

(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2015-516066

(P2015-516066A)

(43) 公表日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 27/327 (2006.01)	GO1N 27/30	357
GO1N 27/416 (2006.01)	GO1N 27/30	351

GO1N 27/46 336G

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 國際出願番号 (87) 國際公開番号 (87) 國際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2015-509493 (P2015-509493) 平成25年5月1日 (2013.5.1) 平成26年12月27日 (2014.12.27) PCT/GB2013/051121 W02013/164611 平成25年11月7日 (2013.11.7) 1207585.9 平成24年5月1日 (2012.5.1) 英國 (GB)	(71) 出願人 アイシス イノベーション リミテッド イギリス国 オーエックス2 7エスジー オックスフォード, サマータウン, エバ ート プレイス, エバート ハウス (71) 出願人 ユニバージデード、エスタデュアル、パウ リスタ、フリオ、デ、メスキータ、フィル ホ UNIVERSIDADE ESTADUA L PAULISTA JULIO D E MESQUITA FILHO ブラジル国サンパウロ州、サンパウロ、セ ントロ、215、ルア、キリノ、デ、アン ドラーデ
--	--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】電極およびその使用

(57) 【要約】

本願は、標的種の電気化学的検出に使用するための電極であって、電極が平面を有し、その上に標的種に選択的に結合可能なプローブ分子が配置され、プローブ分子と標的種との結合前の電極が、電極の面積当たりに、10メガオーム cm⁻² から95メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗を有する電極に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的種の電気化学的検出に使用するための電極であって、前記電極が平面を有し、前記平面上に前記標的種に選択的に結合可能なプローブ分子が配置され、前記プローブ分子と前記標的種との結合前の前記電極が、前記電極の面積当たりに、 10 メガオーム cm^{-2} から 95 メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する、
電極。

【請求項 2】

前記標的種が、C反応性タンパク質を含むか、または、C反応性タンパク質である、請求項1記載の電極。
10

【請求項 3】

前記プローブ分子が、抗体および／または抗体フラグメントを含むか、または、抗体および／または抗体フラグメントである、請求項1または請求項2記載の電極。

【請求項 4】

前記抗体または抗体フラグメントが、IgG、IgA、IgD、IgEおよびIgMから選択されるクラスのものである、請求項3記載の電極。

【請求項 5】

前記プローブ分子と前記標的種との結合前の前記電極が、前記電極の面積当たりに、 55 メガオーム cm^{-2} から 95 メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する、請求項1から4のいずれか一項に記載の電極。
20

【請求項 6】

前記プローブ分子と前記標的種との結合前の前記電極が、前記電極の面積当たりに、 65 メガオーム cm^{-2} から 90 メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の電極。

【請求項 7】

前記プローブ分子と前記標的種との結合前の前記電極が、前記電極の面積当たりに、 75 メガオーム cm^{-2} から 85 メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する、請求項1から6のいずれか一項に記載の電極。

【請求項 8】

前記電極が、遷移金属を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の電極。
30

【請求項 9】

前記電極が、金、レニウム、イリジウム、パラジウム、白金、銅、インジウム、ルビジウムおよび銀から選択される金属を含む、請求項8記載の使用のための電極。

【請求項 10】

前記プローブ分子が、式A-L-Bのものであり、Aが、前記電極の表面に結合する部分であり、Lが、リンカー部分であり、Bが、前記標的種に選択的に結合する部分である、請求項1から9のいずれか一項に記載の電極。

【請求項 11】

Aが、ビオチン、ヒドラジン、アルキニル、アルキルアジド、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、チオール、アルデヒド、ホスホイノチオエステル、マレイミジル、スクシニル、スクシンイミジル、イソシアネット、エステル、ストレプトアビジン、アビジン、ニューアビジン(neuavidin)およびビオチン結合タンパク質から選択される、請求項10記載の電極。
40

【請求項 12】

Lが、炭化水素部分を含む、請求項10または請求項11記載の電極。

【請求項 13】

Lが、少なくとも10個の炭素を含むアルキレン部分を含む、請求項10から12のいずれか一項に記載の電極。

【請求項 14】

Lが、式 $-\left(\text{CH}_2\right)_n-\left(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\right)_m-\text{D}-$ のものであり、式中、
50

n が、1から30であり、 m が、0から10であり、D が、B に結合する基である、請求項10から13のいずれか一項に記載の電極。

【請求項15】

D が、単結合、- (C=O) -、-OCH₂- (C=O) -、- (C=O) -NH-、- (C=O) -O-、-O-、-OCH₂- (C=O) -NH-、-OCH₂- (C=O) -O-、-O-および-NH-から選択される、請求項14記載の電極。

【請求項16】

B が、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、オリゴ糖、ペプチドおよびタンパク質から選択される、請求項10から15のいずれか一項に記載の電極。

【請求項17】

電気化学的インピーダンス分光技術において標的種を検出するための方法であって、請求項1から16のいずれか一項に規定の電極を、前記標的種を含むキャリア媒体と接触させる工程と、作用電極において電気信号を検出する工程とを含む、方法。

【請求項18】

前記標的種が、C反応性タンパク質であるか、または、C反応性タンパク質を含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記キャリア媒体が、体液を含む、請求項17または請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記体液が、血液、尿、涙、唾液、汗および髄液から選択される、請求項19記載の方法。

【請求項21】

前記体液が、未希釈の体液である、請求項19または請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記キャリア媒体が、さらに、酸化還元プローブを含む、請求項17から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記方法が、さらに、前記電気信号からC反応性タンパク質の濃度を算出する工程を含む、請求項17から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記方法が、さらに、前記標的種が前記プローブ分子に結合されるように、前記電極と前記標的種を含むキャリア媒体とを接触させる接触工程後に、前記プローブ分子から前記標的種を解離させる工程を含む、請求項17から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記方法が、前記プローブ分子から前記標的種を解離させる工程後に、前記電極を電気化学的方法において再使用する工程を含む、請求項24記載の方法。

【請求項26】

電気化学的インピーダンス分光計であって、前記分光計が、請求項1から16のいずれか一項に規定の電極を含む、

分光計。

【請求項27】

C反応性タンパク質を検出するための、請求項1から16に記載の電極または請求項26記載の電気化学的インピーダンス分光計の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的種、例えば、制限されず、C反応性タンパク質の電気化学的検出に使用するための電極に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

C反応性タンパク質(CRP)は、肝臓により合成される急性期タンパク質であり、心血管疾患および炎症用のバイオマーカーとして広く受け入れられている(May and Wang 2007, Miller et al. 2007, Mygind et al. 2011, Pai et al. 2008)。通常、血漿中のレベルは、健康な個体については 2.0 mg/L 未満であるが(Vikholm-Lundin and Albers 2006)、炎症の急性期中には1000倍まで増加する(Gabay and Kushner 1999)。米国心臓協会および米国疾病予防管理センターは、心血管疾患のリスク評価のためのCRP濃度の3つの分類：低リスクを表わす 1.0 mg/L より低いCRP濃度、 1.0 から 3.0 mg/L の範囲の平均的なリスク、および、高リスクを表わす 3.0 mg/L を上回るレベルを提唱している(Kushner and Sehgal 2002, Lee et al. 2011)。この標的的信頼できる早期の定量化が可能であれば、適切な介入または処置による心血管疾患または炎症性疾患の転帰を改善する手段として引用される。10

【0003】

現在、数多くのCRP試験法が、比濁法および比濁分析の技術(Roberts et al. 2000, Roberts et al. 2001)または、ヒトCRP酵素結合免疫吸着アッセイ(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay、ELISA)のキットを使用して、臨床研究室において利用可能である。しかしながら、これらの方法は、一般的には、感度が不十分、時間がかかる、偽陰性が生じやすい、または、費用対効果がない、のいずれかであるため、臨床診察用には適していない(Pearson et al. 2004)。表面プラズモン共鳴(SPR)(Hu et al. 2006, Meyer et al. 2006)、圧電マイクロカンチレバー(Wee et al. 2005)、水晶振動子マイクロバランス技術(Kim et al. 2009)、微少流体技術(Lee et al. 2011)および電気化学(Buch and Rishpon 2008, Centi et al. 2009)に基づくCRP定量法が、過去数年の間に開発してきた。これらの中でも、電気化学的アッセイが、低コスト、柔軟性および感度の点で最も見込みがある。特に、電気化学的インピーダンス分光法(EIS)は、特別に調製された受容性の電極表面において結合する材料に関連する、キャパシタンスまたは電荷移動抵抗の変化を、高感度にモニターすることができ、事前の標識を必要としない(Bogomolova et al. 2009, Rodriguez et al. 2005)。近年、数多くのEISによるCRPアッセイが報告してきた。しかしながら、今日まで、これらは、感度に限界がある(Vermeeren et al. 2011)、明らかに特異性がない(Hennessey et al. 2009)または、臨床的に適切な範囲を包含しない(Chen et al. 2008, Qureshi et al. 2010)、かのいずれかであった。2030

【発明の概要】

【0004】

本発明の主題は、臨床的に適切な範囲全体における、全血清および希釈血清におけるCRPについての堅牢で高感度なアッセイの開発に関する。この技術は、他のマーカーにも適用され得る。界面は容易に調製され、非常に良好な選択性を示し、感度の明らかな損失を伴うことなく、アッセイ後に再使用可能である。我々は、さらに、受容層の連続的に観察される感度における初期抵抗の重要性を考慮し、明確な相関だけでなく、調節する能力も説明してきた。このため、受容性のフィルム特性を最適化する。40

【0005】

第1の態様では、標的種の電気化学的検出に使用するための電極であって、標的種に選択的に結合可能なプローブ分子が配置される平面を有し、プローブ分子と標的種との結合前の電極が、電極の面積当たりに、 10 メガオーム cm^{-2} から 95 メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する電極が提供される。実施形態では、標的種は、C反応性タンパク質であるか、もしくは、C反応性タンパク質を含み、および/または、プローブ分子は、50

抗体もしくは抗体フラグメントを含む。ただし、他の標的種およびプローブ分子の使用は、以下に記載される。実施形態では、C反応性タンパク質の電気化学的検出に使用するための電極であって、電極が平面を有し、その上にC反応性タンパク質に選択的に結合可能なプローブ分子が配置され、プローブ分子とC反応性タンパク質との結合前の電極が、電極の面積当たりに、10メガオーム cm^{-2} から95メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する電極が提供される。

【0006】

実施形態では、標的種の電気化学的検出に使用するための電極であって、電極が平面を有し、標的種に選択的に結合可能な、抗体または抗体フラグメントを含むプローブ分子が配置され、プローブ分子と標的種との結合前の電極が、電極の面積当たりに、10メガオーム cm^{-2} から95メガオーム cm^{-2} の電子移動抵抗を有する電極が提供される。
10

【0007】

第3の態様では、電気化学的インピーダンス分光技術において標的種を検出するための方法であって、第1の態様に規定の電極を、標的種を含むキャリア媒体と接触させる工程と、作用電極において電気信号を検出する工程とを含む方法が提供される。

【0008】

第3の態様では、電気化学的インピーダンス分光計であって、分光計が、第1の態様に規定の電極を含む分光計が提供される。

【0009】

第4の態様では、標的種を検出するための、第1の態様に記載の電極または第3の態様に記載の電気化学的インピーダンス分光計の使用が提供される。
20

【0010】

本発明者らは、電極の抵抗を制御することを見出してきた。抵抗の制御は、標的に結合する前のプローブ分子の被覆量に関連し、電極の感度が顕著に向上し得る。以前から、表面上のプローブ分子の被覆を増加させることにより、その感度が向上するであろうことが推定されてきた。しかしながら、本発明者らは、(初期抵抗により示される)特定のレベル以下の被覆を維持することにより、電極の感度が向上することを見出した。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、(a)むきだしの金電極；(b)自己組織化単分子膜で被覆された金電極；および(c)単分子膜上に固定化されたCRP抗体を有する金電極についての、1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻を含むPBST(10mM、pH 7.4)溶液中で記録された種々の電極のNyquistプロットを示す。挿入図は、高周波数領域の拡大図である。
30

【図2】図2は、(A)初期の電荷移動抵抗 R_{ct} およびバイオセンサの感度(感度は、初期 R_{ct} で割られた R_{ct} の変化として決定される。)における、CRP抗体固定化時間の効果、ならびに、(B)初期 R_{ct} と感度との間の相関関係を示す。

【図3】図3は、(A)1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻を含むPBST(10mM、pH 7.4)における種々の濃度のCRPタンパク質とのインキュベート後における、バイオセンサの記録された電荷移動抵抗(R_{ct})、および、(B)種々のCRP濃度を含むPBST溶液中のインキュベート後における、バイオセンサに対応するFaradicインピーダンススペクトルを示す(曲線iからviiiは、それぞれ、0、0.5、1.0、2.0、5.0、10、25および50nM CRPを表わす。)。
40

【図4】図4は、(A)種々の溶液：(i)1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻を含むPBST(10mM、pH 7.4)；(ii)1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻および10%ヒト血清を含むPBST(10mM、pH 7.4)；(iii)1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻および20%ヒト血清を含むPBST(10mM、pH 7.4)；において行われたCRPバイオセンサについての検量線、ならびに、(B)種々のCRP濃度を有する、1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻および10%ヒト血清を含むPBST溶液中のインキュベート後における、バイオセンサに対応するFaradic

a d a i c インピーダンススペクトルを示す（曲線 i から v i i i は、それぞれ、0、0.5、1.0、2.0、5.0、10、25 および 50 nM C R P を表わす。）。

【図 5】図 5 は、バッファー溶液および純粋な血清における C R P のバイオセンサ分析の比較を示す。バイオセンサを、C R P 添加バッファー溶液および純粋な血清中でそれぞれインキュベートし、インピーダンス分析を、1.0 mM Fe(CN)₆^{3- / 4-} を含む P B S T 溶液中で行った。C R P を含まないバッファーまたは純粋な血清のインピーダンスレベルを、バックグラウンドとして差し引いた。

【図 6】図 6 は、C R P バイオセンサの再生を示す。バイオセンサを、6 mM NaOH および 0.6% エタノールに 5 分間、電極を浸漬することにより再生し、ついで、P B S T で洗浄した。インピーダンス測定を、P B S T (10 mM, pH 7.4)、1.0 mM Fe(CN)₆^{3- / 4-} および 10% ヒト血清を含む溶液において行った。
10

【図 7】図 7 は、C R P 反応性 E I S 界面の段階的な製作の模式図である。

【図 8】図 8 は、本願明細書に記載の電極の電荷移動抵抗を測定するためのデータ適合に使用され得る等価回路モデルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、本願明細書に記載の第 1 から第 4 の態様を提供する。任意および好ましい特徴は、これから記載されるであろう。本願明細書に記載のいずれの特徴も、特に断らない限り、本願明細書に記載のいずれかの他の特徴と組み合わせられてもよい。

【0013】

プローブ分子と標的種との結合前の電極は、好ましくは、電極の面積当たりに、95 メガオーム cm⁻² 以下の電子移動抵抗を有する。プローブ分子と標的種との結合前の電極は、好ましくは、電極の面積当たりに、10 メガオーム cm⁻² 以上の電子移動抵抗を有する。プローブ分子と標的種との結合前の電極は、好ましくは、電極の面積当たりに、10 メガオーム cm⁻² から 95 メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗を有する。
20

【0014】

場合により、プローブ分子と標的種との結合前の電極は、電極の面積当たりに、20 メガオーム cm⁻² から 95 メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗、場合により、電極の面積当たりに、40 メガオーム cm⁻² から 95 メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗、場合により、電極の面積当たりに、50 メガオーム cm⁻² から 95 メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗、場合により、電極の面積当たりに、55 メガオーム cm⁻² から 95 メガオーム cm⁻² の電子移動抵抗を有する。
30

【0015】

電子移動抵抗（電荷移動抵抗と呼ばれることがある）は、公知の技術を使用して測定され得る。実施形態では、電子移動抵抗は、電極についてのインピーダンス情報を取得するための電気化学的インピーダンス分光法を使用し、理想 R a n d l e s 等価回路を使用することにより測定される。等価回路は、回路の素子として、電荷移動抵抗を含む。このような R a n d l e s 等価回路は、例えば、V y a s R N , L i K Y , W a n g B . 2 0 1 0 . M o d i f y i n g R a n d i e s C i r c u i t f o r A n a l y s i s o f P o l y o x o m e t a l a t e L a y e r - b y - L a y e r F i l m s . J o u r n a l o f P h y s i c a l C h e m i s t r y B 1 1 4 : 1 5 8 1 8 - 1 5 8 2 4 に記載されており、同文献は、参照により本願明細書に組み込まれる。理想 R a n d l e s 等価回路の例は、図 8 に図示される。この図において、R_{c_t} は、電荷（または電子）移動抵抗を表わし、Z_w は、W a r b u r g インピーダンスを表わし、R_s は、溶液抵抗であり（R_{s₀} と表わされることもある）、C_{d₁} は、電極表面と、液体状のキャリア媒体におけるイオンとの間のキャパシタンスである（これは、C_{s_ur_f} と表わされることもある。）。電子（または電荷）移動抵抗を取得するための回路に対してインピーダンスデータを適合させることは、当業者に公知である。それは、多くの刊行物、例えば、制限されず、E l e c t r o a n a l y s i s 1 9 , 2 0 0 7 , N o . 1 2 , 1 2 3 9 - 1 2 5 7 (D a n i e l s , e t a l) により著された L a b e l
40

- free Impedance Biosensors: Opportunities and Challengesと題された文献)に記載されており、同文献は、その内容およびそれに引用された参考文献が参照により本願明細書に組み込まれる。市販のソフトウェア、例えば、Autolab, The Netherlandsから入手できる「Fit and Simulation version 1.7」が、回路適合に利用可能である。ソフトウェアは、EIS分光計の(例えば、Autolab, The Netherlandsからも入手できる)周波数解析分析モジュールを付随させてもよい。

【0016】

電極の面積当たりの電子移動抵抗は、(その上にプローブ分子を有する)電極の面積で電極の電荷移動抵抗を割ることにより決定される。この面積は、公知の技術を使用して測定され得る。実施形態では、電極の面積は、電極の有効表面積である。有効表面積は、クーロンのカソードピークの面積を取得し、

10

【0017】

【数1】

$$A = \frac{Q}{482 \mu\text{C cm}^{-2}}$$

【0018】

の相関関係を適用し、有効面積で電荷移動抵抗(R_{ct})を割ることにより算出され得る。Aは、電極の有効表面積であり、Qは、クーロンのカソードピークの面積である(Hoogvliet, J. C.; Dijkisma, M.; Kamp, B.; van Bennenk, W. P. Anal Chem 2000, 72, 2016を参照のこと。同文献は、その内容が参照により本願明細書に組み込まれる。)。

20

【0019】

電極は、任意の電気導電性材料を含み得る。作用電極は、金属またはカーボンを含み得る。金属は、元素形態の金属または金属の合金でもよい。場合により、電極全体が、金属またはカーボンを含む。電極は、遷移金属を含んでもよい。電極は、周期表のグループ9から11のいずれかから選択される遷移金属を含んでもよい。電極は、制限されず、レニウム、イリジウム、パラジウム、プラチナ、銅、インジウム、ルビジウム、銀および金から選択される金属を含んでもよい。電極は、金、銀およびプラチナから選択される金属を含んでもよい。電極は、カーボン含有材料を含んでもよい。カーボン含有材料は縁が平坦な熱分解性グラファイト、基底が平面な熱分解性グラファイト、グラッシャーカーボン、ホウ素ドープされたダイアモンド、非常に規則正しい熱分解性グラファイト、カーボン粉末およびカーボンナノチューブから選択され得る。

30

【0020】

好みしい実施形態では、電極は、金を含む。

【0021】

電極の表面は、平坦であり、通常、平面を含み、典型的には、窪み、突起および孔を含まない。このような電極表面は、プローブ分子および任意の関連するリンカー分子が、表面に結合される前に微粒子による磨き、例えば、場合により、微粒子のサイズが各研磨工程において小さくなる連続工程における微粒子によるスプレー等の技術により調製され得る。微粒子は、例えば、炭素系材料、例えば、ダイアモンドを含んでもよく、および/または、10 μm以下、場合により5 μm以下、場合により3 μm以下、場合により1 μm以下、場合により0.5 μm以下、場合により0.1 μm以下の直径を有する粒子を有してもよい。研磨後に、電極表面は、例えば、超音波的に、場合により、適切な液体媒体、例えば、水中で、例えば、少なくとも1分、例えば、約1分から10分の期間洗浄されてもよい。場合により、電極表面は、例えば、研磨後、使用される場合、超音波洗浄工程後に、研磨剤、例えば、酸溶液により洗浄されてもよい。研磨剤溶液は、適切な液体媒体、例えば、水における、無機酸、例えば、H₂SO₄および/または、過酸化物、例えば、H₂O₂を含んでもよい。場合により、電極は、電解研磨され得る。電解研磨は、微粒子による研磨、例えば、超音波洗浄、および/または、研磨剤溶液を使用した洗浄の1つ以

40

50

上を含む任意の工程に続けてもよい。電解研磨は、安定した還元ピークが達成されるまで、例えば、0.5V以上、場合により1V以上、場合により1.25V以上の上限電位、ならびに、0.5V以下、場合により0.25V以下、場合により0.1V以下の下限電位の、上限電位と下限電位との間ににおけるサイクリングを含んでもよい。

【0022】

プローブ分子は、標的種に対して選択的に結合可能である。標的種は、C反応性タンパク質でもよいし、または、C反応性タンパク質を含んでもよい。他の標的種は、以下に記載される。プローブ分子は、好ましくは、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、オリゴ糖、ペプチドおよびタンパク質から選択される結合種を含む。好ましくは、プローブ分子は、抗体、核酸およびペプチドの1つ以上から選択される結合種を含む。結合種は、標的種、例えば、C反応性タンパク質に結合可能である。プローブ部分は、標的種、例えば、C反応性タンパク質に選択的に結合する。

10

【0023】

プローブ分子が抗体または抗体フラグメントを含む場合、抗体または抗体フラグメントは、クラスIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの1つ以上から選択され得る。好ましい実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、IgGタイプのものである。抗体は、標的種に選択的に結合する。抗体または抗体フラグメントは、哺乳類、例えば、制限されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジおよびウマから選択される哺乳類に由来され得る。実施形態では、プローブ分子は、ヤギ由来のIgGタイプの抗体を含む。

20

【0024】

プローブ分子がアプタマーを含む場合、アプタマーは、ペプチドアプタマー、DNAアプタマーおよびRNAアプタマーから選択され得る。

【0025】

標的種は、制限されず、タンパク質、ポリペプチド、抗体、ナノ粒子、薬物、毒物、有害ガス、有害化学物質、爆発物、ウイルス粒子、細胞、多細胞生物、サイトカインおよびケモカイン、生殖母細胞、小器官、脂質、核酸配列、オリゴ糖、代謝経路の化学中間体、高分子から選択され得る。好ましい実施形態では、標的種は、生体分子、より適切には生体高分子、最も適切にはポリペプチドを含み、生体分子、より適切には生体高分子、最も適切にはポリペプチドを主成分とし、または、生体分子、より適切には生体高分子、最も適切にはポリペプチドからなる。

30

【0026】

標的種がタンパク質であるか、または、タンパク質を含む場合、タンパク質は、制限されず、天然のタンパク質、変性タンパク質、タンパク質フラグメントおよび原核生物的または真核生物的に発現されたタンパク質から選択され得る。タンパク質は、当該分野において、その通常の意味を有し得る。最も好ましくは、「タンパク質」は、ポリペプチド分子を意味する。このようなポリペプチドは、グリコシル化、リン酸化等の修飾または他のこのような修飾を含んでもよい。

【0027】

標的種が抗体である場合、抗体は、クラスIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの1つ以上から選択され得る。

40

【0028】

標的種がナノ粒子である場合、ナノ粒子は、制限されず、絶縁性、金属性または半導体性のナノ粒子の1つ以上から選択され得る。

【0029】

標的種が薬物である場合、薬物は、制限されず、アルコール（例えば、エタノール）、アンフェタミン、硝酸アミル、ヘロイン、ケタミン、アナボリックステロイド、LSD、溶剤、カンナビス、コカイン（例えば、塩酸コカインまたは「c o k e」）、タバコ、トランキライザー、クラック（すなわち、コカイン遊離塩基）、エクスタシーおよび／またはガンマヒドロキシ酪酸（GHB）から選択され得る。または、一部の実施形態では、薬

50

物は、医薬品でもよい。

【0030】

標的種は、候補薬物、例えば、本発明を使用して特定の活性または特性について試験またはスクリーニングされ得る化学的または生物学的成分でもよい。

【0031】

標的種が毒物である場合、毒物は、制限されず、動物、植物または細菌由来の1つ以上の毒物から選択され得る。

【0032】

標的種がウイルス粒子である場合、ウイルス粒子は、制限されず、1つ以上の、ゲノムを含むウイルス粒子およびゲノムを含まないウイルス粒子から選択され得る。 10

【0033】

標的種が細胞である場合、細胞は、制限されず、多能性前駆細胞、ヒトの細胞（例えば、B細胞、T細胞、マスト細胞、食細胞、好中球、好酸球、マクロファージ、内皮細胞）、ガン細胞（例えば、肝臓、頸骨、脾臓、大腸、前立腺、表皮、脳、乳房、肺、精巣、腎臓、膀胱のガンに由来するもの）、非ヒト由来の単細胞生物、藻類、菌類、細菌、植物細胞、虫卵、マラリア原虫およびマイコプラズマの1つ以上から選択され得る。

【0034】

標的種が小器官である場合、小器官は、制限されず、核、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、リソソーム、食胞、細胞内膜、細胞外膜、細胞骨格、核膜、クロマチン、核マトリクスおよびクロロプラストの1つ以上から選択され得る。 20

【0035】

標的種が脂質である場合、脂質は、制限されず、シグナル伝達脂質、構造脂質、リン脂質、糖脂質および脂肪酸の1つ以上から選択され得る。

【0036】

標的種が核酸配列である場合、核酸配列は、制限されず、DNA、cDNA、RNA、rRNA、mRNA、miRNAおよびtRNAの1つ以上から選択され得る。

【0037】

標的種がオリゴ糖である場合、オリゴ糖は、制限されず、ヒト、動物、植物、菌類または細菌由来のオリゴ糖の1つ以上から選択され得る。

【0038】

好みの実施形態では、標的種は、タンパク質である。本発明の方法および他の態様が、タンパク質の検出または特定に使用されてもよい。 30

【0039】

標的種は、特定の疾患を示す任意の抗原または検体でもよい。標的は、例えば、C反応性タンパク質、アンジオテンシンI変換酵素（ペプチジル-ジペプチダーゼA）1；アディポネクチン；前進性グリコシリ化終末産物特異的受容体；アルファ-2-HS-糖タンパク質；アンギオゲニン、リボヌクレアーゼ、RNase Aファミリー，5；アポリポタンパク質A-I；アポリポタンパク質B（例えば、Ag(x)抗原）；アポリポタンパク質E；BCL2-関連Xタンパク質；B細胞CLL/リンパ腫2；補体C3；ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2；CD14，可溶性；CD40，可溶性；cdk5；ペントラキシン関連；カテプシンB；ジペプチジルペプチダーゼIV；表皮成長因子；エンドグリン；Fas；フィブリノゲン；フェリチン；成長ホルモン1；アラニンアミノトランスフェラーゼ；肝細胞成長因子；ハプトグロビン；ヒートショック70kDaタンパク質1B；細胞内接着分子1；インスリン様成長因子1（ソマトメジンC）；インスリン様成長因子1受容体；インスリン様成長因子結合タンパク質1、インスリン様成長因子結合タンパク質2、インスリン様成長因子結合タンパク質3、インターロイキン18、インターロイキン2受容体，アルファ；インターロイキン2受容体，ベータ；インターロイキン6（インターフェロン，ベータ2）；インターロイキン6受容体；インターロイキン6シグナルトランスデューサ（gp130、オンコスタチンM受容体）；インターロイキン8；アクチビンA；レプチン（肥満ホモログ、マウス）；プラスミノーゲンアクチベー 40

タ、組織；プロオピオメラノコルチン（アドレノコルチコトロピン／ベータ-リポトロピン／アルファ-メラノサイト刺激ホルモン／ベータ-メラノサイト刺激ホルモン／ベータ-エンドルフィン）；プロインスリン；レジスチン；セレクチンe（内皮接着分子1）；セレクチンP（顆粒膜タンパク質140kDa, 抗原CD62）；セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードE（ネキシン、プラスミノーゲンアクチベータ阻害剤1型），メンバー1；血清／糖質コルチコイド調節キナーゼ；性ホルモン結合グロブリン；形質転換成長因子、ベータ1（カムラチ-エンゲルマン病）；TIMPメタロペプチダーゼ阻害剤2；腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1B；血管細胞接着分子1（VCAM-1）；血管内皮成長因子；因子II、因子V、因子VIIa、因子IX、因子XI、因子XII、F / フィブリノゲン、プラスミノーゲン、プロトロンビンおよびフォン・ヴィルブランド因子等から選択され得る。糖尿病に有用なマーカーは、例えば、C反応性タンパク質；グルコース；インスリン；TRIG；GPT；HSPA1B；IGFBP2；LEP；ADIPOQ；CCL2；ENG；HP；IL2RA；SCp；SHBG；およびTIMP2を含む。

【0040】

標的種は、糖尿病をモニターするのに関連する標的でもよい。実施形態では、標的は、グルコース、インスリン、インターロイキン2受容体アルファ(IL-2RA)、C反応性タンパク質(CRP)および糖化ヘモグロビン(HbA1c)から選択され得る。標のがグルコースである場合、プローブ部分は、例えば、GDH-FADアッセイの分子認識素子またはグルコース／ガラクトース結合タンパク質(「GGBP」)から選択され得る(Scholle, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 247-253 (1987))。標のがIL-2RAである場合、プローブ部分は、IL-2RAに特異的なモノクローナル抗体を含んでもよいし、または、同抗体からなってもよい。標的種がC反応性タンパク質であるか、または、C反応性タンパク質を含む場合、好ましくは、これは、ヒトのC反応性タンパク質である。

【0041】

上記のように、好ましくは、プローブ分子は、抗体、核酸およびペプチドの1つ以上から選択される結合種を含む。結合種は、電極の表面に直接付着されてもよいし、または、リンカー種を介して電極の表面に付着されてもよい。リンカー種が電極の表面上に存在する場合、好ましくは、リンカー種は、自己組織化単分子膜を形成する。

【0042】

本願明細書に記載の電極は、リンカー種の自己組織化単分子膜を形成し、場合により、リンカー種を活性化し、ついで、少なくとも一部のリンカー種に対する結合種に結合することにより形成されてもよい。

【0043】

好ましくは、その上のプローブ分子を有する電極表面は、全体として、標的種に選択的である。その上にプローブ分子を有する電極表面が標的種に選択的である場合、このことは、実質的に標的種のみ、または、標的種のみが、表面に結合する(プローブ分子に結合する)であろうことを示す。(例えば、標的種と共にキャリア媒体に存在する)他の種は、結合しないか、または、顕著な度合いで、電極表面の他の部分もしくはその上の他の種に結合しないであろうことを示す。例えば、電極表面は、リンカー分子の自己組織化単分子膜を含んでもよく、その一部は、プローブ部分、例えば、抗体に結合される。プローブ部分は、標的(例えば、C反応性タンパク質)に選択的に結合する。液体状のキャリア媒体、例えば、血液において、電極表面が、好ましくは、標的種のみに結合する場合、液体状のキャリア媒体に存在する他の種には結合しない。このような選択的な電極表面は、高い選択性の電極表面と呼ばれ得る。

【0044】

実施形態では、プローブ分子は、式A-L-Bのものであり、Aは、電極の表面に結合する部分であり、Lは、リンカー部分であり、Bは、標的種、例えば、C反応性タンパク質に結合する部分である。

10

20

30

40

50

【0045】

「A」は、電極材料の性質に応じて、適切な結合基から選択され得る。Aは、制限されず、ビオチン、ヒドラジン、アルキニル、アルキルアジド、アミノ、ヒドロキシリ、カルボキシ、チオ、アルデヒド、ホスホイノチオエステル、マレイミジル、スクシニル、スクシンイミジル、イソシアネート、エステル、ストレプトアビジン、アビジン、ニューアビジン(neuavidin)およびビオチン結合タンパク質から選択され得る。電極が貴金属、例えば、金、銀またはプラチナを含む場合、Aは、好ましくは、チオであり、チオは、-SHおよび-S-から選択され得る。電極がその表面上に酸化物の層を有する金属、例えば、銅を含む場合、Aは、カルボキシ基でもよい。

【0046】

Lは、AとBとを共有結合させる任意の種であり得る。Lは、好ましくは、自己組織化単分子膜を形成可能な種である。Lは、少なくとも2つの炭素を含むアルキレン部分を含み得る。アルキレン部分は、Aに直接付着される。場合により、アルキレン部分は、直鎖状のアルキレン部分である。Lは、少なくとも10個の炭素、場合により10から30個の炭素、場合により10から20個の炭素、場合により11から15個の炭素原子を含むアルキレン部分を含んでもよい。アルキレン部分は、場合により、直鎖状のアルキレン部分であり、アルキレン部分は、Aに直接付着される。

【0047】

実施形態では、Lは、式-(CH₂)_n-(-O-CH₂-CH₂-)_m-D-のものであり、式中、nは、1から30であり、mは、0から10であり、Dは、Bに結合する基である。Dは、単結合、-(C=O)-、-OCH₂-、(C=O)-、-(C=O)-NH-、-(C=O)-O-、-OCH₂-、(C=O)-NH-、-OCH₂-、(C=O)-OH-、-O-、-NH-から選択され得る。nは、10から20であり得る。mは、1から5、場合により2から4、場合により3であり得る。場合により、Dが、-(C=O)-NH-、-(C=O)-O-、-OCH₂-、(C=O)-NH-、-OCH₂-、(C=O)-O-、-O-および-NH-の種のいずれか1つである場合、これらの種における-NH-または-O-は、リンクー種Lに結合される前のプローブ分子、例えば、抗体に由来し得る。

【0048】

Bは、上記のように、例えば、抗体、抗体フラグメント、アブタマー、オリゴ糖、ペプチド、タンパク質から選択される結合種から選択され得る。標的種、例えば、C反応性タンパク質に選択的に結合するこのような種は、例えば、ヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体が市販されている。抗体は、AbD Serotecから入手できる。

【0049】

実施形態では、A-L-は、式チオ-(CH₂)_n-(-O-CH₂-CH₂-)_m-D-の種であり、式中、nは、1から30であり、mは、0から10であり、Dは、Bに結合する基である。場合により、n、mおよびDは、上記規定の通りであり得る。チオは、-S-およびHS-から選択される。

【0050】

実施形態では、A-L-は、式チオ-(CH₂)_n-(-O-CH₂-CH₂-)_m-D-の種であり、式中、nは、1から30であり、mは、0から10であり、Dは、Bに結合する基である。場合により、n、mおよびDは、上記規定の通りであり得る。チオは、-S-およびHS-から選択される。

【0051】

実施形態では、A-L-は、式チオ-(CH₂)_n-(-O-CH₂-CH₂-)_m-D-の種であり、式中、nは、1から30であり、mは、0から10であり、Dは、Bに結合する基である。場合により、n、mおよびDは、上記規定の通りであり得る。チオは、-S-およびHS-から選択される。

【0052】

Bは、好ましくは、標的種、例えば、C反応性タンパク質に選択的に結合可能である。

10

20

30

40

50

Bは、好ましくは、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、オリゴ糖、ペプチド、タンパク質から選択される結合種を含むか、または、同結合種である。Bは、好ましくは、抗体、抗体フラグメント、核酸およびペプチドの1つ以上から選択される結合種を含むか、または、同結合種である。好ましくは、プローブ部分は、C反応性タンパク質に選択的に結合する。

【0053】

Bが抗体または抗体フラグメントを含むか、または、抗体または抗体フラグメントである場合、抗体または抗体フラグメントは、クラスIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの1つ以上から選択され得る。抗体または抗体フラグメントは、好ましくは、C反応性タンパク質に選択的に結合する。

10

【0054】

Bがアプタマーを含むか、または、アプタマーである場合、アプタマーは、ペプチドアプタマー、DNAアプタマーおよびRNAアプタマーから選択され得る。

【0055】

実施形態では、例えば、その上にプローブ分子を有する本願明細書に記載の電極は、平面を有する電極を提供し、ついで、平面上にリンカー種の自己組織化単分子膜を形成し、少なくとも一部のリンカー種に対する標的種に結合するプローブ部分、例えば、抗体を付着させることにより製造され得る。リンカー種は、場合により、リンカー種に対するプローブ部分の容易な付着を可能にするために、例えば、活性剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)との反応により、活性化されてもよい。実施形態では、自己組織化単分子膜を形成するリンカー種は、式A-L-のものであり、式中、Aは、電極の表面に結合する部分であり、Lは、標的種、例えば、抗体に結合する部分(Bと示されてもよい。)に結合可能なリンカー部分である。実施形態では、Aは、上記規定の通りであり得る。プローブ部分に結合する前に単分子膜を形成するリンカー種Lは、式-(CH₂)_n-(-O-CH₂-CH₂-)_m-D-のものであり、式中、nは、1から30であり、mは、0から10であり、Dは、Bに結合する基である。Dは、単結合、-(C=O)-H、-(C=O)OH、-OCH₂-(C=O)H、-OCH₂-(C=O)OH、-(C=O)-NH₂、-OCH₂-(C=O)-NH₂、-OCH₂-(C=O)-OH、-OH、-NH₂から選択され得る。

20

【0056】

本願は、電気化学的インピーダンス分光技術において標的種(例えば、制限されず、C反応性タンパク質)を検出するための方法であって、第1の態様に規定の電極を、標的種(例えば、制限されず、C反応性タンパク質)を含むキャリア媒体と接触させる工程と、作用電極において電気信号を検出する工程とを含む方法にも関連する。

30

【0057】

電気化学的インピーダンス分光法(EIS)は、当業者に公知である。一般的には、可変のa.c.電位が、作用電極と対電極との間のバイアス(またはDC)電位に印加される。一般的には、EISは、a.c.周波数の範囲にわたるスキャンを含む。出力信号(典型的には、可変電流)に対する入力信号(典型的には可変電位)の比により、インピーダンスの算出が可能となる。一般的には、インピーダンスが複素関数として見なされ得るように、入力信号と出力信号との間の位相差が存在する。複素関数は、実数部(Z'とも呼ばれる)と、虚数部(Z''とも呼ばれる)とを有する。インピーダンスの実数部および虚数部は、例えば、図1に図示されるように、Nyquistプロットの形式で、互いにプロットされ得る。インピーダンスデータを仮想の等価回路に適合させることにより、電子移動抵抗が決定され得る。本願において、上記のように、理想Random等価回路が、電子移動抵抗を決定するのに使用され得る。印加された可変a.c.電位の周波数範囲は、0.05Hzから10kHzであり得る。印加されたa.c.電位の振幅は、典型的には、正弦波の形状であり、1mVから100mV、場合により5mVから50mV、場合により5mVから20mV、場合により5mVから15mV、場合により8mVから12mV、場合により約10mVであり得る。バイアス電位(または直流電位)は、任意の所望の電位に

40

50

設定され得る。酸化還元プローブがキャリア媒体に存在する場合、バイアス電位は、方法が行われる条件下における酸化還元プローブの電極電位に設定され得る。

【0058】

酸化還元プローブは、キャリア媒体に存在し得る。酸化還元プローブは、遷移金属種でもよく、遷移金属は、2つの価数状態をとり得る（例えば、金属イオン（M）は、M（I I）およびM（I I I）の状態をとり得る。）。実施形態では、酸化還元プローブは、金属イオンを含む。この場合、金属イオンの金属は、鉄、ルテニウム、イリジウム、オスミウム、コバルト、タンクステンおよびモリブデンから選択される。実施形態では、酸化還元プローブは、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ 、 $\text{Fe}(\text{NH}_3)_6^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Fe}(\text{bipy})_2^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Fe}(\text{bipy})_3^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Ru}^{3+ / 2+}$ 、 $\text{RuO}_4^{3- / 2-}$ 、 $\text{Ru}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Ru}(\text{en})_3^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{Py})^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Ir}^{4+ / 3+}$ 、 $\text{Ir}(\text{Cl})_6^{2- / 3-}$ 、 $\text{Ir}(\text{Br})_6^{2- / 3-}$ 、 $\text{Os}(\text{bipy})_2^{3+ / 2+}$ 、 $\text{Os}(\text{bipy})_3^{3+ / 2+}$ 、 $\text{OxCl}_6^{2- / 3-}$ 、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+ / 2+}$ 、 $\text{W}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ 、 $\text{Mo}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ 、場合により置換されたフェロセン、ポリフェロセン、キノン、例えば、p-ベンゾキノンおよびヒドロキノンならびにフェノールから選択される。実施形態では、酸化還元プローブは、鉄含有種であり、鉄は、 $\text{Fe}(\text{I I})$ および/または $\text{Fe}(\text{I I I})$ の状態にある。実施形態では、酸化還元プローブは、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ である。酸化還元プローブは、0.1 mMから100 mM、場合により0.5 mMから10 mM、場合により0.5 mMから2 mM、場合により0.5 mMから1.5 mM、場合により約1 mMの量で、キャリア媒体に存在し得る。
10
20

【0059】

キャリア媒体は、好ましくは、液体状である。キャリア液体は、標的種（例えば、制限されず、C反応性タンパク質）が懸濁または溶解され得る、任意の液体であり得る。実施形態では、キャリア液体は、水を含む。実施形態では、キャリア液体は、体液を含む。体液は、対象から取得された流体であり得る。対象は、ヒトまたは動物であり得る。実施形態では、キャリア液体は、未希釈の体液を含む。本文脈における未希釈の体液は、対象、例えば、ヒトまたは動物から取得された体液であり、別の液体により希釈されていないが、酸化還元プローブ等の添加剤が、未希釈の体液に存在してもよい。体液は、血液、尿、涙、唾液、汗および髄液から選択され得る。
30

【0060】

場合により、キャリア媒体は、対象、例えば、ヒトまたは動物から取得された体液と希釈剤とを含む。希釈剤は、体液が対象から取得された後に、体液に添加されてもよい。希釈剤は、液体媒体、例えば、水およびアルコール、例えば、アルカノール、例えば、エタノールから選択される液体媒体を含み得る。キャリア媒体は、さらに、バッファーを含み得る。バッファーは、リン酸塩を含み得る。

【0061】

方法は、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度を、電気信号から算出する工程を含んでもよい。電気信号は、インピーダンスデータに変換され、ついで、電気信号から、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度に変換され得る。電気信号は、電荷移動抵抗に変換され、ついで、電気信号から、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度に変換され得る。方法は、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度を取得するために、例えば、電気信号から、電気化学的インピーダンス分光法技術において取得されたデータ、インピーダンスデータまたは電荷移動抵抗データを比較する工程、および、そのデータと、較正工程において取得されたデータとを比較する工程を含んでもよい。方法は、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度と電気化学的インピーダンス分光技術における電気化学信号から取得された電気化学データとの間の相関関係を決定する初期較正工程を含んでもよい。電気化学データは、インピーダンスデータおよび電荷移動抵抗データから選択され得る。相関関係は、電気化学的インピーダンス分光技術において、対象のサ
40
50

ンブルから取得された電気化学データを、サンプルにおける標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度に変換するのに使用され得る。

【0062】

キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、0.1nM以上、場合により0.16nM以上、場合により0.2nM以上、場合により0.5nM以上であり得る。キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、100nM以下、場合により80nM以下、場合により50nM以下、場合により10nM以下であり得る。キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、0.1nMから100nM、場合により0.16nMから100nM、場合により、0.16nMから50nMであり得る。

10

【0063】

キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、10μg/L以上、場合により15μg/L以上、場合により19μg/L以上、場合により20μg/L以上、場合により0.1mg/L以上、場合により1mg/L以上、場合により3mg/L以上であり得る。キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、100mg/L以下、場合により80mg/L以下、場合により50mg/L以下、場合により30mg/L以下であり得る。キャリア媒体中の標的種（例えば、C反応性タンパク質）の濃度は、10μg/Lから100mg/L、場合により19μg/Lから100mg/L、場合により19μg/Lから50mg/Lであり得る。

20

【0064】

算出工程は、電気信号と理想等価回路の電気信号との1つ以上の比較を含んでもよい。

【0065】

本発明者らは、電極から結合した標的種（例えば、C反応性タンパク質）を解離させることにより、標的種（例えば、C反応性タンパク質）に結合していた電極を再生させ得ることを見出した。方法は、標的種（例えば、C反応性タンパク質）がプローブ分子に結合されるように、電極を標的種（例えば、C反応性タンパク質）と接触させ、電気信号を検出した後に、標的種（例えば、C反応性タンパク質）をプローブ分子から解離させる工程を含み得る。解離工程は、その上に標的種（例えば、C反応性タンパク質）を有する電極表面を、場合により、8以上のpH、場合により9以上のpH、場合により10以上のpH、場合により11以上のpH、場合により8から12のpH、場合により9から12のpHを有する、アルカリの液体媒体、例えば、アルカリ水溶液媒体と接触させる工程を含んでもよい。アルカリの液体媒体は、塩基性物質を含み得る。塩基性物質は、好ましくは、水に可溶性である。塩基性物質は、制限されず、金属水酸化物、金属炭酸塩、アンモニアから選択され得る。金属水酸化物または金属炭酸塩の金属は、周期表のグループ1およびグループ2から選択され得る。

30

【0066】

本発明は、電気化学的インピーダンス分光計であって、分光計が、本願明細書に記載の電極を含む分光計にも関連する。電気化学的インピーダンス分光計は、標準的な設計のものであり得る。電気化学的インピーダンス分光計は、作用電極、対電極および、必要に応じて参照電極として、第1の態様の電極を含んでもよい。電気化学的インピーダンス分光計は、好ましくは、作用電極と対電極との間における電位を印加し、制御し、変動させるための手段、および、得られた電流を測定するための手段を含む。電気化学的インピーダンス分光計は、好ましくは、電位の制御および得られた電流の測定用のポテンシオスタットを含む。電気化学的インピーダンス分光計は、好ましくは、印加電位および得られた電流から、インピーダンスデータを算出するための手段を含む。電気化学的インピーダンス分光計は、作用電極の電子移動抵抗を算出するための手段を含んでもよい。

40

【0067】

本発明は、標的種、例えば、C反応性タンパク質を検出するための、本願明細書に記載の電極または本願明細書に記載の電気化学的インピーダンス分光計の使用にも関連する。使用は、標的種（例えば、C反応性タンパク質）の存在の検出、および／または、標的種

50

(例えば、C反応性タンパク質)の濃度の検出を含んでもよい。

【実施例】

【0068】

以下の実施例において、ヒトCRP、ヒト血清およびウシ血清アルブミン(BSA)を、Sigma Aldrich から購入した。ヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体を、AbD Serotec から購入した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を、Sigma Aldrich から購入した。ポリエチレングリコール(PEG)チオール HS-C₁₁- (E G)₃-OCH₂-COOH を、Prochimia Surfaces Poland から購入した。超純水(18.2M / cm)を、Milli-Qシステムから取得し、全体を通して使用した。Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(PBST 、 10mM 、 pH 7.4)を、PBSタブレット(Sigma Aldrich)を、0.2% v/v の Tween-20 を添加した水に溶解することにより調製し、0.22μm のメンブレンフィルタを使用してろ過した。全ての他の化学薬品を、分析グレードとした。

【0069】

2.2. 装置

電気化学的実験を、FRA2モジュールを備えるAutolabボテンシオスタット12(Metrohm Autolab B.V.)により行った。金のディスク作用電極(直径 1.6mm 、 BASi)、プラチナワイヤの対電極および銀/塩化銀(Ag / AgCl)の参照電極を備える従来の三電極系(CH Instruments)を使用した。全ての電位を、この参照電極に対して報告する。CRPストック溶液濃度を、Shimadzu UV分光計(Shimadzu Scientific Instruments)を使用して、280nmでのUV吸光により算出した(Motie et al. 1996)。

【0070】

2.3. 表面調製

金電極を、まず、3.0、1.0 および 0.1 μm のダイヤモンドスプレー(Kemet International Ltd)で、連続して研磨し、新鮮に調製したピラニア溶液(濃 H₂SO₄ : H₂O₂ 、 v/v 3 : 1 。注記：これは、非常に注意して取り扱わなければならない！) に 15 分間浸漬する前に、約 5 分間水において超音波洗浄した。ついで、-0.1 と 1.25Vとの間での電位サイクリング(CV)により、安定した還元ピークが得られるまで、電極を電解研磨した。金電極の有効表面積を、クーロンのカソードピークの面積を取得し、

【0071】

【数2】

$$A = \frac{Q}{482 \mu C \text{cm}^{-2}}$$

【0072】

の相関関係を適用することにより、この時点で算出し得る(Hoogvliet et al. 2000)。報告した電荷移動抵抗(R_{ct})を、これにより正規化した。

【0073】

(1) Hoogvliet, J. C ; Dijkksma, M. ; Kamp, B. ; van Bennekom, W. P. Anal Chem 2000, 72, 2016

ついで、予め処理した金電極を、窒素ガス流中で乾燥させ、直ちに、エタノールにおける 10 mM HS-C₁₁H₂₂- (E G)₃-OCH₂-COOH の溶液に、室温で 16 時間浸漬した。このようなフィルムの生体適合性(Cho et al. 2011 、 Klapshina et al. 2010)および防汚特性(Harder et al. 1998 、 Schilp et al. 2009)は、複雑な体液においてなされる特異的な評価を可能にするのに十分である。SAM形成後、金の表面を、特に断らない限り

10

20

30

40

50

、エタノール、ついで、水で洗浄し、0.4M EDCおよび0.1M NHSを含む溶液での15分間のインキュベーション（末端カルボキシル基活性化）、およびそれに次ぐ、10μM CRP抗体溶液（PBS T、pH 7.4）での1時間のインキュベーション（図7）前に、窒素ガス流中で乾燥させた。

【0074】

2.4.電気化学的インピーダンス分光法

EISスペクトルを、0.05Hzから10kHzの周波数範囲にわたって記録した。印加した正弦波電位の振幅を、0.25Vでの直流電位設定による10mVとした（E₀の酸化還元プローブを使用、1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻）。10mM PBS T溶液において、データを取得し、複素平面ダイアグラムの形式でプロットし（Nyquistプロット）、図8に図示した、理想Randles等価回路（Vyas et al. 2010）に適合させた。この図において、R_{c t}は、電荷（または電子）移動抵抗を表わし、Z_wは、Warburgインピーダンスを表わし、R_sは、溶液抵抗であり、C_{d 1}は、電極表面と、液体状のキャリア媒体における標的種またはイオンとの間のキャパシタンスである。生のインピーダンスデータを、（この場合、Autolab、The Netherlandsにより製造された）FRA（周波数分解分析機）モジュールにより取得し、ついで、搭載されたソフトウェア（「Fit and Simulation version 1.7」）を使用して、図8における等価回路に適合させる。ソフトウェアは、エラーを減少させるためにフィッティングの反復を複数回実行し、ついで、R_{c t}を含む全ての等価回路成分についての値を出力する。

10

20

30

40

50

【0075】

CRP添加PBS T、特定の希釈血清または全血清において電極を、それぞれ室温で30分間インキュベートすることにより、アッセイを行った。最初の2つの場合において、PBS Tを、酸化還元プローブにより予めドープした。EIS反応を、全（未希釈）血清試験を除いて、同じインキュベーション溶液において標準的に記録した。この場合、電極を、インキュベート後、1.0mM Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻を含むPBS T中の評価前に、PBS Tで洗浄した。界面選択性を最初に評価するために、BSAを使用した。使用した表面を、PBS T洗浄前に、6mM NaOHおよび0.6%エタノールを使用して、5分間再生させた（Albrecht et al. 2008）。

【0076】

3.結果および検討

3.1.バイオセンサ製作および初期インピーダンス

EISは、受容性の表面の段階的な製作を特徴付ける有用な手段を提供する。Nyquistプロットにおいて、低いサンプリング周波数での半円形は、被膜が構築されたために立体的にまたは静電的に課された電荷移動制限において報告される。予想通りに、受容体層が製作された場合、R_{c t}の急激な上昇が存在する。R_{c t}は、PEG SAMの形成およびさらにその上への抗体の固定化後に、4.5k / cm²未満～45M / cm²に特異的に上昇する（図1）。その後、界面の抵抗は、標的タンパク質結合に対して較正可能な方法で応答する。

【0077】

本発明者らは、電極の初期抵抗、すなわち、CRPの結合前の抵抗が、続いて観察される感度において役割を果たすことを見出した。この初期抵抗は、抗体表面密度により直接調節可能である。これ自体は、層が構築される場合、インキュベート時間またはインキュベート濃度のいずれかにより制御可能である。図2は、初期の層電荷移動抵抗によるアッセイ感度において観察された傾向を概説する。特に、抗体表面被覆が減少した場合（固定時間を70分から10分に減少させた場合）、アッセイ感度は、表面結合の密度としておそらく低下する前に、最初に400%まで振幅が向上し（この結果、検出限度が下がり）、機能性抗体が、特異的な標的結合が（可能性に関して）有効である点以下に低下する。これらの観察は、複数回の分析にわたって確かであり、再現性を有している。

【0078】

3.2. バッファー中の C R P の検出

調製された界面を、続けて、P B S T 中の C R P をスクリーニングするのに使用した。濃度による R_{CT} の進行的な向上、ついで、飽和(図3)から、 $1.1 \pm 0.11 \text{ nM}$ の解離定数 K_D 導くことができ、同じポリクローナル抗体による以前の示差パルスボルタンメトリー測定(Hennesssey et al. 2009)と優れた一致における値である。

【0079】

飽和前に、 R_{CT} は、 $176 \pm 18 \text{ pM}$ の検出限界(LOD)を伴って、 $0.5 - 50 \text{ nM}$ の範囲($60 \mu\text{g/L}$ から 6.0 mg/L に相当)にわたる C R P 濃度における直線的な対数感度について報告する。この低い検出限界(~ $19 \mu\text{g/L}$ に相当)は、実用化に適切に十分な感度を確証し、臨床的に適切なそれを包含する分析範囲に結び付けられる。その関連した検出限界を伴うこの範囲は、我々の知る限り、いずれの従来報告された C R P アッセイの臨床的適切性を上回る。調製された界面は、さらに、 100 nM までの B S A レベルに対して非反応性(< 3% の信号変化)である。

10

【0080】

3.3. 血清中の C R P 検出

診察現場の観点から、血清中の C R P の直接的および容易な評価が必要である。しかしながら、任意の無標識アッセイでは、このことは、極めて厳しい要求である。数多くの電流測定またはサンドイッチ系 E I S 免疫アッセイ法が説明されてきたが(Balkeenhohl and Lisdat 2007a, b, Pan et al. 2010, Rosales-Rivera et al. 2011, Tran et al. 2011)、我々の知る限り、未希釈の複雑な生物媒体に有効であると報告されている、非増幅および非標識のインピーダンスアッセイの従来の報告は存在しない。

20

【0081】

制御度合いについて確信したことにより、我々は、我々の電極界面を終了し、高レベルの B S A に対しても低レベルで応答する観点から、ここで、我々は、2つの方法において、血清中の C R P についてスクリーニングした。最初の例では、in situ 評価を、P B S T における制御可能な希釈において、C R P 添加血清により行った(図4)。このような環境下において、信頼できる線形評価が、 $10\% \text{ v/v}$ までの血清濃度において、 $262 \pm 28 \text{ pM}$ の LOD を伴って、臨床的に適切な範囲にわたって可能であった。

30

【0082】

後者の分析を、C R P 添加未希釈血清により行った。抵抗最適化センサ電極を、これらの溶液において、15分間インキュベートし、ついで、P B S T による洗浄後に測定した。図5に証明されるように、このような分析におけるセンサ応答は、添加した P B S T において観察されたそれにかなり近い(最も臨床的に適切なより高い濃度範囲である $10 - 50 \text{ nM}$ において、その差は、< 3% である。)。これは、心血管疾患の有用なリスク評価に必要とされる C R P 濃度範囲にわたる、全血清において行われる分析を可能にする。実務上の観点から、これらのアッセイは、わずか $5 \mu\text{L}$ の未希釈の血清で行われ、10分以内に定量的に報告し得る。使用される電極界面も、続けて、再利用可能である(以下を参照のこと。)。

40

【0083】

3.4. バイオセンサの再生

(C R P の抗体 - 抗原複合体を解離するために、) 6 mM NaOH および 0.6% エタノールに5分間、使用した表面を浸漬し、ついで、P B S T で洗浄することにより、表面再生を、高い忠実性で達成した(図6を参照のこと。)。我々は、確かな再生が部分的に可能であると考える。このような免疫アッセイ表面に一般的に使用される B S A 表面不活性化が存在しないためである。本願明細書における界面は、アッセイの著しい不利益を伴わずに再使用され得る(7回の再生にわたって、最初の界面応答の 97% を保持した。)。この再生は、P B S 、希釈血清または全血清において行われるアッセイに有効である。

50

【0084】

本発明者らは、希釈血清または全血清において、臨床的に適切な範囲にわたって、CRPの信頼できる検出が可能な、最適化された、再使用可能な電気化学的未標識バイオセンサを見出した。in situで測定されたポリクローナル抗体の結合親和性は、比較界面での以前の測定を上回るのに非常に十分マップする。高いアッセイ感度および選択性を容易にすることに加えて、調製されたバイオセンサ界面は、十分な再使用性も示した。抗体表面密度による初期の界面抵抗の最適化において、アッセイ感度は、顕著に向上され得る。

【0085】

これらのアッセイは、携帯型で、ほんの数 μ L の体液を、数分以内にサンプリング可能な複合方式に、容易に一体化される。我々は、提供された結果が、感染、傷害、炎症および心臓病のリスクの高感度なプローブと長い間見なされたマーカー（すなわち、CRP）の、便利な診察現場での分析の開発についての重要な基礎としての役割を果たすと考える。

【0086】

(引用文献)

Albrecht C, Kaeppele N, Gauglitz G. 2008. Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391: 1845-1852.

Balkenhohl T, Lisdat F. 2007a. Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. Analytica Chimica Acta 597: 50-57.

Balkenhohl T, Lisdat F. 2007b. An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadin. Analyst 132: 314-322.

Bogomolova A, Komarova E, Reber K, Gerasimov T, Yavuz O, Bhatt S, Aldissi M. 2009. Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing. Analytical Chemistry 81: 3944-3949.

Buch M, Rishpon J. 2008. An Electrochemical Immunosensor for C-Reactive Protein Based on Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Electrodes. Electroanalysis 20: 2592-2594.

Centi S, Sanmartin LB, Tombelli S, Palchetti I, Mascini M. 2009. Detection of C Reactive Protein (CRP) in Serum by an Electrochemical Aptamer-Based Sandwich Assay. Electroanalysis 21: 1309-1315.

Chen XJ, Wang YY, Zhou JJ, Yan W, Li XH, Zhu JJ. 2008. Electrochemical impedance immunosensor based on three-dimensional ordered macroporous gold film. Analytical Chemistry 80: 2133-2140.

10

20

30

40

50

- Cho HY, et al. 2011. Synthesis of Biocompatible PEG-Based Star Polymers with Cationic and Degradable Core for siRNA Delivery. *Biomacromolecules* 12: 3478 - 3486.
- Gabay C, Kushner I. 1999. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* 340: 448 - 454.
- Harder P, Grunze M, Dahint R, Whitesides GM, Laibinis PE. 1998. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B* 102: 426 - 436.
- Hennessey H, Afara N, Omanovic S, Padjen AL. 2009. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. *Analytica Chimica Acta* 643: 45 - 53.
- Hoogvliet JC, Dijksma M, Kamp B, van Benekom WP. 2000. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4. *Analytical Chemistry* 72: 2016 - 2021.
- Hu WP, Hsu HY, Chiou A, Tseng KY, Lin HY, Chang GL, Chen SJ. 2006. Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosensors & Bioelectronics* 21: 1631 - 1637.
- Kim N, Kim DK, Cho YJ. 2009. Development of indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for C-reactive protein. *Sensors and Actuators B-Chemical* 143: 444 - 448.
- Klapshina LG, Douglas WE, Grigoryev IS, Ladilina EY, Shirmanova MV, Mysyagin SA, Balalaeva IV, Zagaynova EV. 2010. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrazine complex for biophotonic applications. *Chemical Communications* 46: 8398 - 8400.
- Kushner I, Sehgal AR. 2002. Is high-sensitivity C-reactive protein an effective

10

20

30

40

50

screening test for cardiovascular risk? Archives of Internal Medicine 162: 867-869.

Lee WB, Chen YH, Lin HI, Shieh SC, Lee GB. 2011. An integrated microfluidic system for fast, automatic detection of C-reactive protein. Sensors and Actuators B-Chemical 157: 710-721.

May A, Wang TJ. 2007. Evaluating the role of biomarkers for cardiovascular risk prediction: focus on CRP, BNP and urinary microalbumin. Expert Review of Molecular Diagnostics 7: 793-804.

Meyer MHF, Hartmann M, Keusgen M. 2006. SPR-based immunosensor for the CRP detection - A new method to detect a well known protein. Biosensors & Bioelectronics 21: 1987-1990.

Miller VM, Redfield MM, McConnell JP. 2007. Use of BNP and CRP as biomarkers in assessing cardiovascular disease: Diagnosis versus risk. Current Vascular Pharmacology 5: 15-25.

Motie M, Brockmeier S, Potempa LA. 1996. Binding of model soluble immune complexes to modified C-reactive protein. Journal of Immunology 156: 4435-4441.

Mygind ND, Harutyunyan MJ, Mathiassen AB, Ripa RS, Thune JJ, Gotze JP, Johansen JS, Kastrup J, Grp CT. 2011. The influence of statin treatment on the inflammatory biomarkers YKL-40 and HsCRP in patients with stable coronary artery disease. Inflammation Research 60: 281-287.

Pai JK, Mukamal KJ, Rexrode KM, Rimm EB. 2008. C-Reactive Protein (CRP) Gene Polymorphisms, CRP Levels, and Risk of Incident Coronary Heart Disease in Two Nested Case-Control Studies. Plos One 3.

Pan Y, Sonn GA, Sin MLY, Mach KE, Shih MC, Gau V, Wong PK, Liao JC. 2010. Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis. Biosensors & Bioelectronics 26: 649-654.

Pearson TA, Mensah GA, Hong YL, Smith SC. 2004. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease - Application to Clinical and Public Health Practice - Overview. Circulation 110:

10

20

30

40

50

E 5 4 3 - E 5 4 4 .

- Qureshi A, Gurbuz Y, Kallempudi S, Niazzi JH. 2010. Label-free RNA aptamer-based capacitive biosensor for the detection of C-reactive protein. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12: 9176-9182.
- Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. 2000. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: Implications for clinical and epidemiological applications. *Clinical Chemistry* 46: 461-468. 10
- Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J, Rifai N. 2001. Evaluation of nine automated high-sensitivity c-reactive protein methods: Implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clinical Chemistry* 47: 418-425.
- Rodriguez MC, Kawde AN, Wang J. 2005. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. *Chemical Communications*: 4267-4269. 20
- Rosales-Rivera LC, Acero-Sanchez JL, Lozano-Sanchez P, Katakis I, O'Sullivan CK. 2011. Electrochemical immunosensor detection of antigliadin antibodies from real human serum. *Biosensors & Bioelectronics* 26: 4471-4476. 30
- Schilp S, Rosenhahn A, Pettitt ME, Bowen J, Callow ME, Callow JA, Grunze M. 2009. Physicochemical Properties of (Ethylene Glycol)-Containing Self-Assembled Monolayers Relevant for Protein and Algal Cell Resistance. *Langmuir* 25: 10077-10082.
- Tran DT, Vermeeren V, Grieten L, Wenmackers S, Wagner P, Pollet J, Janssen KPP, Michiels L, Lammertyn J. 2011. Nanocrystalline diamond impedimetric aptasensor for the label-free detection of human IgE. *Biosensors & Bioelectronics* 26: 2987-2993. 40
- Vermeeren V, Grieten L, Vanden Bon N, Bijnens N, Wenmackers S, Janssens SD, Haenen K, Wagner P, Michiels L. 2011. Impedimetric, diamond-based immunosensor for the detection of C-reactive protein. *Sensors and Actuators B-Chemical* 157: 130-150

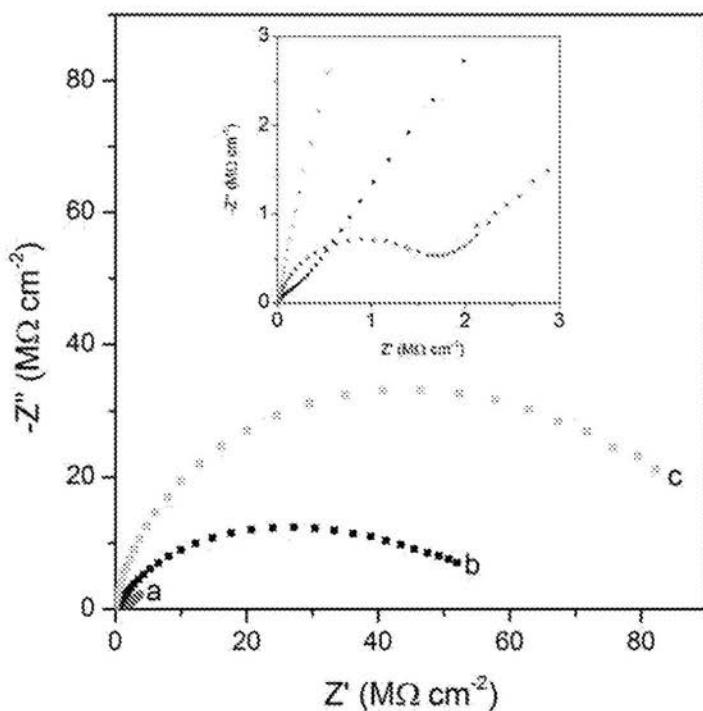
38.

Vikhholm-Lundin I, Albers WM. 2006. Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein. Biosensors & Bioelectronics 21: 1141-1148.

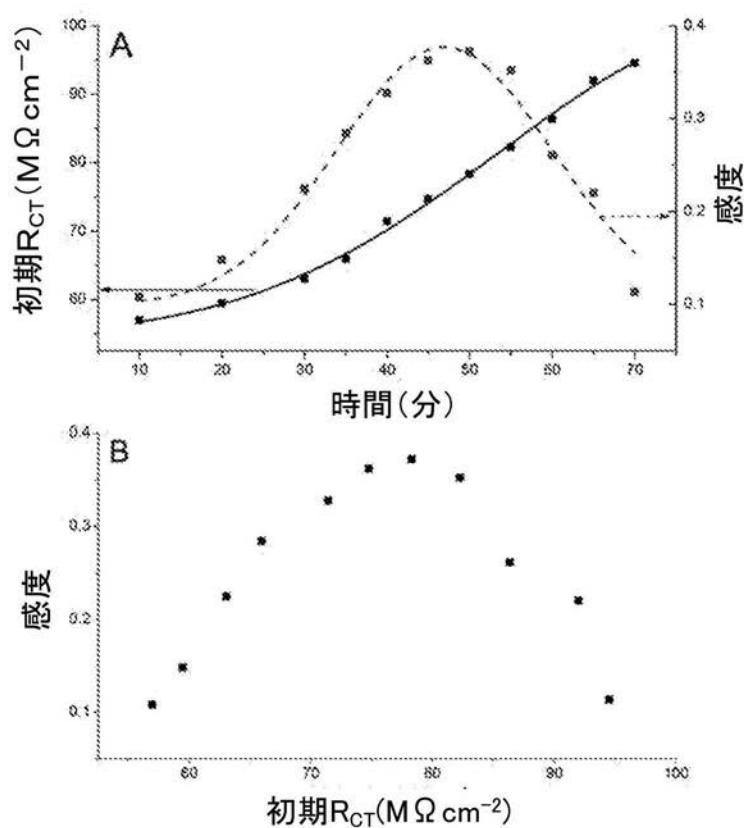
Vyas RN, Li KY, Wang B. 2010. Modifying Randles Circuit for Analysis of Polyoxometalate Layer-by-Layer Films. Journal of Physical Chemistry B 114: 15818-15824.

Wee KW, Kang GY, Park J, Kang JY, Yoon DS, Park JH, Kim TS. 2005. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. Biosensors & Bioelectronics 20: 1932-1938.

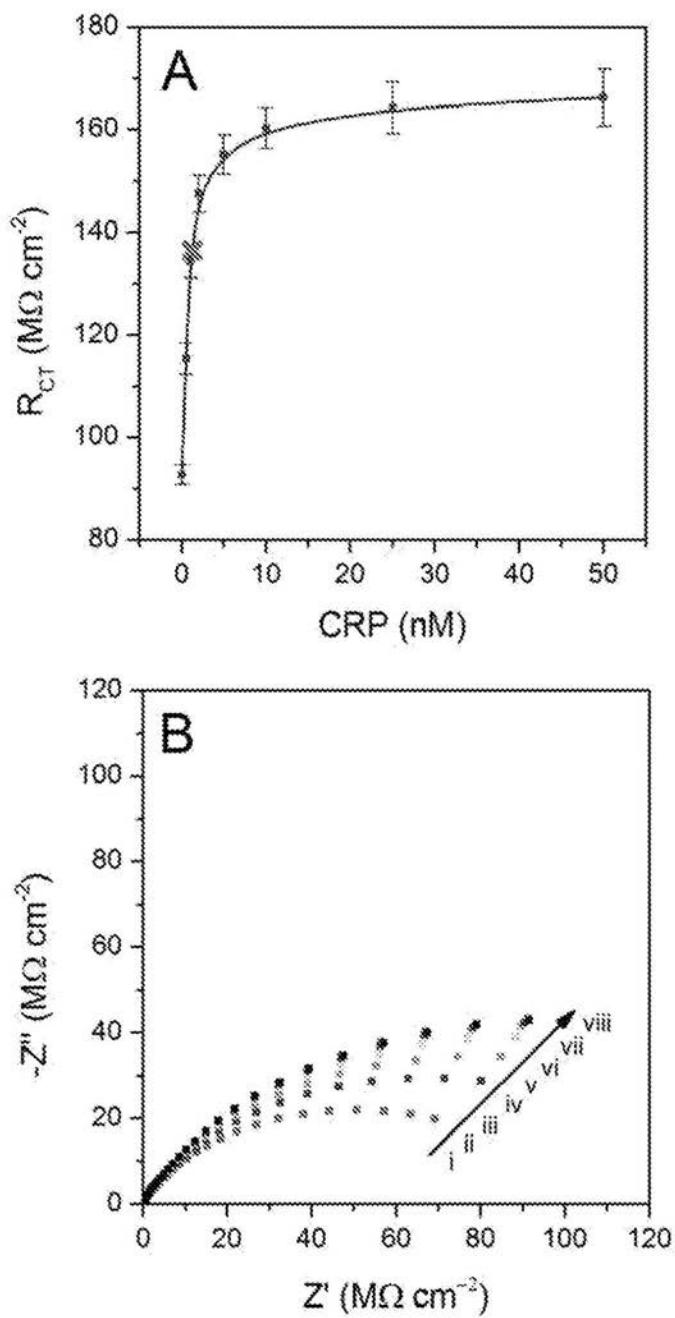
【図1】



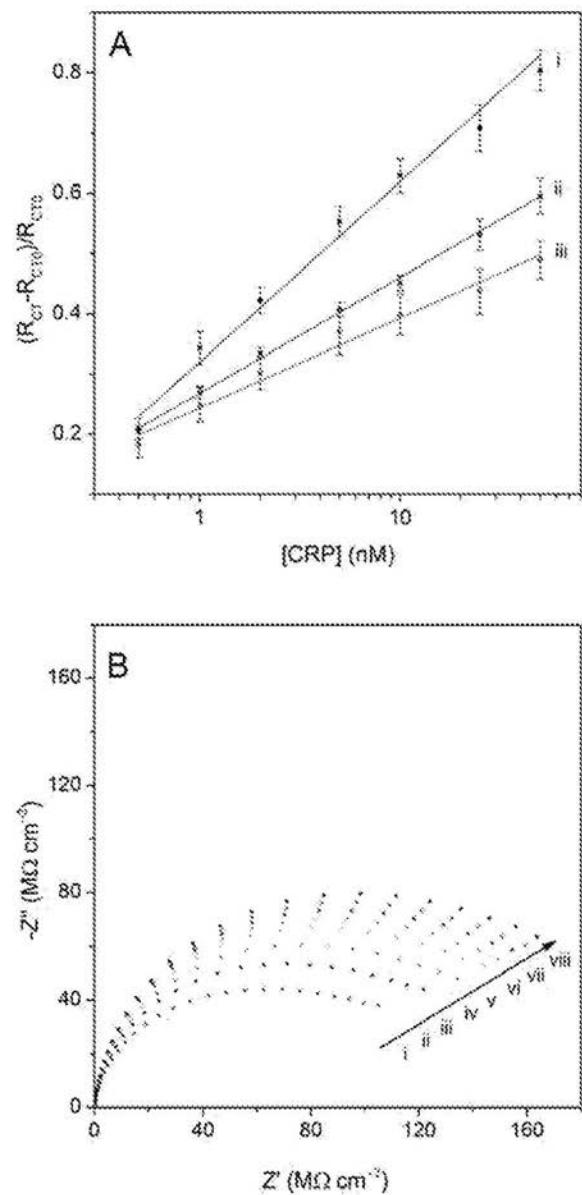
【図2】



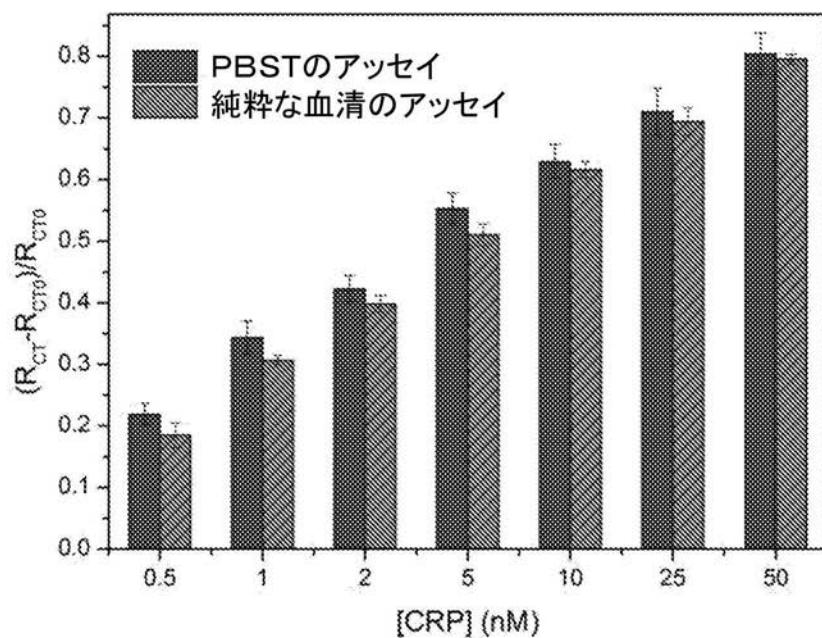
【図3】



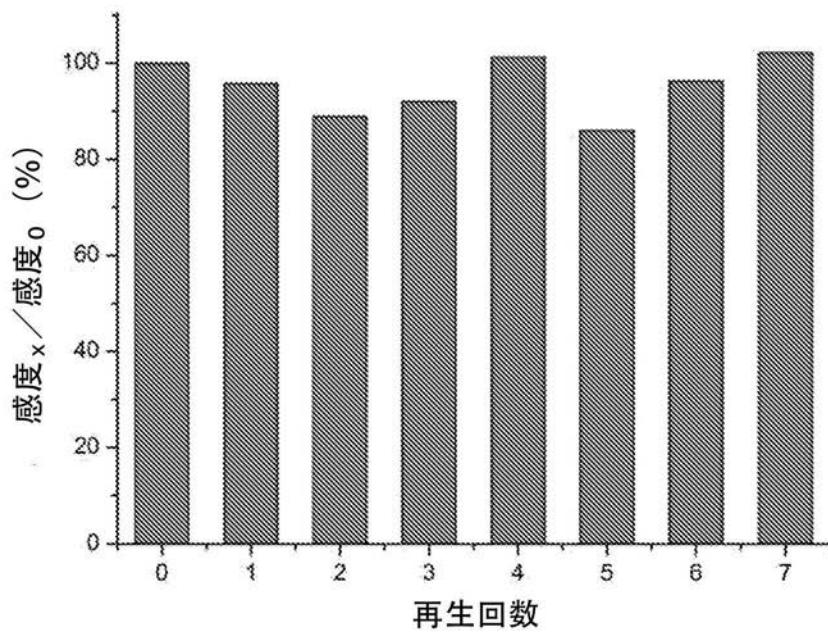
【図4】



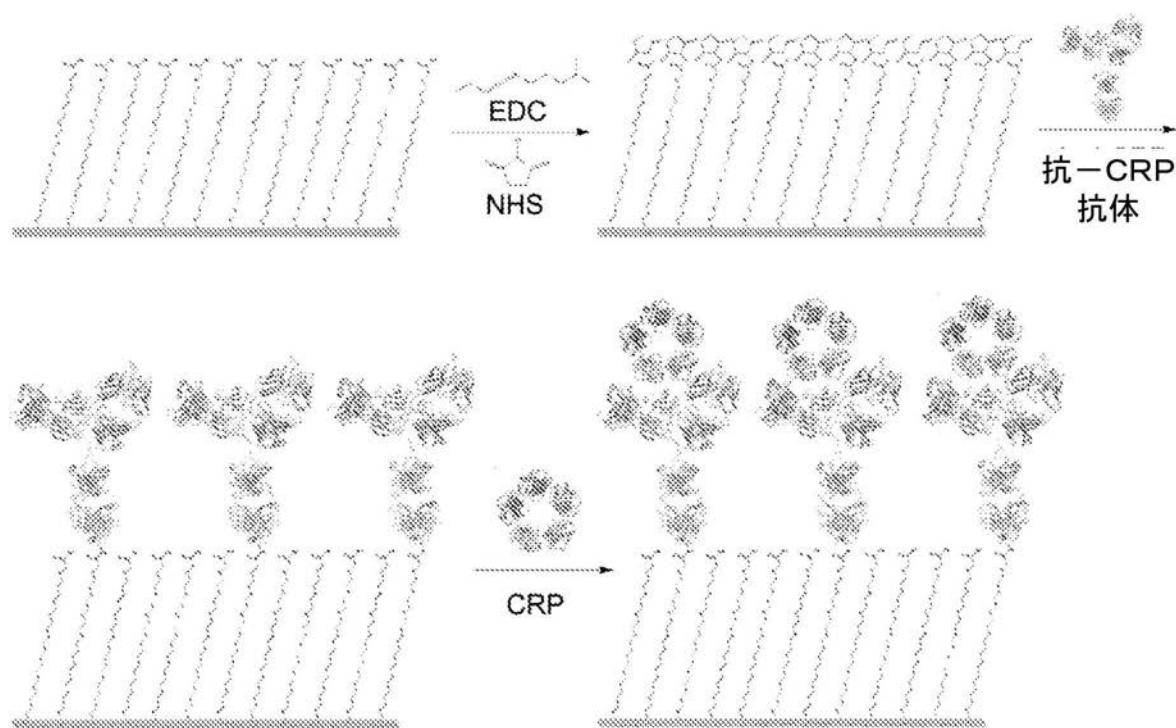
【図5】



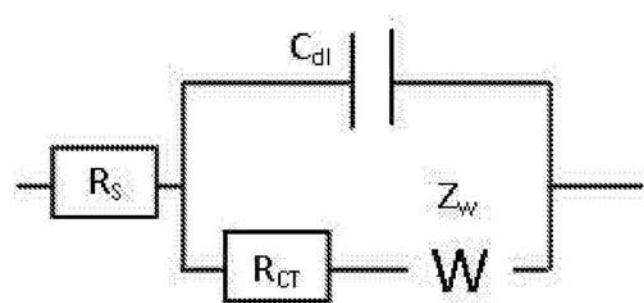
【図6】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2013/051121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543 G01N27/30
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>A. JOHNSON ET AL.: "Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein.", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 84, 10 July 2012 (2012-07-10), pages 6553-6560, XP055066974, ACS Publications Washington DC USA the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-27

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 June 2013

18/07/2013

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, Charles

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2013/051121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	TH. BRYAN ET AL.: "An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol. 39, no. 1, 15 January 2013 (2013-01-15), pages 94-98, XP002698946, Elsevier, Amsterdam the whole document -----	1-27
A	J.Y. PARK ET AL.: "Label-Free Detection of Antibody-Antigen Interactions on (R)-Lipo-diaza-18-crown-6 Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 80, 2008, pages 4986-4993, XP002698947, Washington DC USA figure 6 -----	1-27
A	WO 2011/069997 A2 (ITI SCOTLAND LTD [GB]) 16 June 2011 (2011-06-16) page 20, line 12 - page 21, line 8; claim 9 -----	1-27
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2013/051121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011069997 A2	16-06-2011	CN EP JP US WO	102753965 A 2510342 A2 2013513790 A 2012285829 A1 2011069997 A2	24-10-2012 17-10-2012 22-04-2013 15-11-2012 16-06-2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 110000671

八田国際特許業務法人

(72)発明者 デイビス , ジェイソン

英国 , オーエックス 1 3 ティーエー オックスフォード オックスフォードシャー , サウス パークス ロード , フィジカル アンド セオレティカル ケミストリー ラボラトリー , ユニバーシティ オブ オックスフォード , デパートメント オブ ケミストリー シー / オー

(72)発明者 ブエノ , パウロ ロベルト

ブラジル , 14800-060 サン パウロ , 14800-900 アララクアラ , バイーロ キタンジーニャ , 55 , エヒ . プロフ . フランシスコ デグニ , ユニバージデード エスタデュアル パウリスタ