



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2013137419, 11.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.01.2012Дата регистрации:
20.12.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.01.2011 US 61/431,786

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2015 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 10.01.2017 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.08.2013(86) Заявка РСТ:
US 2012/020965 (11.01.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/097081 (19.07.2012)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДАС Джаготамой (СА),
КЕЛЛИ Шана О. (СА)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ ГАВЕРНИНГ КАУНСИЛ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТОРОНТО (СА)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2010/025547 A1, 11.03.2010.
ESTEVA FJ., et al., Clinical utility of serum
HER2/neu in monitoring and prediction of
progression-free survival in metastatic breast
cancer patients treated with trastuzumab-based
therapies. Breast Cancer Res. 2005;7(4):R436-43.
Epub 2005 Apr 8. US 2008/0081329 A1,
03.04.2008. ZENG G., et al., Nanostructures and
(см. прод.)

(54) СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ

(57) Формула изобретения

1. Система детекции для электрохимического выявления белкового анализата, включающая: наноструктурированный микроэлектрод, содержащий линкер на своей поверхности, где линкер присоединен к антителу или его фрагменту, способным связывать белковый анализат; и редокс-репортер, способный к переносу электронов с указанным наноструктурированным микроэлектродом, где связывание белкового анализата с указанным антителом или его фрагментом препятствует переносу электронов между указанным редокс-репортером и указанным наноструктурированным микроэлектродом.

2. Система по п. 1, в которой линкер содержит функциональную группу, способную к прямому или опосредованному спариванию с антителом или его фрагментом.

3. Система по п. 1, в которой линкер содержит функциональную аминогруппу.

4. Система по п. 1, в которой линкер содержит функциональную группу карбоновой кислоты.

5. Система по п. 1, в которой линкер представляет собой цистамин, цистеамин, меркаптопропионовую кислоту или 4-аминотиофенол.

6. Система по п. 1, в которой линкер присоединен к антителу или его фрагменту через второй линкер.

7. Система по п. 6, в которой второй линкер представляет собой глутаральдегид или формальдегид.

8. Система по п. 1, в которой линкер связан с множественными копиями антитела или его фрагмента.

9. Система по п. 1, в которой антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из поликлональной антисыворотки, поликлонального антитела, моноклонального антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fv-фрагмента, одноцепочечного антитела, CDR-пептида и диантител.

10. Система по п. 1, в которой редокс-репортер способен генерировать электрохимический сигнал с электродом в случае приложения потенциала.

11. Система по п. 1, в которой редокс-репортер генерирует фарадеевский ток.

12. Система по п. 1, в которой редокс-репортер способен к переносу электронов через границу раздела.

13. Система по п. 1, в которой редокс-репортер представляет собой феррицианид/ ферроцианид или ферроцен.

14. Система по п. 1, в которой редокс-репортер представляет собой гексахлориридат (IV)/гексахлориридат(III).

15. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод изготовлен из благородного металла.

16. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод является угольным.

17. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод изготовлен из оксида индия и олова.

18. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод изготовлен из золота, палладия или платины.

19. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 150 микрон.

20. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод имеет размер примерно от 5 до примерно 50 микрон.

21. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 10 микрон.

22. Система по п. 1, в которой наноструктурированный микроэлектрод находится на чипе, изготовленном микротехнологическими способами.

23. Система по п. 1, в которой белковый анализ представляет собой биомаркер заболевания, расстройства или состояния.

24. Система по п. 23, в которой биомаркер представляет собой биомаркер злокачественной опухоли.

25. Система по п. 23, в которой биомаркер выбран из группы, состоящей из BRCA1, BRCA1, Her2/neu, альфа-фетопротейна, бета-2-микроглобулина, антигена опухоли мочевого пузыря, ракового антигена 15-3, ракового антигена 19-9, хорионического гонадотропина человека, ракового антигена 72-4, ракового антигена 125 (CA-125), кальцитонина, карциноэмбрионального антигена, EGFR, рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, моноклональных иммуноглобулинов, нейрон-специфичной енолазы, NMP22, тиреоглобулина, рецепторов прогестерона, специфического антигена предстательной железы (PSA), специфического мембранного антигена предстательной железы, простатической кислой фосфатазы, S-100 и TA-90 или их части, варианта или

фрагмента.

26. Система по п. 23, в которой биомаркер представляет собой биомаркер инфекции, вызванной бактериями *Staphylococcus* или *Streptococcus*.

27. Способ электрохимической детекции белкового анализата, включающий:

приведение первого наноструктурированного микроэлектрода, содержащего линкер на своей поверхности, где линкер присоединен к антителу или его фрагменту, способным связывать белковый анализат, в контакт с образцом и редокс-репортером, способными к переносу электронов с указанным наноструктурированным микроэлектродом, где связывание белкового анализата с указанным антителом или его фрагментом препятствует переносу электронов между указанным редокс-репортером и указанным наноструктурированным микроэлектродом;

измерение первого электрохимического сигнала, генерируемого первым меченным антителом наноструктурированным микроэлектродом и редокс-репортером в случае приложения потенциала; и

сравнение первого электрохимического сигнала с сигналом контрольного образца, не содержащего белкового анализата;

где изменение выявляемого первого электрохимического сигнала относительно первого сигнала контрольного образца, не содержащего белкового анализата, является показателем присутствия первого белкового анализата в образце.

28. Способ по п. 27, в котором линкер содержит функциональную группу, способную к прямому или опосредованному спариванию с антителом или его фрагментом.

29. Способ по п. 27, в котором линкер содержит функциональную аминокгруппу.

30. Способ по п. 27, в котором линкер содержит функциональную группу карбоновой кислоты.

31. Способ по п. 27, в котором линкер представляет собой цистамин, цистеамин, меркаптопропионовую кислоту или 4-аминотиофенол.

32. Способ по п. 27, в котором линкер присоединен к антителу или его фрагменту через второй линкер.

33. Способ по п. 32, в котором второй линкер представляет собой глутаральдегид или формальдегид.

34. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод является меченым множеством копий антитела или его фрагмента.

35. Способ по п. 27, в котором антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из поликлональной антисыворотки, поликлонального антитела, моноклонального антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fv-фрагмента, одноцепочечного антитела, CDR-пептида и диантител.

36. Способ по п. 27, в котором редокс-репортер генерирует фарадеевский ток.

37. Способ по п. 27, в котором редокс-репортер способен к переносу электронов через границу раздела.

38. Способ по п. 27, в котором редокс-репортер представляет собой феррицианид/ ферроцианид или ферроцен.

39. Способ по п. 27, в котором редокс-репортер представляет собой гексахлориридат (IV)/гексахлориридат(III).

40. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод изготовлен из благородного металла.

41. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод является угольным.

42. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод изготовлен из оксида индия и олова.

43. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод изготовлен

из золота, палладия или платины.

44. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 100 микрон.

45. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод имеет размер примерно от 5 до примерно 50 микрон.

46. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 10 микрон.

47. Способ по п. 27, в котором наноструктурированный микроэлектрод находится на чипе, изготовленном микротехнологическими способами.

48. Способ по п. 27, в котором белковый анализ представляет собой биомаркер заболевания, расстройства или состояния.

49. Способ по п. 48, в котором биомаркер представляет собой биомаркер злокачественной опухоли.

50. Способ по п. 48, в котором биомаркер выбран из группы, состоящей из BRCA1, BRCA1, Her2/neu, альфа-фетопротейна, бета-2-микроглобулина, антигена опухоли мочевого пузыря, ракового антигена 15-3, ракового антигена 19-9, хорионического гонадотропина человека, ракового антигена 72-4, ракового антигена 125 (CA-125), кальцитонина, карциноэмбрионального антигена, EGFR, рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, моноклональных иммуноглобулинов, нейрон-специфичной енолазы, NMP22, тиреоглобулина, рецепторов прогестерона, специфического антигена предстательной железы (PSA), специфического мембранного антигена предстательной железы, простатической кислой фосфатазы, S-100 и TA-90 или их части, варианта или фрагмента.

51. Способ по п. 48, в котором биомаркер представляет собой биомаркер инфекции, вызванной бактериями Staphylococcus или Streptococcus.

52. Способ по п. 27, в котором стадию измерения осуществляют, используя вольтамперометрию.

53. Способ по п. 52, в котором вольтамперометрия представляет собой циклическую вольтамперометрию или дифференциальную импульсную вольтамперометрию.

54. Способ по п. 27, в котором указанное изменение включает понижение величины сигнала выявляемого первого электрохимического сигнала относительно первого сигнала контрольного образца.

55. Способ электрохимической детекции множества белковых анализов, включающий: приведение первого наноструктурированного микроэлектрода, содержащего линкер на своей поверхности, где линкер присоединен к первому антителу или его фрагменту, способным связывать белковый анализ, в контакт с образцом и редокс-репортером, способными к переносу электронов с указанным наноструктурированным микроэлектродом, где связывание белкового анализа с указанными антителом или его фрагментом препятствует переносу электронов между указанным редокс-репортером и указанным наноструктурированным микроэлектродом;

измерение первого электрохимического сигнала, генерируемого первым меченным антителом наноструктурированным микроэлектродом и редокс-репортером в случае приложения потенциала;

сравнение первого электрохимического сигнала с сигналом контрольного образца, не содержащего белкового анализа;

где изменение первого электрохимического сигнала, выявляемое относительно соответствующего сигнала контрольного образца, не содержащего белкового анализа, является показателем присутствия белкового анализа в образце.

56. Способ по п. 55, в котором линкер содержит функциональную группу, способную к прямому или опосредованному спариванию с антителом или его фрагментом.

57. Способ по п. 55, в котором наноструктурированный микроэлектрод является меченным множеством копий антитела или его фрагмента.

58. Способ по п. 55, в котором редокс-репортер способен к переносу электронов через границу раздела.

59. Способ по п. 55, в котором наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 100 микрон.

60. Способ по п. 55, дополнительно включающий:

приведение второго наноструктурированного микроэлектрода, содержащего второй линкер на своей поверхности, в контакт с образцом и редокс-репортером, где указанный второй линкер присоединен ко второму антителу или его фрагменту, способным связывать второй белковый анализ;

измерение второго электрохимического сигнала, генерируемого вторым меченным антителом наноструктурированным микроэлектродом и редокс-репортером в случае приложения потенциала; и

сравнение второго электрохимического сигнала со вторым сигналом, генерируемым вторым меченным антителом наноструктурированным микроэлектродом в контрольном образце, не содержащем белкового анализата;

где изменение второго электрохимического сигнала, выявляемое относительно второго сигнала контрольного образца, не содержащего белкового анализата, является показателем присутствия второго белкового анализата в образце.

61. Способ по п. 55, в котором и первый, и второй наноструктурированные микроэлектроды находятся на чипе, изготовленном микротехнологическими способами.

62. Способ по п. 55, в котором и первый, и второй наноструктурированные микроэлектроды находятся на разных чипах, изготовленных микротехнологическими способами.

63. Способ по п. 55, в котором второй меченный антителом наноструктурированный микроэлектрод является эталонным контролем для первого меченного антителом наноструктурированного микроэлектрода.

64. Способ по п. 55, в котором второй меченный антителом наноструктурированный микроэлектрод выявляет широко распространенный в сыворотке белок.

65. Способ мониторинга прогрессирования или ответа у субъекта, имеющего злокачественную опухоль, включающий:

получение биологического образца от субъекта;

приведение наноструктурированного микроэлектрода, содержащего линкер на своей поверхности, где линкер присоединен к антителу или его фрагменту, способным связывать указанный белковый анализ, в контакт с образцом и редокс-репортером, способными к переносу электронов с указанным наноструктурированным микроэлектродом, где антитело или его фрагмент связываются с белковым анализом, и где связывание белкового анализата с указанными антителом или его фрагментом препятствует переносу электронов между указанным редокс-репортером и указанным наноструктурированным микроэлектродом;

измерение электрохимического сигнала, генерируемого меченным антителом наноструктурированным микроэлектродом и редокс-репортером в случае приложения потенциала; сравнение электрохимического сигнала с сигналом контрольного образца, не содержащего белкового анализата;

где изменение сигнала, выявляемое относительно сигнала контрольного образца, не содержащего белкового анализата, является показателем присутствия белкового анализата в образце;

и

оценку прогрессирования или ответа на основании изменения сигнала.

66. Способ по п. 65, в котором белковый анализ представляет собой биомаркер злокачественной опухоли.

67. Способ по п. 65, в котором белковый анализ представляет собой биомаркер, выбранный из группы, состоящей из BRCA1, BRCA1, Her2/neu, альфа-фетопротеина, бета-2-микроглобулина, антигена опухоли мочевого пузыря, ракового антигена 15-3, ракового антигена 19-9, хорионического гонадотропина человека, ракового антигена 72-4, ракового антигена 125 (CA-125), кальцитонина, карциноэмбрионального антигена, EGFR, рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, моноклональных иммуноглобулинов, нейрон-специфичной енолазы, NMP22, тиреоглобулина, рецепторов прогестерона, специфического антигена предстательной железы (PSA), специфического мембранного антигена предстательной железы, простатической кислой фосфатазы, S-100 и ТА-90 или их части, варианта или фрагмента.

68. Способ по п. 65, в котором указанное изменение включает понижение величины сигнала выявляемого первого электрохимического сигнала относительно первого сигнала контрольного образца.

69. Способ по п. 65, в котором наноструктурированный микроэлектрод имеет размер меньше чем примерно 100 микрон.

70. Набор для электрохимической детекции белкового анализа, включающий:
наноструктурированный микроэлектрод, содержащий линкер на своей поверхности, где линкер присоединен к антителу или его фрагменту, способным связывать белковый анализ; и

редокс-репортер, способный к переносу электронов с указанным наноструктурированным микроэлектродом и генерированию электрохимического сигнала с указанным наноструктурированным микроэлектродом в случае приложения потенциала, и где связывание белкового анализа с указанными антителом или его фрагментом препятствует переносу электронов между указанным редокс-репортером и указанным наноструктурированным микроэлектродом.

(56) (продолжение):

molecular force bases of a highly sensitive capacitive immunosensor. *Proteomics*. 2005 Nov;5(17):4347-53.

R U 2 6 0 6 8 5 2 C 2

R U 2 6 0 6 8 5 2 C 2