
【図 4 A】



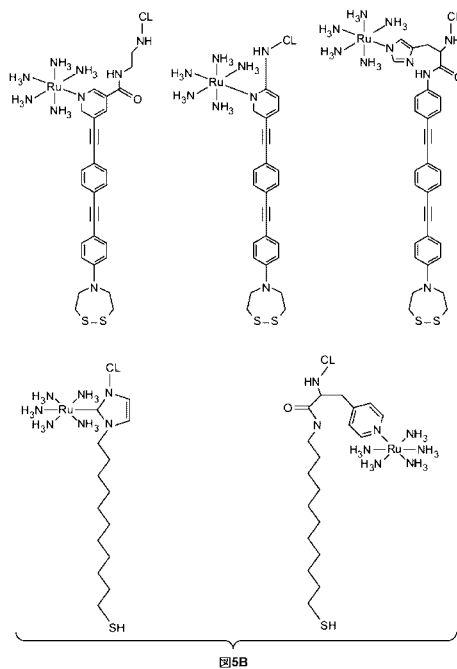
【図 4 B】



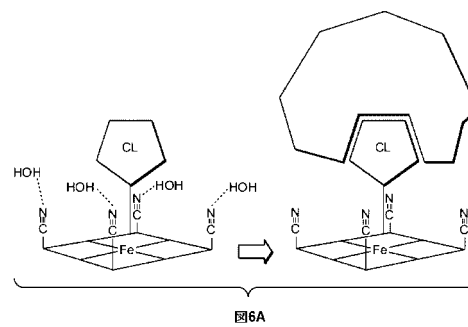
【図 5 A】



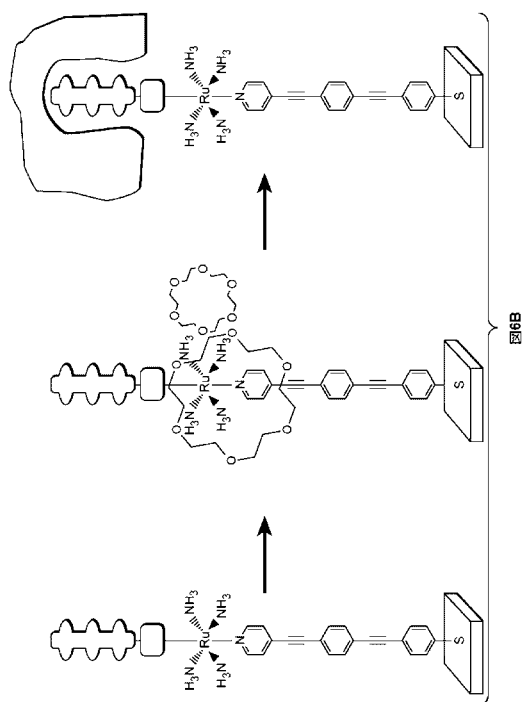
【図 5 B】



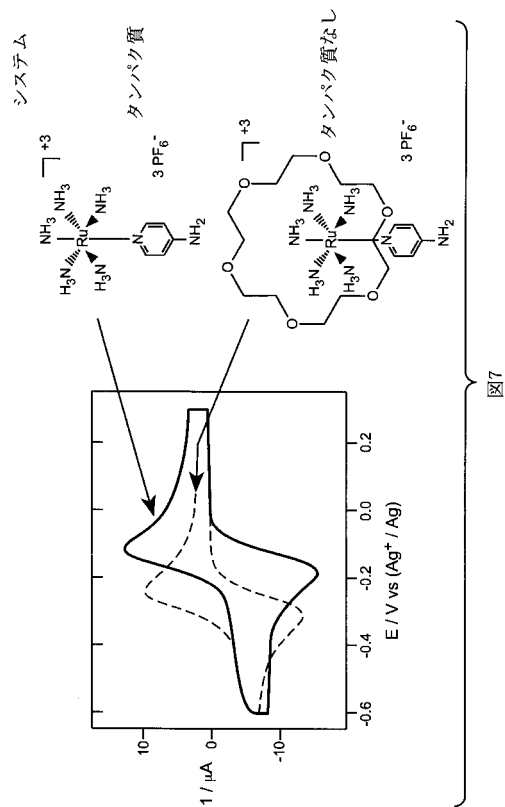
【図 6 A】



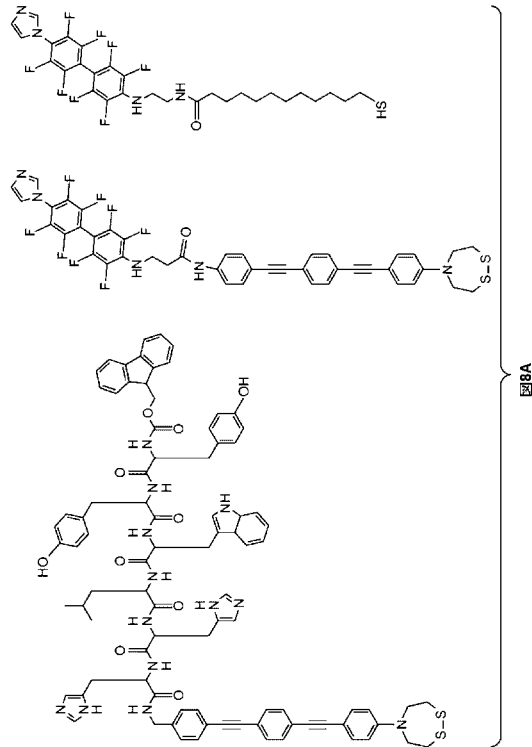
【図 6 B】



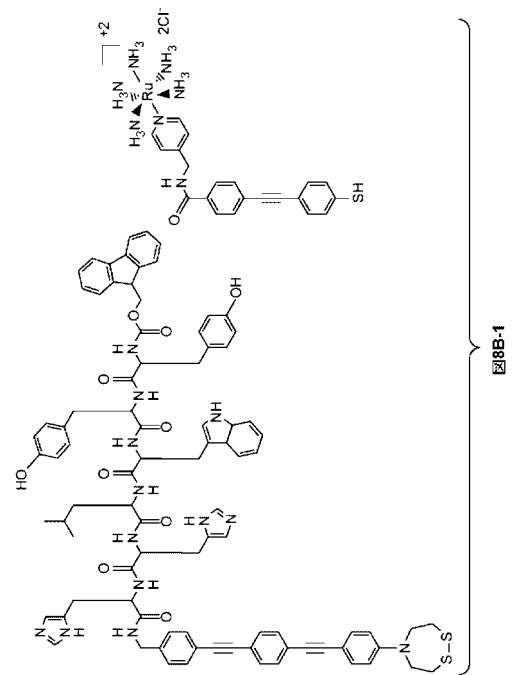
【図 7】



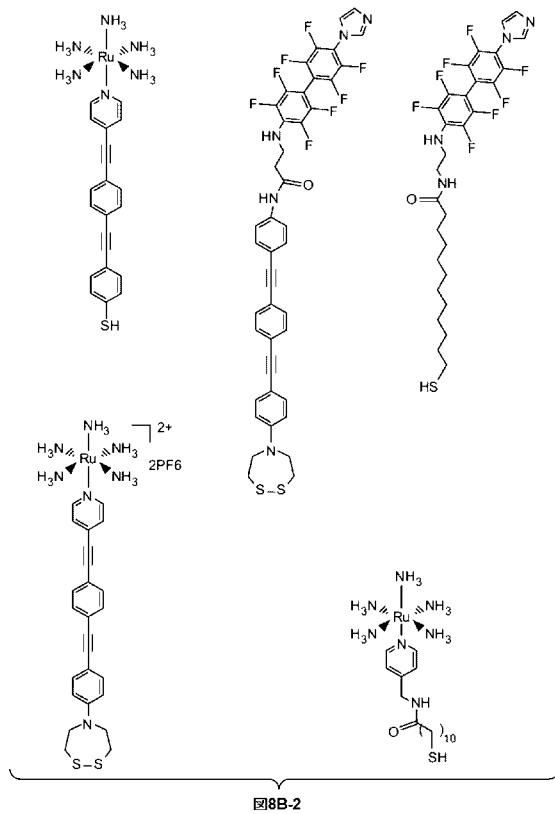
【図 8 A】



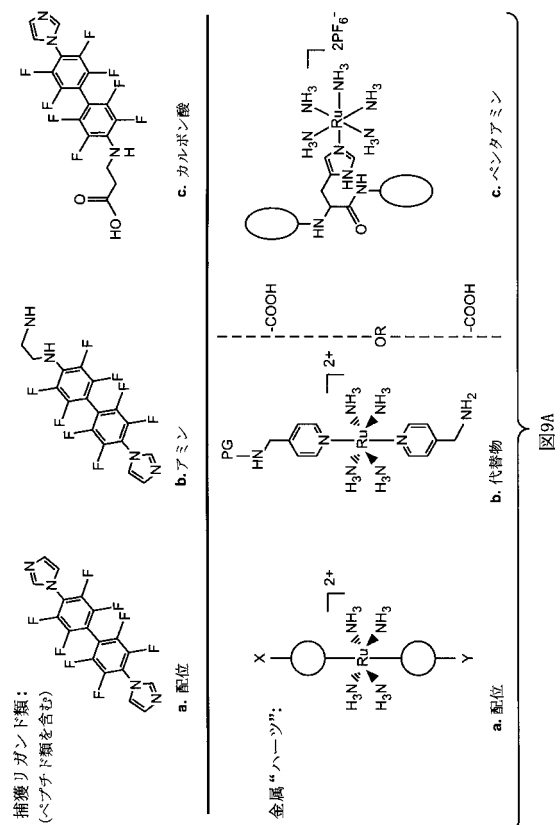
【図 8 B - 1】



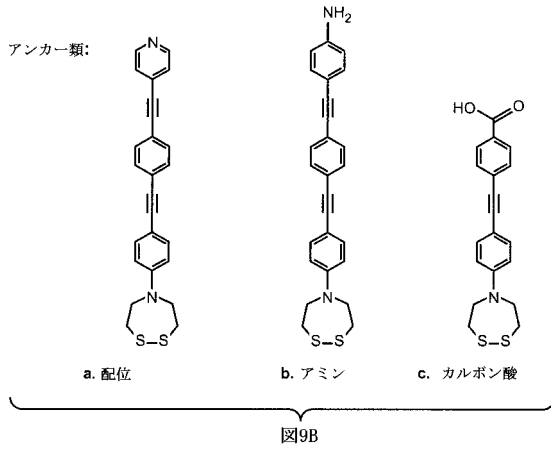
【図 8 B - 2】



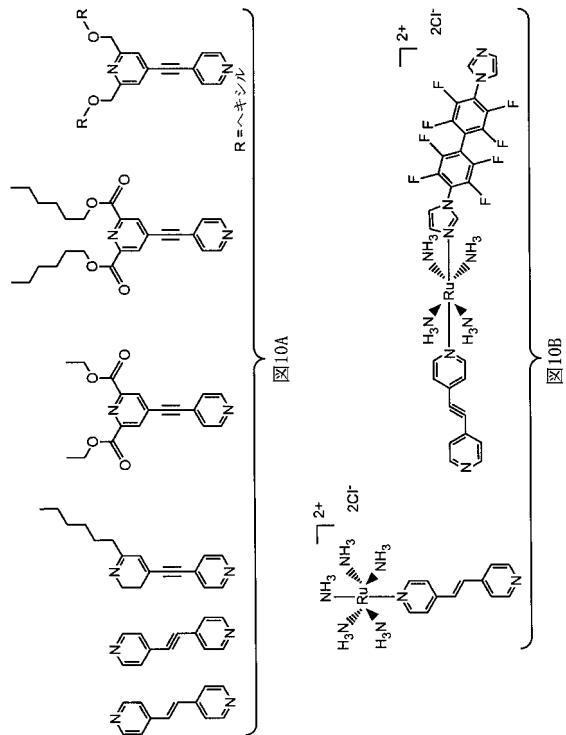
【図 9 A】



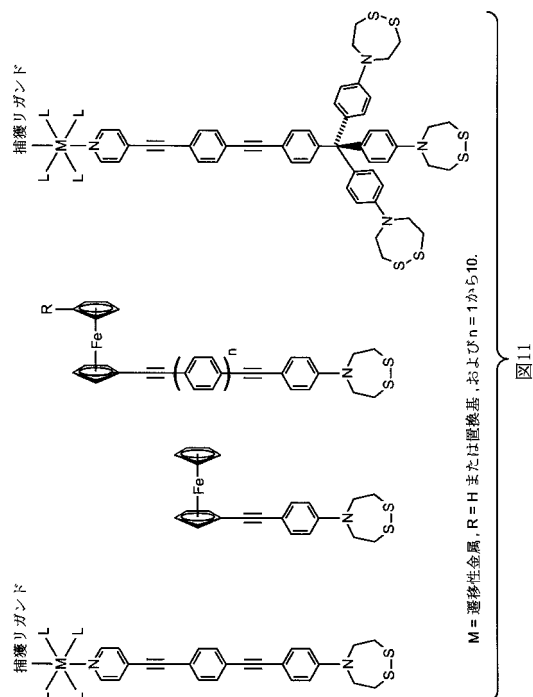
【図9B】



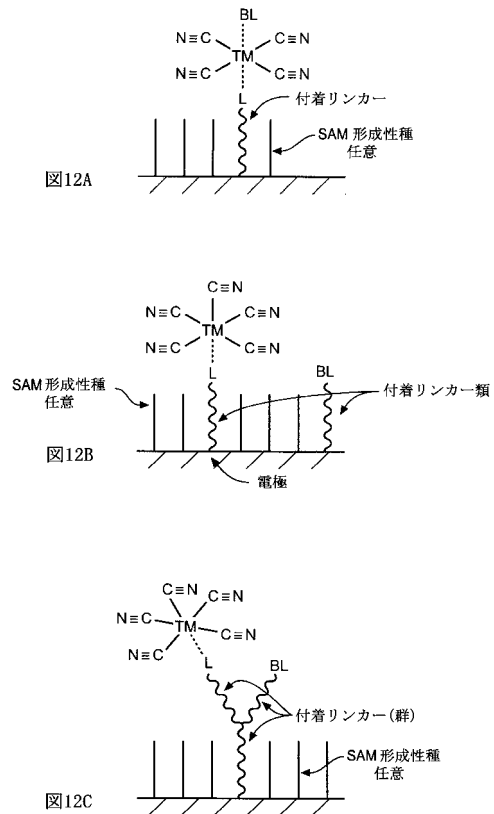
【図10】



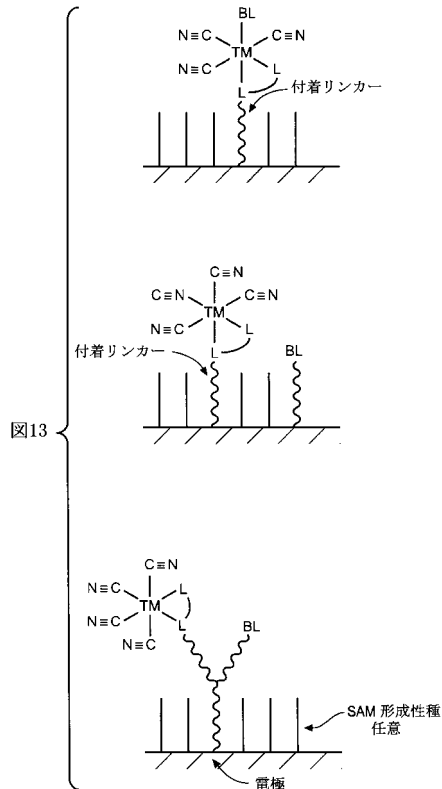
【図11】



【図12】



【図 13】



【図 14】

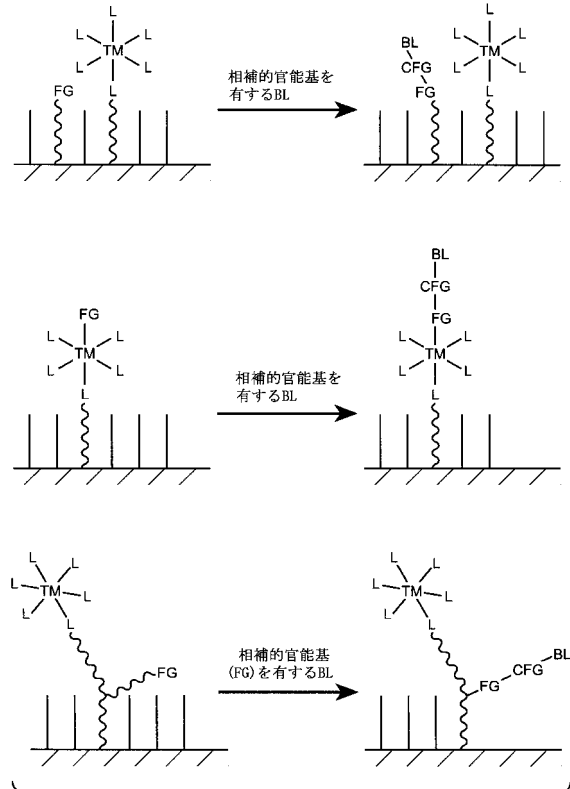


図14

【図 15】

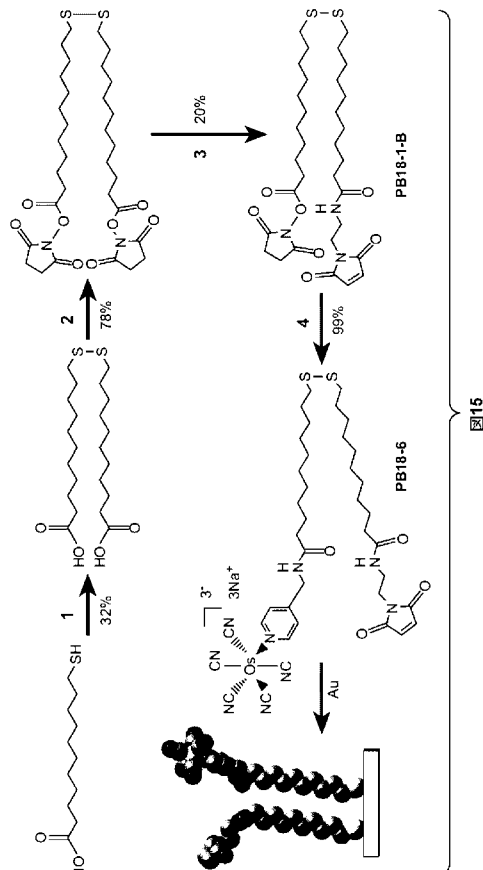
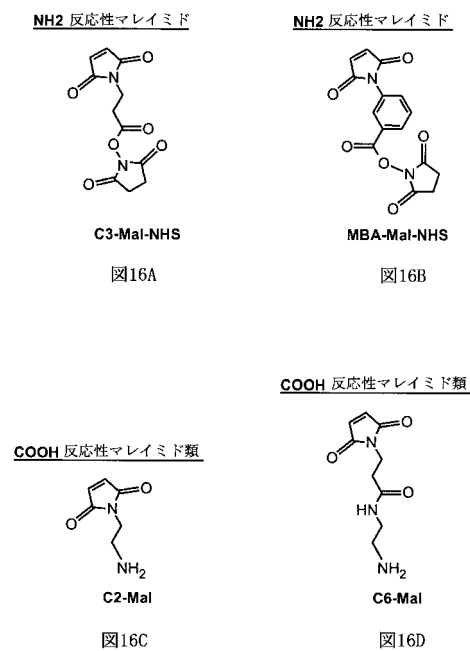
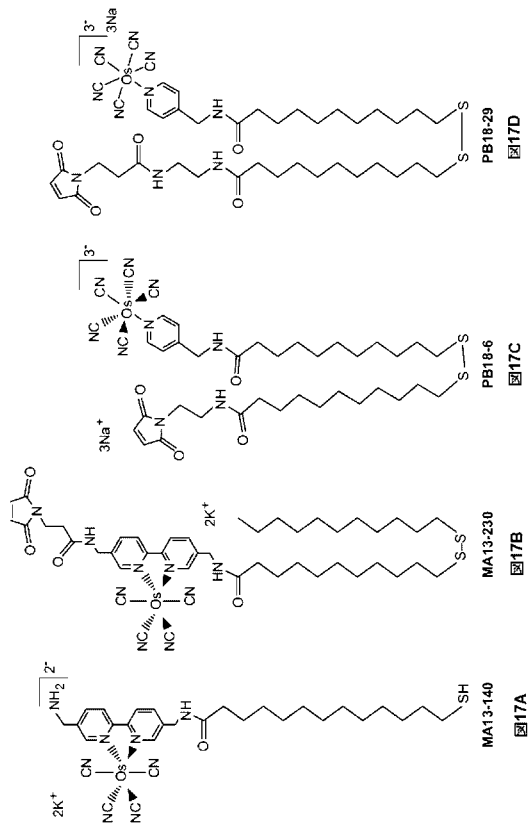


図15

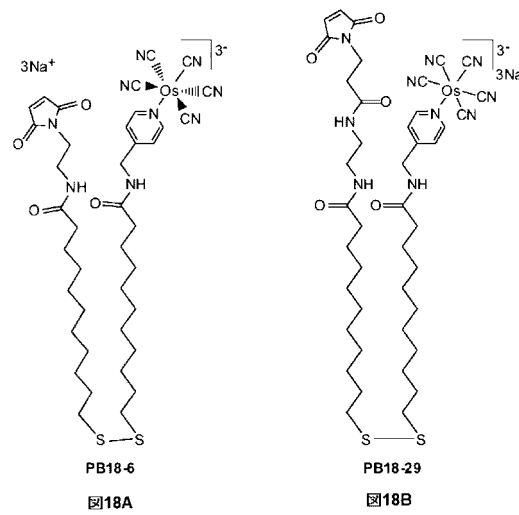
【図 16】



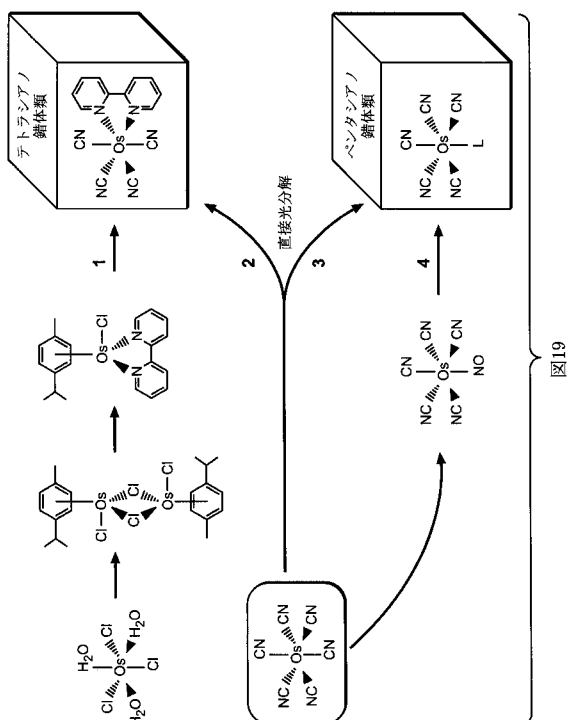
【図 17】



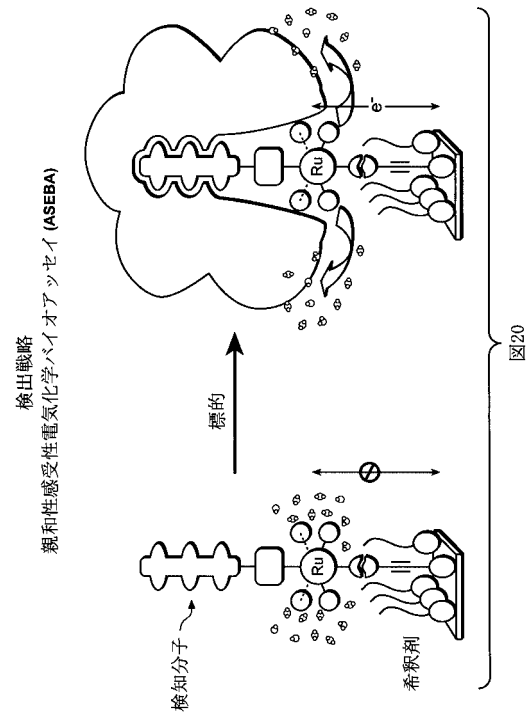
【図 18】



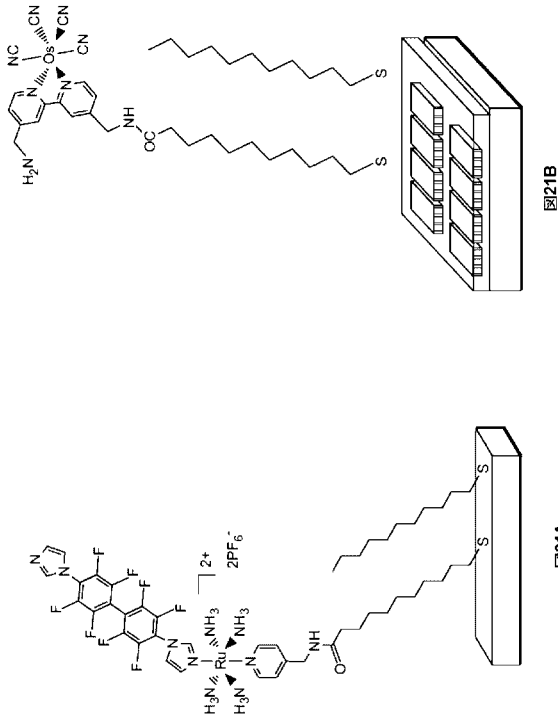
【図 19】



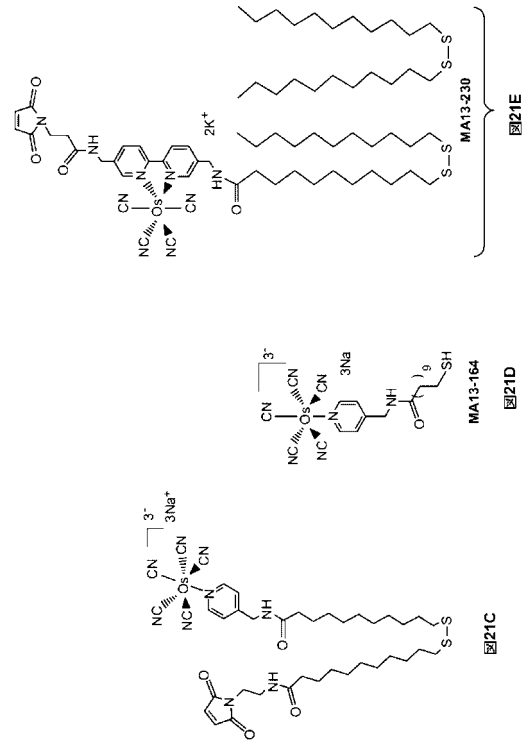
【図 20】



【図 21 A - B】



【図 21 C - E】



【図 22】

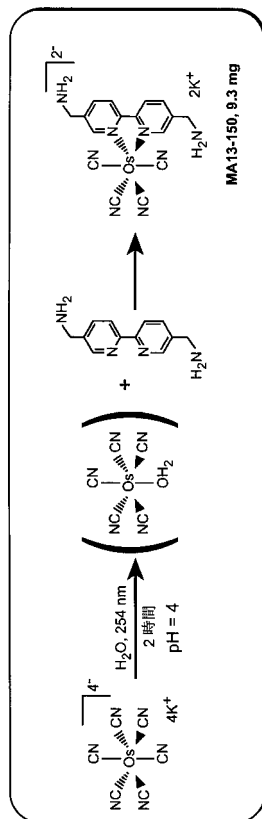
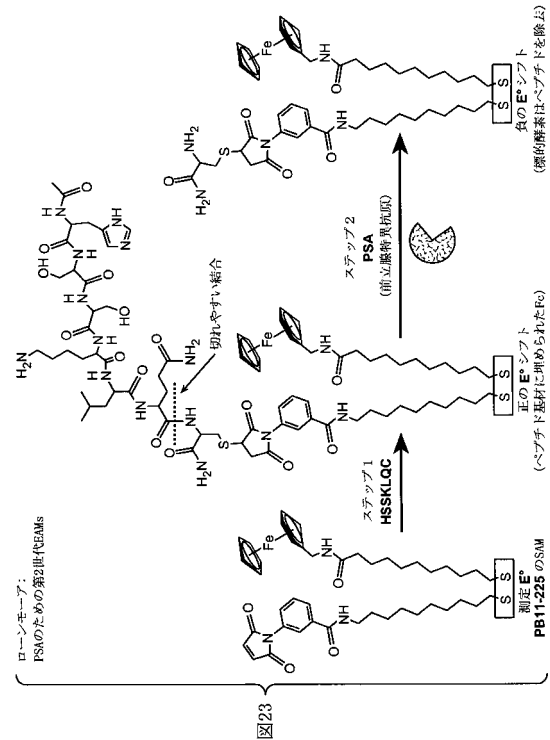


図22

【図 23】





## 【図 24】

## 捕獲リガンド類

## ・ カルボン酸反応性捕獲リガンド

1. 炭疽菌ペプチド: Fmoc-NH-ATYPLPIR-COOH
2. SEBペプチド: Fmoc-NH-YYWLHH-Cys-COOH

## ・ マレイミド反応性捕獲リガンド類

1. E. coliペプチド: Ac NH-LHHRTLSIQGGGS-Cys-COO
2. PSAペプチド: Ac NH-HSSKLQ-Cys-COOH
3. SEBペプチド: NH<sub>2</sub>-YYWLHH-Cys-COOH
4. 炭疽菌ペプチド: NH<sub>2</sub>-ATYPLPIR-COOH
5. チオール基導入ビオチン

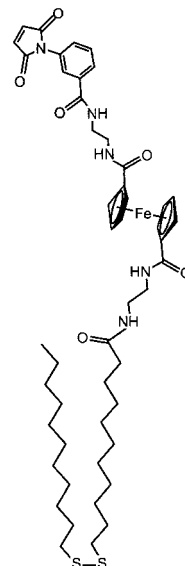


図24

## 【図 25 A - B】

## 異なるフェロセン類

## アミド

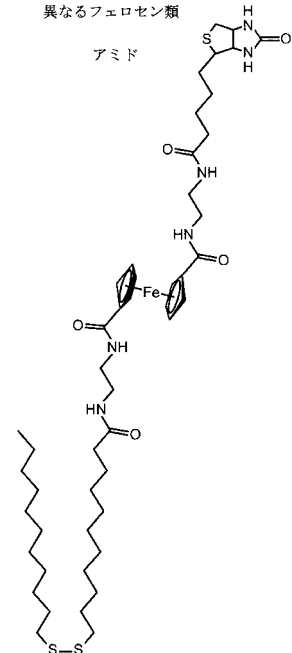


PB18-42

図25A

## 異なるフェロセン類

## アミド



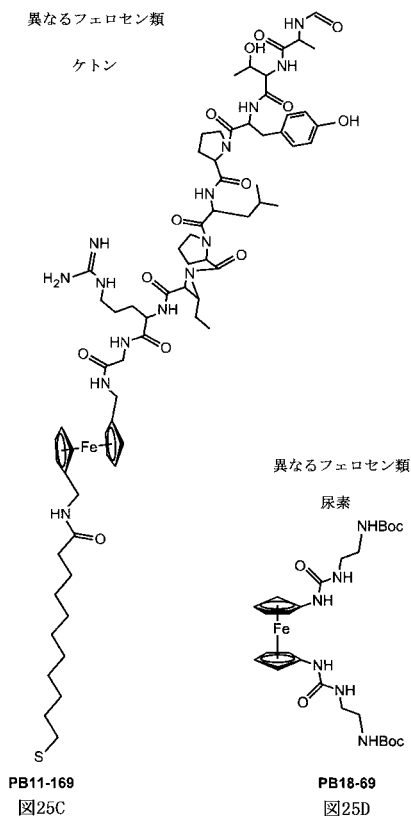
PB18-44

図25B

## 【図 25 C - D】

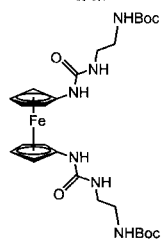
## 異なるフェロセン類

## ケトン

PB11-169  
図25C

## 異なるフェロセン類

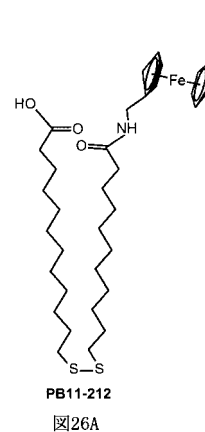
## 尿素

PB18-69  
図25D

## 【図 26 A - B】

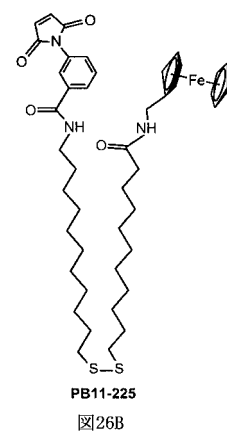
## 普遍的フェロセン EAM

## 前駆体類

PB11-212  
図26A

## 普遍的フェロセン EAM

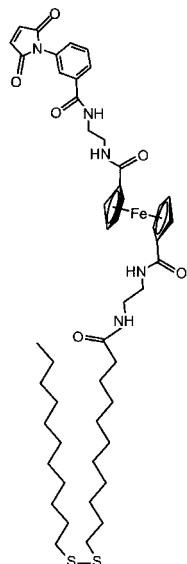
## 前駆体類

PB11-225  
図26B

## 【図 26 C - D】

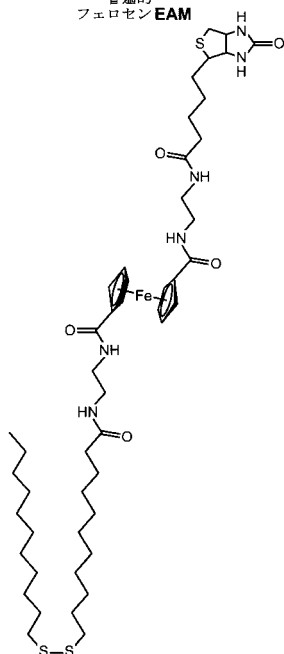
普遍的  
フェロセン EAM

前駆体類



PB18-42

図26C

普遍的  
フェロセン EAM

PB18-44

図26D

## 【図 27】

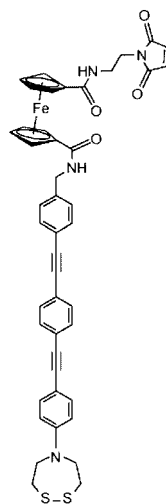


図27A

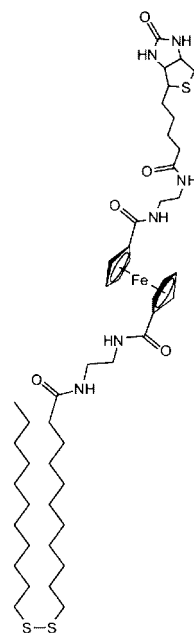


図27B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/80378

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - H01L 21/302; H01L 21/461 (2008.04) USPC - 438/718 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - H01L 21/302; H01L 21/461 (2008.04) USPC - 438/718 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 257/40 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Data bases: PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google(Scholar,Patents) Terms used: sensor, detector, indicator, ligand, electrode, redox, transition metal, reorganization energy, assay, semiconductor, antibody, monolayer		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2006/0003382 A1 (ECKERMANN, et al.) 05 January 2006 (05.01.2006), para [0009], [0101], [0034]-[0063], [0084]-[0096], [0100], [0117]	1-6, 25-30, 43-46 31-42, 47-50
Y	US 6,932,894 B2 (MAO, et al.) 06 March 2003 (06.03.2003), abstract, col 5, ln 66-67; col 6, ln 1-12	31-33
Y	US 6,750,016 B2 (MIRKIN, et al.) 30 January 2003 (30.01.2003), col 13 ln 6-7; col 15, ln 16-18	34-37, 47-50
Y	US 7,016,523 B2 (MEADE) 21 March 2002 (21.03.2002), col 6, ln 41-53; col 8, ln 33-67; col 9, ln 1-22; col 12, ln 5-19; col 14, ln 6-19	37-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 12 December 2008 (12.12.2008)		Date of mailing of the international search report <b>29 DEC 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/80379

**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.:  
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.: 7-24  
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.

## 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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, 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

(72)発明者 ベルタン, ポール, エー.  
アメリカ合衆国, イリノイ州 60614, シカゴ, ユニット 2 ビー, ノース シェフィールド  
2525

(72)発明者 エッカーマン, アマンダ  
アメリカ合衆国, イリノイ州 60201, エバンストン, セントラル ストリート 2333,  
ナンバー 306

(72)発明者 ジョルガノポウロウ, ディミトラ  
アメリカ合衆国, イリノイ州 60614, シカゴ, ノース ボスワース アベニュー 6525

(72)発明者 グレイ, ハリー, ビー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91106, パサディナ, イースト カリフォルニア ブール  
バード 1415

(72)発明者 ミード, トーマス, ジェー.  
アメリカ合衆国, イリノイ州 60201, エバンストン, シェリダン ロード, 2145

(72)発明者 ウンダー, マルクス, フランツ  
アメリカ合衆国, イリノイ州 60201, エバンストン, セントラル ストリート 2333,  
ナンバー 306