

(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2021-501334  
(P2021-501334A)

(43) 公表日 令和3年1月14日(2021.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/416 3 3 6 B	4 C 0 3 8
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/327	
A 6 1 B 5/1473 (2006.01)	A 6 1 B 5/1473	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2020-543256 (P2020-543256)	(71) 出願人	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 607-5200, オークランド, フラン クリン ストリート 1111, 12番 フロア
(86) (22) 出願日	平成30年10月29日 (2018.10.29)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月11日 (2020.6.11)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/058020	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02019/089465	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	令和1年5月9日 (2019.5.9)		
(31) 優先権主張番号	62/578,665		
(32) 優先日	平成29年10月30日 (2017.10.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気化学的センサーを用いた、分析物の較正不要なインビボ測定

(57) 【要約】

典型的な電気化学的センサーは、標的により誘導される電流出力の変化を測定する。このような標的結合の測定は個々のセンサー全体にわたって一貫性がなく、さらに、センサーが長期間配置される場合、信号が時間とともにドリフトする。これらの欠点は、標的結合の指標として電流減衰動態を測定するための、クロノアンペロメトリーの新規の使用によって、回避することができる。電流減衰寿命は濃度依存的様式で変わるが、個々のセンサー全体にわたって長時間安定したままであり、較正不要な動作を可能にする。これらの方法によって、アプタマーベースの電気化学的センサーおよび他のセンサータイプは、長期間インビボで配置されることができ、較正なしに標的結合の正確な測定を提供する。

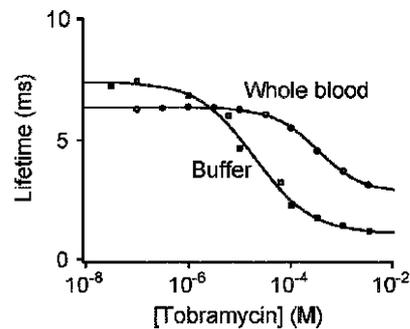


FIG. 4B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

電気化学的センサーの使用によって試料中の標的種の濃度を測定する方法であって、以下の工程を含む、方法：

試料に曝されるように電気化学的センサーを配置する工程であって、該電気化学的センサーの出力が、試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流である、該工程；

1つまたは複数の励起パルス将该電気化学的センサーに印加する工程であって、ファラデー電流出力が各パルスによって生成される、該工程；

該1つまたは複数の励起パルスのそれぞれに続いて、時間分解ファラデー電流データを取得する工程；

該取得された時間分解ファラデー電流データによって、電流減衰の選択された測定の値を計算する工程；

電流減衰の測定の該計算された値によって、電流減衰の選択された測定と試料中の標的種の濃度との間の数学的関係の適用により、該標的種の濃度を計算する工程。

**【請求項 2】**

前記電気化学的センサーが、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、各認識要素が、1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

認識要素がアプタマーを含む、請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

試料が、全血、血清、唾液、尿、汗、間質液、脊髄液、脳脊髄液、組織滲出液、浸軟組織試料、細胞溶液、細胞内区画、水、洗浄水、廃水、地下水、食品、および飲料からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項 5】**

試料が、流れている全血を含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 6】**

試料が、測定前に処理されない、請求項4記載の方法。

**【請求項 7】**

試料が希釈されない、請求項4記載の方法。

**【請求項 8】**

標的種が、小分子薬物、代謝産物、ホルモン、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、脂質、ホルモン、代謝産物、成長因子、神経伝達物質、栄養素、および汚染物質、病原体誘導因子もしくは病原体由来因子、病原体、または細胞からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項 9】**

標的減衰の選択された測定が、減衰定数、平均寿命、半減期、および相対振幅から選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項 10】**

電流減衰の選択された測定が、時間分解電流データの指数関数フィットから得られる、請求項1記載の方法。

**【請求項 11】**

電流減衰の選択された測定が、時間分解電流データの単一指数関数フィットから得られる、請求項10記載の方法。

**【請求項 12】**

電流減衰の選択された測定が、時間分解電流データの双指数関数フィットから得られる、請求項1記載の方法。

**【請求項 13】**

電流減衰の選択された測定と標的濃度との間の数学的関係が、配置された電気化学的セ

10

20

30

40

50

ンサーと同じクラスのセンサーについて得られている、請求項1記載の方法。

【請求項14】

測定の前または後に較正工程を行わない、請求項1記載の方法。

【請求項15】

長期間にわたって反復測定が達成される、請求項1記載の方法。

【請求項16】

電気化学的センサーがインピボで配置される、請求項14記載の方法。

【請求項17】

電気化学的センサーがヒト対象において配置される、請求項15記載の方法。

【請求項18】

電気化学的センサーが非ヒト動物において配置される、請求項15記載の方法。

【請求項19】

電気化学的センサーがポイントオブケアシステムにおいて配置される、請求項1記載の方法。

【請求項20】

電気化学的センサーが試料中に配置される場合、該センサーの出力が試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流であるように、該電気化学的センサーが構成され、かつ

ファラデー電流減衰の測定と標的濃度を関連づける安定した数学的關係が、該電気化学的センサーが属するクラスのセンサーに関して公知である、  
電気化学的センサー。

【請求項21】

前記電気化学的センサーが、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、各認識要素が、1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる、請求項20記載の電気化学的センサー。

【請求項22】

前記クラスのセンサーが、同じ認識要素タイプ、同じ酸化還元レポータータイプ、および電極への結合についての同じ付着性質を有するセンサーを含む、請求項21記載の電気化学的センサー。

【請求項23】

認識要素がアプタマーを含む、請求項21記載の電気化学的センサー。

【請求項24】

以下を含む、電気化学的感知システム：

電気化学的センサーが試料中に配置される場合、該センサーの出力が試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流であるように、該電気化学的システムが構成される、該電気化学的センサー；

該電気化学的センサーへの励起パルスの印加のための、および各パルスの該印加の後に続く、該電気化学的センサーからの時間分解ファラデー電流減衰の取得のための装置を含む、ハードウェア・コンポーネント；ならびに

請求項1～19のいずれか一項記載の方法の該電気化学的センサーおよびハードウェア・コンポーネントによる実施を可能にするデータおよびコンピュータープログラムをそこに記憶させている、非一時的なコンピューター可読媒体。

【請求項25】

前記電気化学的センサーが、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、各認識要素が、1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる、請求項24記載の電気化学的感知システム。

【請求項26】

認識要素がアプタマーを含む、請求項24記載の電気化学的感知システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2017年10月30日に出願された「Calibration Free In-Vivo Measurement of Analytes Using Electrochemical Sensors」と題する米国仮特許出願第62/578,665号に基づく優先権の恩典を主張し、該出願の内容は参照により本明細書に組み入れられる。

## 【 0 0 0 2 】

## 連邦政府による支援を受けた研究または開発に関する表明

U.S. Army Research Officeにより認められた助成金番号W911NF-09-0001 U.S. Army Research Officeの下での政府支援を用いて、本発明は成された。政府は本発明において一定の権利を有する。

10

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

## 発明の背景

標的分子の検出のための、様々なタイプの電気化学的センサーが公知である。多くのそのようなセンサーは、その大きさが標的分子の結合に反応して変化する電流出力を産生する。電気化学的なアプタマーベースの(EA-B)センサーは、酸化還元レポーターで修飾された、電極に結合されたアプタマーを使用し、ここで結合により誘導されるアプタマーの構造変化が、酸化還元レポーターと電極との間の電子流の測定可能な変化をもたらす。EA-Bセンサーは、複合試料中の標的分析物の測定のための、用途の広いプラットフォームを当技術分野に提供してきた。EA-Bセンサーはさらに、流れている全血中での薬物および他の標的種のリアルタイムの検出用にインビボで役立つことが実証されている。しかしながら、このプラットフォームの大きな可能性にもかかわらず、E-ABセンサーはその臨床配置を制限する、ある欠点に悩まされている。

20

## 【 0 0 0 4 】

具体的には、すべての複合装置と同様に、EA-Bセンサーは、同じバッチで製造されても、異なる数の認識要素が個々のセンサー上に存在するという、製作における不一致に悩まされている。このセンサー間の物理的ばらつきは、同じ設計の別のセンサーから得られる出力が、有意に異なり得ることを意味する。さらに、全血のような複合試料環境において配置される場合、最良のE-ABさえドリフトしやすく、ここで試料におけるアプタマーと分子の複合混合物との間の非特異的相互作用が、時間とともに変動する読み取り値をもたらす。これらの要因により、センサーの出力を解釈するためには、較正工程または信号補正処置を行わねばならない。較正が実際的でないか、または多くの場合不可能である、インビボで移植されるセンサーの場合、上記のエラー原因は、臨床実施への重大な障害を提示する。

30

## 【 0 0 0 5 】

従って、較正不要な測定を可能にするセンサーを動作させる、新規の電気化学的センサーシステムおよび方法が、当技術分野において依然として必要である。さらに、信号のドリフトによって混乱させられることなく、インビボで正確に分析物を測定する手段が、当技術分野において依然として必要である。既存の感知プラットフォームの性能および効率を改善することもまた、当技術分野において依然として必要である。

40

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 6 】

先行技術の電気化学的感知方法は、SWVピークのような電流出力の測定値(すなわち絶対電流値)に依拠して、標的濃度を割り出しており、そのような測定値はセンサー間のばらつきおよびセンサーのドリフトに強く影響される。本開示の発明者らは、電気化学的センサーの信号出力動態のある局面、具体的には電流減衰動態は、センサー間のばらつきおよびセンサーのドリフトに影響されにくいことを有利に発見した。絶対電流と同様に、これらの電流減衰動態パラメーターは濃度依存的様式で標的結合に反応するが、絶対電流と違い、それらは絶対電流で観察されるばらつきを回避する手段を提供しつつ、所定のクラスセンサー全体にわたって安定しており、長期間安定している。

50

## 【0007】

本開示の発明者らは、電気化学的センサーを動作させかつセンサーの出力を解釈する新規の方法であって、異なるセンサーにより生成される、または異なる時間に生成される信号が、試料中の標的濃度に正確に相関できるようにする方法を有利に開発した。本発明の方法は、あるクラスの（例えば、同じ認識要素を使用する）センサーを効果的に先験的に較正し、かつインビボの全血のような複合環境下での標的種の長期の較正不要な測定のために配置することを可能にする。

## 【0008】

第一の局面において、本発明の範囲は、標的分析物の濃度の正確な測定値を提供するために、センサーの出力を取得して解釈する方法を包含する。もう一つの局面において、本発明の範囲は、ドリフトのないまたは較正不要な測定とともに動作され得る、センサーシステムを包含する。もう一つの局面において、本発明の範囲は所定のクラスの電気化学的センサーを包含し、ここで該センサーの出力は、該クラスの全センサーにわたって安定している関係により、標的濃度に相関している。もう一つの局面において、本発明の範囲は、電気化学的センサーの出力の取得および解釈により標的濃度を評価できるようにする、コンピュータプログラム、ソフトウェア、および動作を包含する。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0009】

【図1】図1Aは、電極基体(101)に結合したアプタマー(102)がメチレンブルー酸化還元レポーター(103)で修飾されている、E-AB感知プラットフォームの基本的動作を示す。標的の非存在下では、メチレンブルーと基体との間の電子流(104)は遅い。標的(105)がアプタマーに結合すると、結果として生じる構造変化がレポーター(103)の基体(101)への近さを変え、電子移動(104)の速度を増大させる。図1Bは、標的の非存在下より存在下の方がピーク電流が高い、このタイプのE-ABセンサーについての代表的な矩形波ボルタンメトリートレースを示す。

20

【図2】図2Aは、トブラマイシンを標的として用いる、6個1セットのアミノグリコシド検出センサーについての、SWVタイトレーション曲線を示す。SWVを用いて生成される絶対ピーク電流は、標的分子の濃度だけでなく、センサー表面上の酸化還元レポーターで修飾されたプローブの数にも依存する。作用電極の活性領域の差異およびそこに充填されたアプタマープローブの密度の差異に起因して、これらの絶対ピーク電流はセンサーごとに有意に異なる可能性があり、結果として未処理の（較正されていない）センサー出力における大きな差異につながる可能性がある。図2Bは、較正工程を行うことによって正規化した場合の、図2Aのセンサーの出力を示す。

30

【図3】流れている全血において、アミノグリコシド結合E-ABセンサーのクロノアンペロメトリーにより測定された、平均電流対時間の過渡電流の対数-対数プロットを示す。電流減衰は2つの対数期の和として適切に説明される。左から右へ、点線の垂直線の左側までの第一期は、二重層充電電流の減衰であり、ここではセンサーは標的に反応しない。垂直線の右側に向かって、過渡電流は大いに標的依存的である。標的の非存在下で得られる過渡事象において、ファラデー電流のより遅い指数関数的な減衰が観察される。標的（ここではトブラマイシン）の存在下では、平均電流寿命は実質的に減少する。図示した過渡事象は、電位を-0.1Vから-0.3V（Ag/AgClに対して報告された全電位）にステップさせ、結果として生じる電流を10 $\mu$ 秒ごとにサンプリングすることによって記録された。実線は実験データの多指数関数フィットである。

40

【図4A】図4Aは、標的濃度を増大させるにつれて減少する寿命を有する、減衰していく過渡電流を有する、アミノグリコシド結合E-ABセンサー（標的としてトブラマイシンを用いる）に関する、クロノアンペロメトリーにより測定した平均過渡電流を示す。実線は2つの過渡電流の単一指数関数フィットを表す。図4Bは、一組のアミノグリコシド結合E-ABセンサーに関して確立された、緩衝液および全血における電流寿命と標的濃度との関係を示す。2つの試料タイプ間の寿命の違いは、メチレンブルーからの電子移動に影響を及ぼす、電解質の組成および粘度の変化におそらく起因する。図4Cは、図4Bの標準曲線を生成

50

するために使用したのと同じクラスであるが、標準曲線を生成するために使用していない、5つのセンサーによって測定された、トブラマイシン濃度を示す。前記センサークラスに関して生成された曲線によって、流れている全血中のトブラマイシンの濃度を推定するために、これらの独立したセンサーを用いることにより、個々のセンサーを校正する必要なく、広範囲の濃度にわたってトブラマイシン濃度の正確かつ精密な測定値が得られた。無希釈の全血中で試した場合、測定された濃度の値は、 $1\mu\text{M}$ ~ $1\text{mM}$ の範囲にわたって、トブラマイシンの実際の（添加した）濃度から10%の範囲内である。図4Bおよび図4Cにおいて、エラーバー（図4Bにおいては非常に小さいため、目で見るとは難しい）は標準偏差を表す。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図5】図5Aは、流れている全血（ここでは標的無し）におけるE-ABセンサーの出力を示し、ここでSWVから記録される平均ピーク電流は数時間の間にわたって有意にドリフトする（未補正信号）。測定値に適用される動的差動測定補正技術が、補正信号を提供する。図4Bは、全血（標的無し）中で長時間配置された同じセンサーについての、平均電流振幅および平均電流寿命を示す。クロノアンペロメトリーの電流減衰の振幅は、試験期間を通して非常に有意にドリフトする。しかしながら、対照的に、電流寿命は時間をまたがって安定しており、試験期間を通してドリフトしない。

【図6A】生きている麻酔下のラットの頸静脈における、センサーの留置を示す。センサーは構造的サポートのために22ゲージのカテーテルに入れ、2cmの深さのところで外頸静脈の内部に置いた。薬物注入を行うために、注入ラインを反対側に移植した。

【図6B】電流寿命を抽出し、それらをリアルタイムで標的濃度に変換するためにクロノアンペロメトリーにより生成された、過渡電流のリアルタイムの非線形回帰分析を示す。トレースは20個のポイントの経過平均である。点線の四角形は、トブラマイシンが注入された間の時間枠を示す。

【図6C】1時点につき300ミリ秒での寿命対時間のトレース（20個のポイントの経過平均）を示し、ここでこの手法の時間分解能は、薬物の注入だけでなく、その後の、循環系内の薬物の均質化と関連した数十秒の「混合」期をもモニターするのに十分である。このパネルは、図6Bからのダッシュ記号で印をつけたズームした領域に対応する。

【図6D】平均濃度対時間を示し、ここで前例のない時間分解能が、1000個を超える実験ポイントを伴う、薬物の分目盛りでの分配期の測定を可能にし、結果として関連する薬物動態パラメーターの超高精度の推定値をもたらす。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

動作原理

電気化学的センサーの動作の広範囲な研究、ならびにある出力はセンサー製作上のばらつきおよび信号のドリフトに影響されにくいという発見によって、本明細書に開示される発明が得られた。標準的な電気化学的センサーの実施において、電流の流れは標的結合によって変更され、サイクリックボルタンメトリー、交流ボルタンメトリー、および矩形波ボルタンメトリーを含む、ボルタンメトリー法によって評価される。これらの方法は、酸化還元レポーターで修飾された、結合した認識要素の割合に関連するピーク電流であって、センサー上に存在しかつ活性な認識要素（例えばアプタマー）の総数にも大きく依存するピーク電流を測定する。

【0011】

本開示の発明者らは、標的結合により誘導される電子移動の変化をモニターするための、別の手法を開発した。結合依存的な電子移動動態に間接的に関連する、ボルタンメトリーのピーク電流を測定するのではなく、電子移動動態を直接測定することができ、かつ好都合なことに、本開示の発明者らはこれらの値がピーク電流の測定値に影響を及ぼすエラー原因に影響されにくいことを発見した。クロノアンペロメトリーの電流減衰によって測

10

20

30

40

50

定した電子移動動態は、主として標的結合によって決められ、ピーク電流とは異って、各センサー上の活性な認識ユニットの数に依存しないことを、本開示の発明者らは確認した。従って、標的濃度と電子移動動態の関係は、選択されたセンサーの構成に関して割り出すことができ、この関係は安定であり、かつ類似の条件下で動作する同様の全てのセンサーに適用できる。さらに、この予測的關係は長期間動作する個々のセンサーについても安定している。

#### 【0012】

本発明のこの新規の動作原理は、個々のセンサーを較正する必要性を除去し、インピボのような困難な環境でのドリフトのない動作のための手段を提供する。測定値は極めて細かい時間尺度で得ることもでき、電気化学的センサーによる生物学的プロセスの、ミリ秒の時間尺度での分解を可能にする。

10

#### 【0013】

本発明の様々な要素を次に説明する。

#### 【0014】

##### 電気化学的センサー

本発明の様々な態様は、電気化学的センサーを使用する方法に指向している。本明細書において使用される場合、電気化学的センサーは、試料中の標的種の濃度を測定することができる任意のセンサーであり、ここでセンサーの出力を用いて試料中の標的の濃度を推定することができるように、センサーの認識要素への標的種の結合が、感知要素による電流出力の測定可能な変化を誘導する。

20

#### 【0015】

##### EABセンサー

第一の実施において、本発明の方法において利用される電気化学的センサーは、E-ABセンサーを含む。当技術分野において公知の、任意のE-ABセンサーの設計または構成が使用され得る。E-ABセンサーにおいて、認識要素は当技術分野において公知のように、アプタマーを含む。アプタマーはDNAアプタマー、RNAアプタマー、または非天然核酸を含むアプタマー、ならびに前記のものハイブリッドを含み得る。認識要素が核酸以外であるE-AB概念の変種、例えばタンパク質、化学種、および他の分子を用いるセンサーもまた、本発明の範囲内にある。

#### 【0016】

E-ABセンサーにおいて、作用電極の1つまたは複数の選択された部分がアプタマーで機能的にされる。アプタマーは、任意の適切な化学的性質、例えば共有結合、化学吸着、または吸着によって、電極の表面に結合またはさもなければ会合し得る。アルカンチオール単分子層を用いてアプタマーを電極の表面に結合させてもよく、特に金電極の表面に適する。

30

#### 【0017】

各アプタマーは、1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる。標的種の結合は、1つまたは複数の酸化還元レポーターの位置（または電極の利用しやすさ）が検出可能に変更されるように、アプタマーにその立体構造を変化させる。酸化還元種は、電極の利用しやすさまたは電極への近さの変化が電子移動動態の変化を引き起こすように、電極と相互作用する物質の任意の組成を含む。典型的な酸化還元種は、メチレンブルー、フェロセン、ピオロゲン、アントラキノンまたは任意の他のキノン、エチジウムプロマイド、ダウノマイシン、有機金属の酸化還元標識、例えばポルフィリン錯体またはクラウンエーテル環または直鎖状エーテル、ルテニウム、ビスピリジン、トリスピリジン、ビスイミダゾール、エチレン四酢酸-金属錯体、シトクロムC、プラストシアニン、およびシトクロムC'を含む。

40

#### 【0018】

いくつかの実施において、E-ABセンサーは標的結合が信号を増強するような、シグナルオンタイプのセンサーであり、他の実施において、E-ABセンサーはシグナルオフの構成を含んでもよい。1つの態様において、E-ABセンサーは二重鎖センサーであり、ここで酸化

50

還元種は、その一部がアプタマーの一部に相補的であるかまたはさもなければ可逆的に結合することができる別の鎖上に存在する。標的種の存在下では、酸化還元種の鎖はアプタマーから遊離し、標的種がアプタマーに結合しかつ酸化還元種が電極と接触するかまたは近づくのをおこなうことを可能にする。

【0019】

センサーのコンポーネント

電気化学的センサーは、複数の認識要素が（例えば $0.1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ 分子/cm<sup>2</sup>の密度で）結合している1つまたは複数の作用電極を含む。作用電極は、例えばチオールまたはアミンと結合を形成する任意の金属表面；金；任意の金被覆金属（例えばチタン、タンゲステン、白金、炭素、アルミニウム、銅など）を含む、電気化学的な感知に適した任意の電極材料、裸のパラジウム電極、炭素電極などを含んでもよい。

10

【0020】

作用電極は、任意の所望の形状または大きさに構成され得る。例えば、パドル形の電極、矩形電極、ワイヤー電極、電極アレイ、スクリーン印刷電極、および他の構成が使用され得る。薄型のワイヤーは静脈、動脈、組織、または器官の中に挿入することができ、かつ、血管内の血流を妨げることも、組織の実質的な損傷を引き起こすこともないため、インビボの測定のためには、細いワイヤーの構成が有利である。例えば、1~500 μm、例えば100 μmの直径を有するワイヤーが使用され得る。

【0021】

本発明の電気化学的感知システムはさらに、補助電極または対電極、例えば白金補助電極を含む。電気化学的感知要素は、参照電極、例えばAg/AgCl電極、または当技術分野において公知の他の参照電極とともに、用いてもよい。本発明の電気化学的センサーは、クロノアンペロメトリー測定を行うために適切に構成された、二電極または三電極システムにおいて構成され得る。電極を含む細胞システムは、電極が存在し試料と接触する混合チャンバーまたは他の容器を含んでもよい。

20

【0022】

センサーおよび電極システムは、試料中に配置されるかまたは試料に曝される場合に、ファラデー電流の測定値を得るためのアセンブリーを含んでもよい。アセンブリーはハウジングを含んでもよい。例えば、生体の体内での留置のため、ハウジングは針、カテーテル、または他の移植可能な構造物を含んでもよい。エクスピボでの適用のため、ハウジングはウェル、マイクロ流体管、またはラボオンチップ装置に見られるような他の構造物を含んでもよい。

30

【0023】

本発明の電気化学的センサーは、クロノアンペロメトリー測定を行うための適切なコンポーネントと機能的に接続する。クロノアンペロメトリーのコンポーネントは、互いに電気的接続および/またはネットワーク接続している、2つまたはそれ以上の装置を含んでもよいが、または単一の統合装置を含んでもよい。

【0024】

クロノアンペロメトリー測定を行うための第一のコンポーネントは、所望の大きさ、周波数、および波形の励起電圧パルスを送達要素に送達することができる、装置または装置の組み合わせを含む。クロノアンペロメトリーのコンポーネントは、ポテンショスタットまたは他の電圧源および作用電極に電圧ステップをかけるための電圧調整器を含んでもよい。

40

【0025】

クロノアンペロメトリー測定を行うための第二のコンポーネントは、感知要素から時間分解ファラデー電流出力を取ることができる、装置または装置の組み合わせを含む。これらのコンポーネントは、センサーの出力を読み取りかつそのような出力を記憶するか、またはアナログ・デジタル変換器、増幅器、および記憶媒体を含む他の装置に出力を送るための回路を含む。大部分のセンサーシステムにおいて、電流減衰動態を測定するために、非常に細かい時間尺度、例えばマイクロ秒からミリ秒の時間尺度での分解能が必要で

50

ある。

【0026】

他のセンサータイプ

本発明の範囲はE-ABセンサーに限定されない。本発明の範囲はさらに、認識要素への標的結合が、感知要素により測定可能な電子移動速度において測定可能な変化をもたらす、任意の電気化学的センサーを包含する。1つの局面において、信号を生成する手段としての直接電子移動および酸化還元平衡の使用を含む、非媒介性の電気化学的感知を用いるセンサーが使用され得る。これらの生化学的センサーは、例えば、酸化還元対に属する種の消費または生成を検出するセンサーを含む。他のセンサーは、媒介性の電気化学的分析、すなわち電子移動のための酸化還元種メディエーターの使用および酸化還元平衡の確立を用いてもよい。媒介性および非媒介性センサーの例は、Sander et al. 2015, A Review of Nonmediated and Mediated Approaches. Environ. Sci. Technol. 49:5862-5878に見られる。

10

【0027】

さらなるセンサータイプは、化学修飾電極、免疫センサー、オリゴペプチドベースのセンサー、ならびに細胞小器官（例えば、葉緑体、ミトコンドリア）、動物および植物組織、微生物、酵素、組織切片、ペプチド、および抗体を利用するセンサーを含む。

【0028】

さらなるセンサータイプは、液相酸化還元レポーターからの電子移動の変化、例えば、Katayama et al. 2000, The Design of Cyclic AMP-Recognizing Oligopeptides and Evaluation of Its Capability for Cyclic AMP Recognition Using an Electrochemical System. Anal Chem. 2000;72(19):4671-4に記載されるような、サイクリックAMPを特異的に認識する17塩基長のペプチドと結合したフェロシアネート（ferrocyanate）/フェリシアネート（ferricyanate）の酸化還元を測定するセンサーを含む。

20

【0029】

使用され得るもう一つのセンサー構造は、高分子センサーであり、例えばLe Floch, 2006, Label-Free Electrochemical Detection of Protein Based on a Ferrocene-Bearing Cationic Polythiophene and Aptamer. Anal Chem. 2006;78(13):4727-31. doi: 10.1021/ac0521955に記載されるような、フェロセン置換基を有するカチオン性ポリチオフェンをアプタマーシステムにおけるメディエーターとして使用するセンサーである。

30

【0030】

使用され得るもう一つのセンサータイプは、標的結合により誘導されるリガンドの置換に起因する電子移動の変化に基づくセンサーであり、例えばPrasad, 2004, The Role of Ligand Displacement in Sm(II)-HMPA-Based Reductions. J Am Chem Soc. 2004;126(22):6891-4に記載されるような、ヨウ化サマリウム(II)を伴うヘキサメチルホスホルアミドである。

【0031】

もう一つの典型的なセンサータイプは、酸化還元レポーターの再編成エネルギーの変化に基づくものであり、例えばPlumb, 2003, Interaction of a Ferrocenoyl-Modified Peptide with Papain: Toward Protein-Sensitive Electrochemical Probes. Bioconj Chem. 2003;14(3):601-6. doi: 10.1021/bc0256446に記載されるような、フェロセノイル-ペプチド；または、例えばFeld 2012, Trinuclear Ruthenium Clusters as Bivalent Electrochemical Probes for Ligand-Receptor Binding Interactions. Langmuir. 2012;28(1):939-49. doi: 10.1021/la202882kに記載されるような、三核ルテニウムクラスターである。

40

【0032】

使用され得るもう一つのセンサータイプは、足場に付着した酸化還元レポーターが下部の電極表面に接近する際の効率の、立体的に誘導される変化に基づくセンサーであり、例えばGe 2010, A Robust Electronic Switch Made of Immobilized Duplex/Quadruplex DNA. Angew Chem Int Ed. 2010;49(51):9965-7. doi: 10.1002/anie.201004946に記載され

50

るような、二重鎖DNA、四重鎖DNA、およびDNAナノスイッチ、またはCash 2009, An Electrochemical Sensor for the Detection of Protein-Small Molecule Interactions Directly in Serum and Other Complex Matrices. J Am Chem Soc. 2009;131(20):6955-7. doi: 10.1021/ja9011595に記載されるような、小分子認識要素を含むDNAである。

#### 【0033】

##### センサークラス

本発明の様々な方法は、あるセンサーの出力、すなわち電流減衰動態が、所定のタイプのセンサーの間で安定しているという発見に基づく。本明細書において用いられる場合、クラスは1つまたは複数の共通の特徴を有する、複数のセンサーを意味する。センサーの特徴は、電極の構成および材料、分析される試料のタイプ、認識要素タイプ、酸化還元レポータータイプおよびその配置、作用電極上の認識要素の充填密度、電極機能化の化学的性質、ならびにセンサーの出力に影響を及ぼす他のセンサーパラメーターを含む、様々な因子を含み得る。もう一つのクラスのパラメーターは、あるクラスのセンサーが同じ割合で製作されたものである、センサーの製造ロットであり得る。

10

#### 【0034】

一つの態様において、センサーのクラスは、実質的に同一のセンサー構造、同一の認識要素および酸化還元レポーター要素、作用電極への認識要素の付着に関する同一の化学的性質、同一の製造方法、ならびに類似の認識要素の充填密度（例えば、1平方センチメートル当たりのプローブのモル換算で、バッチ内のセンサー間で1~20%変動する充填密度）を有する、複数のセンサーを含む。

20

#### 【0035】

##### 標的種

本発明の方法で使用されるセンサーは、標的種の検出に指向している。標的種は任意の無機または有機分子、例えば小分子薬物、代謝産物、ホルモン、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、脂質、ホルモン、代謝産物、成長因子、神経伝達物質、または栄養素を含み得る。標的は汚染物質または混入物を含んでもよい。標的は毒素を含んでもよい。標的は、病原体誘導因子もしくは病原体由来因子、またはウイルスもしくは細胞を含んでもよい。いくつかの態様において、標的種は、化学療法薬のような重大な副作用を有する薬物、または血液濃度の正確な測定が安全な投薬もしくは最小の副作用を確実にするのに不可欠である、狭い治療指数を有する薬物を含む。

30

#### 【0036】

##### 動作条件

センサーは、検出プロセスの様々な局面を包含する選択された動作条件下で利用される。動作条件は、センサーの動作および出力に影響を及ぼす要因の任意の組み合わせを包含し得る。

#### 【0037】

第一の局面において、動作条件は分析する試料タイプを包含する。本発明の標的種は、試料中で評価される。試料は液体を含む。試料は、全血、血清、唾液、尿、汗、間質液、脊髄液、脳脊髄液、組織滲出液、浸軟組織試料、細胞溶液、細胞内区画、水、洗浄水、廃水、地下水、食品、飲料、または他の生体試料もしくは環境試料を含んでもよい。いくつかの態様において、試料は対象、例えばヒト患者または獣医学の対象もしくは試験動物のような非ヒト動物から得られる。一つの態様において、試料は流れている全血、すなわち対象の生体内に（例えば循環系に）移植されたセンサーを含む感知システムによってサンプリングされる血液を含む。別の態様において、方法は、液体試料と平衡化した気体中で標的種を測定するために使用される。

40

#### 【0038】

一つの態様において、試料は測定前に処理される。処理の例には、ろ過、希釈、緩衝化、遠心分離、および分析前の試料への他の材料またはプロセスの適用が含まれる。いくつかの態様において、試料は測定を行う前に処理されず、例えば試料は希釈されず、ろ過されず、または濃縮されない。

50

## 【0039】

第二の局面において、動作条件はアッセイ条件を包含する。一般的なアッセイ条件は、試料体積、温度、pHなどのような、アッセイのための反応条件を意味する。

## 【0040】

第三の局面において、動作条件はセンサーの測定値を得るために使用される動作パラメーターによって規定され得る。例えば、印加電圧波形の形状および周波数、電圧ステップ値、ならびにサンプリング間隔は、動作パラメーターを構成する変数の一部である。

## 【0041】

電流減衰による標的濃度の測定

第一の局面において、本発明は電気化学的センサーの使用によって試料中の標的種の濃度を測定する全体的な方法を包含する。方法は以下の大まかな工程を包含する：

(A) 選択されたセットの動作条件下で動作する、選択されたクラスの電気化学的センサーに関して、電流減衰の選択された測定と標的濃度との間の数学的関係を明らかにする；

(B) 選択された動作条件下で、選択されたクラスの電気化学的センサーを未知の標的濃度の試料中に配置し、電流減衰の選択された測定の値を取得する；かつ

(C) 工程(A)で確立した電流減衰と濃度の関係を適用して、工程(B)で観察された電流減衰値を用いて試料中の標的種の濃度を割り出す。

## 【0042】

例えば一つの態様において、本発明は、電気化学的センサーの使用によって試料中の標的種の濃度を測定する方法であって、以下の工程を含む方法を包含する：

試料に曝されるように電気化学的センサーを配置する工程であって、該電気化学的センサーの出力が、試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存の様式で変わるファラデー電流である、該工程；

1つまたは複数の励起パルス将该電気化学的センサーに印加する工程であって、時間依存的なファラデー電流出力が各パルスによって生成される、該工程；

該1つまたは複数の励起パルスのそれぞれに続いて、時間分解ファラデー電流データを取得する工程；

該取得された、時間分解ファラデー電流データによって、電流減衰の選択された測定の値を計算する工程；

電流減衰の測定の該計算された値によって、電流減衰の選択された測定と試料中の該標的種の濃度との間の数学的関係の適用により、該標的種の濃度を計算する工程。

## 【0043】

電流減衰の測定

本開示の発明者らは、励起刺激に反応して生成される過渡電流の減衰速度が標的種の濃度に関連しており、かつ同じクラスのセンサー全体にわたって安定していることを有利に明らかにした。それゆえに本発明の方法は、電流減衰の測定、電流減衰速度と標的濃度の関係、およびこの関係の、同様のセンサーでの長期間にわたる著しい安定性に依存する。クロノアンペロメトリーの減衰の寿命は、結合および非結合認識要素(例えば、アプタマー)の相対的な総数にのみ依存しており、結合および非結合認識要素の絶対数には依存せず、それゆえに、同じクラスの個々のセンサー間で有意に異なり得る要因に依存しない標的濃度測定手段を提供する。

## 【0044】

例えば、複数の認識要素で機能的にされた電極基体を含む電気化学的センサーであって、各認識要素が1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる電気化学的センサーの場合、酸化還元レポーターの電気的興奮は、酸化還元レポーターと電極基体の間の(またはシステムの構成によっては、電極基体と酸化還元レポーターの間の)電流の一時的な流れを誘導する。E-ABセンサーの基体のような作用電極の電圧をステップさせると、作用電極はより強力な還元剤(より陰電位へステップさせる場合)またはより強力な酸化剤(より陽電位へステップさせる場合)のどちらかになる。適切な範囲内(酸化還元レポ

10

20

30

40

50

ターの酸化還元電位の近くまたはそれより上)で、この電圧のステップは、センサーの認識要素の酸化還元レポーターと電極基体との間のファラデー電流の流れを誘導する。電流が流れるにつれて、励起によって動員された電子のプールが枯渇し、センサーの認識要素の結合状態に依存的な速度および振幅で、電流が指数関数的に(または多指数関数的に)減衰し、ここで標的結合は、例えば作用電極への酸化還元レポーターの近さを変化させることによって、電流のより早いまたはより遅い移動を誘導する。従って、試料中の標的種の濃度に比例する、標的に結合した認識要素の標的に結合していない認識要素に対する比率が、全体としてセンサーに関して観察される電流減衰の速度および振幅を決定する。

#### 【0045】

本明細書において用いられる場合、「電流」は試料中に配置されたセンサーによって測定される、電子の流れを意味する。例えば、電流は酸化還元レポーターから電極への電子の流れを含んでもよいが、または電極から酸化還元レポーターへの電子の流れを含んでもよい。本明細書において用いられる場合、「電流減衰」は、センサーまたは試料への励起刺激の適用に反応してセンサーによって経時的に測定される、過渡電流の挙動を意味する。

10

#### 【0046】

電流減衰の測定は、当技術分野において公知のような、クロノアンペロメトリー法を用いて達成され得る。減衰パラメーターは、センサーおよび/または試料に励起を適用し、励起に続いてある期間にわたって電流の反応を測定することにより、測定されてもよい。それゆえに、減衰パラメーターの測定は、(1)所望の電圧、周波数、および波形の励起パルスを送達し、かつ(2)過渡電流の持続時間に対応する時間尺度にわたって電流反応を測定する、コンポーネントと関連するセンサーまたは試料環境を必要とする。

20

#### 【0047】

励起パルスは、過渡電流を誘導する任意の種類の刺激であってもよく、例えば、センサー電極の電位を酸化還元レポーターが実質的に(例えば、十分に)酸化または還元される値にステップさせることであってもよい。適切な励起波形は、当技術分野において公知のように選択され得る。例えば、 $+/-0.1V \sim 0.5V$ の範囲の電圧ステップが、 $1 \sim 10,000Hz$ の繰り返し率、例えば $5Hz, 10Hz, 20Hz, 50Hz, 100Hz$ 、および $1Hz$ と $10,000Hz$ の間の中間値の繰り返し率で、利用され得る。

#### 【0048】

マイクロ秒からミリ秒の時間尺度での時間分解電流の測定値の取得が、一般的に必要とされる。代表的な過渡電流は $10 \sim 100$ ミリ秒の範囲の持続時間を有し、より短い時間間隔で、例えば $1\mu$ 秒、 $2\mu$ 秒、 $3\mu$ 秒、 $5\mu$ 秒、または $10\mu$ 秒ごとに、サンプリングすることにより分解され得る。

30

#### 【0049】

時間分解電流データが取得されると、これらのデータは次に、電流減衰の動態を説明する任意の数の数学的パラメーターを得るために分析され得る。減衰の選択された測定は、試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わる過渡電流の、任意のパラメーターであってもよい。電流減衰の選択された測定は、減衰動態の任意の測定、例えば電流減衰の速度定数、寿命、半減期、または任意の他の定量化として、評価されることができる。例えば、後述するように一つの態様において、減衰の測定は、ある関数への減衰曲線全体のフィッティング、およびその減衰曲線についての寿命(逆速度定数)または半減期の利用によって、得られる。後述するように、もう一つの態様において、2つまたはそれ以上の指数関数の和を導き出す関数への時間分解データのフィッティング、および指数成分の相対振幅、または同様な測定の利用によって、減衰が得られる。

40

#### 【0050】

選択された数学的分析を取得された時間分解電流データに適用して、減衰の選択された測定を得る。結合および非結合認識要素の同時発生の電子移動を解明するため、任意の回帰分析を適用して電流減衰の選択された測定を得てもよい。一つの態様において、電流減衰の測定は、センサー電流のトレースに対する単一指数関数フィットを用いて得られる。

50

一つの態様において、電流減衰の測定は、多指数関数フィットを用いて得られる。一つの態様において、電流減衰の測定は、双指数関数フィットを用いて得られる。一つの態様において、電流減衰の測定は、三指数関数フィットを用いて得られる。電流減衰値は、単一のデータポイント、または複数のデータポイントの平均によって、評価されてもよい。例えば、サンプリングされた減衰値は、1~100サイクルの範囲にわたる、例えば5、10、20、50、75、もしくは100サイクルまたはその中間値である選択された数の励起-減衰サイクルを通して観察される平均値を含んでもよい。

#### 【0051】

いくつかのセンサーシステムにおいて、認識要素の結合状態と非結合状態の間の相互変換の動態は、センサーによって測定される電子移動事象よりも急速である。それゆえに、観察される過渡電流は、結合および非結合状態の総数加重平均を反映する。これは、例えば図4Aにあるように、単一指数関数フィットを用いて電流減衰寿命を見積もることにより分析され得る。この「最良フィット」の単一指数関数の寿命は、標的の濃度に単調に関連する。つまり、2つの指数関数的プロセス（非結合減衰および結合減衰）の和として最適に説明される電流減衰のトレースは、単一指数関数曲線にフィッティングさせることができ、そのパラメーター（例えば、減衰定数、半減期など）は、標的濃度を測定する手段を提供する。

10

#### 【0052】

一つの態様において、2つの指数の和を導き出す関数への時間分解電流データのフィッティング、および標的結合の測定としての、指数成分の相対振幅の使用によって、減衰の選択された測定が得られる。例えば、観察される電流減衰は結合および非結合減衰の組み合わせであるため、双指数関数フィットを用いて、より速い期は標的結合減衰を表し、より遅い期は非結合減衰を表す、減衰曲線を描くことができる。どちらかの減衰の相対振幅、すなわち2つの期を合わせた合計の振幅に対するその振幅、または2つの期の振幅の比率は、標的が結合した認識要素の割合の測定として利用され得る。別の実施において、減衰は3つまたはそれ以上の指数関数、例えば三指数関数フィットなどにより、説明され得る。

20

#### 【0053】

例えば、指数関数フィットを利用する典型的な方法は、Magnetic Resonance Imaging, Volume 5, Issue 5, 1987, Pages 381-392における、Kamman et al., C., Multi-exponential relaxation analysis with MR imaging and NMR spectroscopy using fat-water systemsに記載される。

30

#### 【0054】

例えば、一つの実施において、クロノアンペロメトリーのセンサーからの電流減衰は、対数*i*（電流）-対数*t*（時間）プロットに表示され、以下の式を用いて非線形回帰分析が行われる：

単一指数関数的システムについては、式1による：

$$(式1) \quad i = i0_1 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + C$$

双指数関数的システムについては、式2による：

$$(式2) : \quad i = i0_1 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + i0_2 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + C$$

三指数関数的システムについては、式3による：

$$(式3) \quad i = i0_1 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + i0_2 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + i0_3 * \exp\left(\frac{-t}{\tau_3}\right) + C$$

式1~3に関して、式中、*t*は励起の後に続く時間であり、 $\tau$ は時間定数であり、*i*は電流であり、かつ*C*は、もしあれば一定のバックグラウンド電流である。

40

#### 【0055】

相対振幅は、全振幅の和に対する、1つの選択された振幅の比率として計算される。例えば、双指数関数フィットについては以下である：

50

式 4: 相対振幅  $1 = \frac{i_{01}}{(i_{01}+i_{02})}$ ; および

式 5: 相対振幅  $2 = \frac{i_{02}}{(i_{01}+i_{02})}$

【 0 0 5 6 】

図3は電気化学的センサーに関する電流減衰動態の図解を提供する。この例では、パルスされた電圧がメチレンブルー酸化還元レポーターを含むE-ABセンサーに印加され、パルスに続いて電流が測定される。2つの曲線が提示され、1つは標的を含まない試料に関する電流動態を表し、もう1つは飽和濃度の標的（すなわち、その濃度ではセンサーの認識要素であるアプタマーが全て標的に結合している）を含む試料に関する電流減衰を表す。十分な陰電位で電圧のステップを適用すると、全てのメチレンブルーレポーターの完全な還元が達成される。これらの電子の流れは、パルスの終了に続いて経時的に測定される。第一期において、一般的に水溶液中でのパルスの印加の約0.1ミリ秒後は、減衰が速い。この期は、この電位バイアスで電極表面上に形成される電気的二重層の充電（すなわち、マイクロ秒の時間尺度を有する水溶性イオンの移動）に起因する。二重層充電の減衰は、大部分は試料中の標的濃度の影響を受けず、一般的には標的濃度の予測に役立たない。この期に続いて、第二の期が観察され、ここではレポーターのファラデー還元、例えばメチレンブルーからロイコメチレンブルーへの還元、に対応する標的結合に、減衰動態が強く関連する。図2において、標的で飽和された認識要素について、 $100 \pm 30$ マイクロ秒の寿命を有する、電流の急速な指数関数的減衰が観察される。標的のない試料中の認識要素については、 $6.5 \pm 0.5$ ミリ秒の寿命を有する、遅い減衰が観察される。約5分の1への寿命の減少（飽和された試料を標的を欠く試料と比較した場合）は、電極表面への酸化還元レポーターの近さの変化に対応し、標的のないアプタマーよりも速く電子を移動させる、標的に結合したアプタマーの総数を反映する。

【 0 0 5 7 】

クラス較正

1つの局面において、本発明の範囲は、あるクラスのセンサーを、該クラスのセンサーの代表的なサブセットを用いて較正する方法に指向している。較正工程の目的は、該クラスの全てのセンサーに関するセンサー出力を解釈するための、標準曲線を生成することである。従って、所定のクラスのセンサーが配置される動作条件と類似のおよび/またはそれらを代表する動作条件下で、同じ設計の代表的なセンサーを使用し、代表的な試料をアッセイすることにより、該センサーの較正が行われる。一度代表的なサブセットを用いてそのような較正が行われると、該クラスからの他のセンサーを用いて、類似の動作条件下で標的種の較正不要な測定を行うことができる。

【 0 0 5 8 】

選択された動作条件下で、代表的な試料において選択されたセンサータイプについての「減衰-濃度関係」を確立することにより、クラス較正が達成される。減衰-濃度関係は、試料中の標的濃度と、作用電極での電圧のステップの結果生じる観察される電流減衰との予測関係である。減衰-濃度関係は、任意の適切な回帰分析を用いて計算され得る。信号出力は結合および非結合減衰の合算した和であるため、2つの指数関数的減衰曲線の和に基づく単調関数を推定するモデルは、計算工程によく適する。例えば、電流寿命が電流減衰の選択された測定である場合、電流寿命と濃度の関係が割り出される。もう一つの態様において、相対振幅と濃度の関係が確立されるように、較正データは複数の指数関数的プロセスを抽出するようにフィッティングされ、各対数期について計算される相対振幅が減衰の測定となる。

【 0 0 5 9 】

工程(A)における関係を確立するために使用される較正測定は、様々な公知の標的濃度の標準のセットを用いて行われる。測定は、センサーのダイナミックレンジ内、すなわ

ちゼロの標的から飽和標的レベルまでの標的濃度の範囲にわたって、例えば添加した試料の使用によって、なされるべきである。任意の数のデータポイントを生成してもよく、例えば2~1000個のデータポイントをサンプリングして、校正データを生成してもよい。例えば、25~100個の、例えば50~75個のデータポイントを校正において使用してもよい。

#### 【0060】

クラス校正プロセスは、センサーの代表的なセットを使用する。代表的なセットは、クラスの他のセンサーを正確に予測する校正曲線を提供するのに十分な数のセンサーを含む。代表的なセットにおけるセンサーの数は、例えば下位試料(sub-sample)の値に基づく試料平均を割り出すための、当技術分野において公知の方法によって、確立され得る。代表的なセットは、例えば1個、3個、5個、10個、20個、50個、100個、またはそれより多い、およびそれらの中間値のセンサーを含んでもよい。

10

#### 【0061】

図3Bは本発明の校正曲線を示す。5個のE-ABアミノグリコシド検出センサーについて、全血および緩衝液の両方において、一定の濃度の範囲にわたって電流寿命を評価した。「最良フィット」の単一指数関数は、ラングミュア等温線への寿命対濃度の非線形回帰によって、標的の濃度に単調に関連した。これらの結果は、血液および緩衝液の校正曲線が異なる、センサー出力に対する別々の動作条件の効果を示す。

#### 【0062】

類似の動作条件下で動作させる、所定のクラスの複数のセンサーは、十分に類似した減衰出力を有し、そのクラスの全センサーについて生成された標準曲線を用いた標的の予測を可能にする。同じクラスのセンサーは、所定の標的濃度を含む同様の試料に曝された場合に、製造の厳密さ、システムに固有の信号対雑音、および他の変数に応じて20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、または1%未満異なる選択された電流減衰測定値を有する、減衰出力を有し得る。

20

#### 【0063】

一つの態様において、本発明の範囲はクラス校正センサーを包含する。クラス校正センサーは、例えば選択された認識要素、選択された酸化還元レポーター、選択された電極付着性質、選択された電極構成、およびセンサーの性能を規定する他のパラメーターを有する、選択されたクラスのセンサーであって、電流減衰の選択された測定と選択された標的の濃度との減衰-濃度関係が、該クラスのセンサーに関して公知であるセンサーを意味する。一つの態様において、クラス校正センサーはアプタマーベースの電気化学的センサーである。

30

#### 【0064】

##### 校正不要な測定

一つの局面において、本発明の範囲は、標的種の濃度の校正不要な測定の方法を含む。本発明において用いられる場合、校正不要な動作は、選択されたクラスに特異的な校正曲線の使用によって、センサー出力(例えば、電流減衰寿命または相対振幅)が標的濃度の値に直接変換される、該選択されたクラスの電気化学的センサーの動作を意味する。校正不要な動作において、センサーは測定の前、間、または後に必ずしも校正されない。

#### 【0065】

##### ドリフトのない動作

一つの局面において、本発明の範囲は、長期間、例えば数時間、数日、数ヶ月、またはそれより長く動作させる電気化学的センサーの、ドリフトのない動作を包含する。図5Aに示されるように、流れている全血中に直接配置されるE-ABセンサーは、センサー出力が矩形波ポルタンメトリーにより振幅として測定される場合、著しくドリフトする出力を有する。この重大な基線ドリフトは、図5Bにおけるように、代わりに電流寿命を測定すると解消され、図5Bでは試験期間の間、絶対的なセンサー出力は著しくドリフトする一方、電流寿命は8時間安定している。

40

#### 【0066】

##### サブ秒の時間分解能

50

本発明の方法は、分子の直接的なインピボでの較正不要なサブ秒分解測定を可能にする。実施例に記載されるように、本発明の方法によって、例えば100～500ミリ秒の時間尺度で、血液または他の身体区画における標的濃度のリアルタイムの分解が可能となる。この手法の前例のない時間分解能は、薬物の取り込みおよび分配、ホルモンおよび神経伝達物質の放出、ならびに短い時間尺度の間に起きる他の生理学的事象のような、生理学的事象の間に急速に変動する標的動態の測定を可能にする。クロノアンペロメトリーにより可能となる微細な時間尺度の分解能によって、本発明の方法は特に薬物動態分析によく適する。一つの態様において、本発明は、薬物、代謝産物、排出物、または薬物代謝に關与する他の種の較正不要な測定による、薬物動態パラメーターのリアルタイムの計算を包含する。

10

#### 【0067】

センサーの配置および動作

類似の動作条件下で動作させた、あるクラスのセンサー全体にわたる、電子移動動態の固有の安定性は、様々な状況での電気化学的センサーの使用を可能にする。様々な実施において、本発明の方法は、較正が不可能な、厄介な、または費用のかかる状況で配置される場合に、センサーが正確な測定を行うことを可能にする。本発明の較正不要な、ドリフトのない方法は、インピボ測定に特に適している。例えば、感知システムの感知要素またはハウジングは、生体の体内に挿入、移植、またはさもなければ置かれてもよい。感知システムのセンサー要素は、循環系に、皮下に、腹腔内に、器官内に、または他の身体区画に移植されてもよく、ここで感知要素はインピボの液体、例えば間質液、血液、例えば流れている全血に曝される。本発明の移植された感知システムは、体外のコンポーネントと（例えば導線、ワイヤー、または無線通信手段により）接続した、移植された感知要素を含んでもよく、ここで外部コンポーネントは、パルスの生成、データの取得または処理を行う。あるいは、感知要素の1つまたは複数の補助的なコンポーネント、または本発明の感知システム全体でさえも、データ収集のための外部装置との通信手段（例えば、導線、ワイヤー、または無線通信装置による）とともに、体内に移植されてもよい。

20

#### 【0068】

一つの態様において、本発明の方法は、当技術分野において公知のような、フィードバック制御された投薬システムにおいて実施され、ここで薬物は、治療指数または安全指数の範囲内で血中濃度を維持するように投与される。例えば、そのような方法およびシステムにおいて、本発明の方法は、標的種の濃度を測定するために対象に移植された電気化学的感知要素を用いることにより適用され、ここで標的種は薬物、薬物の代謝産物、または薬物が投与されるべきであることを示すバイオマーカーである。検出された標的種のレベルが、対象が薬物または他の薬剤の投与を必要としていることを示す場合、移植されたポンプまたは他の薬剤送達手段が、薬物または薬剤の濃度を所望の範囲内に維持するための投与量で計量された薬物または薬剤を投与する。

30

#### 【0069】

他の状況において、本発明のセンサーは、環境現場または産業現場、例えば川、海、水処理工場、産業施設、食品加工施設などでの、長期のおよび/または継続的なモニタリングのために利用される。

40

#### 【0070】

本発明のセンサーはまた、エクスピボの診断的適用においても使用され得る。一つの態様において、本発明の方法は、生体から試料を取り出す工程、および試料中の標的種の濃度を較正不要な測定によって測定する工程を含む。一つの態様において、本発明のセンサーはポイントオブケア検査システムにおいて使用される。例えば、一つの態様において、試料は血液試料、例えば自分で取り出した、ピンで刺した、すなわち指を刺した血液試料、または尿、汗、もしくは唾液試料である。そのような態様において、電気化学的センサーは、ウェル、スライド、ラボオンチップ、マイクロ流体チャンバー、または他の装置のようなハウジングにおいて、配置されてもよい。

#### 【0071】

50

### 較正を伴うクロノアンペロメトリー

本発明の範囲は、較正不要なクロノアンペロメトリーに限定されない。1つの実施において、クロノアンペロメトリーを行う電気化学的センサーにより達成される濃度測定の正確さは、1つまたは複数の較正工程、すなわち濃度の観察値と期待値の間のずれを調べるために、および任意のそのようなずれを補正するために、配置されたセンサーが1つまたは複数の公知の標的濃度の試料に曝される工程、の実施によって高められる。この態様はさらに、このクラスのセンサーにインテロゲートする (interrogating) ための、クロノアンペロメトリーが提供する、確立された電気化学的方法と比較して改善された時間分解能を伴う。

#### 【0072】

一つの態様において、配置されたセンサーの減衰-濃度関係は、較正によって確立される。配置されたセンサーは、現在の動作条件下で該センサーについての減衰-濃度関係を確立するために、公知の標的濃度の1つまたは複数の試料に曝されてもよい。

#### 【0073】

### コンピュータープロセスおよびプログラム

本発明の範囲は、ソフトウェア、コンピュータープログラム、およびプログラム装置を含む、様々な態様を包含する。一つの態様において、本発明の範囲は、データおよび/またはコンピューターに一連の動作を実行させるコード化プログラムをそこに記憶させている、非一時的なコンピューター可読記録媒体を包含する。コンピューターは、任意の汎用コンピューター、プロセッサ、埋め込まれたプロセッサ、モバイル装置、または他の計算装置を含んでもよい。コンピューターは、キーボード、マウス、タッチスクリーン、および他の入力手段のような入力装置を含む、ハードウェア要素を包含してもよい。コンピューターは、グラフィカル・ユーザー・インターフェース、ディスプレイ、および記憶装置を含む、データの出力、記憶、または表示のためのハードウェア要素を包含してもよい。

#### 【0074】

一つの態様において、本発明は、データおよび/またはコンピューターに一連の動作を実行させるコード化プログラムをそこに記憶させている、非一時的なコンピューター可読記録媒体を含み、ここでデータおよび/または一連の動作は、本発明の方法を実施するための、電気化学的感知システムの動作を引き起こす。様々な態様において、非一時的なコンピューター可読記録媒体は、以下のような動作を実施し得る：ステップさせた一連の電圧パルスを、配置された電気化学的センサーに送達するように、ポテンショスタットまたは同等の装置を制御すること；電圧パルスの送達の後続くセンサー電流出力を記録するように、データ収集装置を制御すること；センサー出力データから電流減衰の1つまたは複数の選択された測定を得る計算を行うように、プロセッサを制御すること；電流減衰の選択された測定を標的濃度に関連づける較正曲線を記憶すること；センサー出力および記憶させた較正曲線に基づいて標的濃度を計算するように、プロセッサを制御すること；本発明の方法の実施のための指示を記憶すること；ならびに本発明の他の動作。

#### 【0075】

一つの態様において、本発明の範囲は、本発明の動作を実施するようにプログラムされた装置、例えば前述の非一時的なコンピューター可読媒体を含むまたはそれと接続 (例えば、ネットワーク接続) している装置を包含する。

#### 【0076】

### キットおよびシステム

本発明の範囲は、本発明の分析物濃度測定を実施するために構成された、コンポーネントの集合体に及ぶ。様々な態様において、本発明の範囲は、本発明の方法の実施のための2つまたはそれ以上の部材を含む集合体を包含し、該2つまたはそれ以上のコンポーネントは、以下からなる群より選択される：選択された動作条件下でセンサーにより取得される減衰の測定と標的濃度との関係が公知であるクラスの、電気化学的センサー；センサーを選択された試料タイプに配置するためのセンサーハウジング；電気信号を送達して過渡電

10

20

30

40

50

流を生成し得る、ポテンショスタットおよびその制御器；データ取得およびコンピューター可読記憶媒体、ならびに/またはセンサーの電流データから電流減衰の選択された測定を計算するための処理手段；コンピューター可読記憶媒体、および/または電流減衰データから標的濃度を計算するための処理手段；ならびに本発明の方法を実施するための指示。

#### 【0077】

典型的な態様

一つの態様において、本発明は、電気化学的センサーの使用によって試料中の標的種の濃度を測定する方法であって、以下の工程を含む方法である：

試料に曝されるように電気化学的センサーを配置する工程であって、該電気化学的センサーの出力が、試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流である、該工程；

1つまたは複数の励起パルス将该電気化学的センサーに印加する工程であって、ファラデー電流出力が各パルスによって生成される、該工程；

該1つまたは複数の励起パルスのそれぞれに続いて、時間分解ファラデー電流データを取得する工程；

該取得された時間分解ファラデー電流データによって、電流減衰の選択された測定の値を計算する工程；

電流減衰の測定の該計算された値によって、電流減衰の選択された測定と試料中の該標的種の濃度との間の数学的関係の適用により、該標的種の濃度を計算する工程。

#### 【0078】

一つの態様において、電気化学的センサーは、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、ここで各認識要素は1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる。一つの態様において、認識要素はアプタマーを含む。

#### 【0079】

一つの態様において、試料は、全血、血清、唾液、尿、汗、間質液、脊髄液、脳脊髄液、組織滲出液、浸軟組織試料、細胞溶液、細胞内区画、水、洗浄水、廃水、地下水、食品、および飲料からなる群より選択される。一つの態様において、試料は測定前に処理されない。

#### 【0080】

一つの態様において、標的種は、小分子薬物、代謝産物、ホルモン、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、脂質、ホルモン、代謝産物、成長因子、神経伝達物質、栄養素、および汚染物質、病原体誘導因子もしくは病原体由来因子、病原体、または細胞からなる群より選択される。

#### 【0081】

一つの態様において、標的減衰の選択された測定は、減衰定数、平均寿命、半減期、および相対振幅から選択される。一つの態様において、電流減衰の選択された測定は、時間分解電流データの指数関数フィットから得られる。一つの態様において、電流減衰の選択された測定は、時間分解電流データの単一指数関数フィットから得られる。一つの態様において、電流減衰の選択された測定は、時間分解電流データの双指数関数フィットから得られる。

#### 【0082】

一つの態様において、電流減衰の選択された測定と標的濃度との間の数学的関係が、配置された電気化学的センサーと同じクラスのセンサーについて得られている。

#### 【0083】

一つの態様において、測定の前または後に較正工程は行われず。一つの態様において、長期間にわたって反復測定が達成される。

#### 【0084】

一つの態様において、電気化学的センサーはインピボで配置される。一つの態様において、電気化学的センサーはヒト対象において配置される。一つの態様において、電気化学

10

20

30

40

50

的センサーは非ヒト動物において配置される。一つの態様において、電気化学的センサーはエクスピボで配置される。一つの態様において、エクスピボでの配置はポイントオブケアシステムにおけるものである。

【0085】

一つの態様において、電気化学的センサーが試料中に配置される場合、センサーの出力が試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流であるように、電気化学的センサーは構成され；かつここでファラデー電流減衰の測定と標的濃度を関連づける安定した数学的関係が、該電気化学的センサーが属するクラスのセンサーに関して公知である。

【0086】

一つの態様において、電気化学的センサーは、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、ここで各認識要素は1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる。一つの態様において、前記クラスのセンサーは、同じ認識要素タイプ、同じ酸化還元レポータータイプ、および電極への結合に関する同じ付着性質を有するセンサーを含む。一つの態様において、認識要素はアプタマーを含む。

【0087】

一つの態様において、本発明は、以下を含む感知システムである：

電気化学的センサーが試料中に配置される場合、該センサーの出力が試料中の標的種の濃度に応じて濃度依存的様式で変わるファラデー電流であるように構成される、該電気化学的センサー；

該電気化学的センサーへの励起パルスの印加のための、および各パルスの該印加の後に続く、該電気化学的センサーからの時間分解ファラデー電流減衰の取得のための装置を含む、ハードウェア・コンポーネント；ならびに

本明細書に記載される方法の該電気化学的センサーおよびハードウェア・コンポーネントによる実施を可能にするデータおよびコンピュータープログラムをそこに記憶させた、非一時的なコンピューター可読媒体。

システムの一つの態様において、電気化学的センサーは、標的が結合すると構造変化を受ける複数の認識要素で機能的にされた電極を含み、ここで各認識要素は1つまたは複数の酸化還元レポーターで機能的にされる。一つの態様において、認識要素はアプタマーを含む。一つの態様において、電気化学的感知システムは、本明細書に開示される方法によって試料中の標的種の濃度を導き出すために、クロノアンペロメトリーによる電流減衰分析を行うようにプログラムされる。一つの態様において、感知システムのセンサー要素は動物の体内に移植され、無線または有線でエクスピボのハードウェア・コンポーネントと通信している。一つの態様において、電圧パルスの送達、時間分解電流データの収集、および標的濃度の計算のための、1つまたは複数の補助的なハードウェア要素が、センサーとともに移植される。一つの態様において、電源（例えば、バッテリー）に加えて、センサー、ならびに電圧パルスの送達のための要素および時間分解電流データの収集と解析のための要素を含む補助的要素が、動物の体内に移植される。一つの態様において、システムはさらに、本発明の方法によって検出中の標的種の閾値レベルに応じて動物に薬剤を投与するための薬物送達手段、または薬剤投与が必要であるというアラートを発するための手段を含む。一つの態様において、薬物送達手段はポンプである。一つの態様において、薬剤投与が必要であるというアラートを発するための手段は、移植されたセンサーシステムのコンポーネントと無線または有線で接続している、ウェアラブルまたはモバイル装置を含む。

【0088】

一つの態様において、本発明は、本明細書に開示されるシステムおよび方法によってクロノアンペロメトリーによる電流減衰分析を実施して試料中の標的種の濃度を導き出すようにクロノアンペロメトリック電気化学的感知システムを動作させるためのコンピューター可読指示を有する非一時的な記憶媒体を含む。

【実施例】

10

20

30

40

50

## 【0089】

## 実施例1

クロノアンペロメトリーによりインテロゲートされるE-ABセンサーを用いることによる、直接生体内における特定分子のリアルタイムのサブ秒分解測定

電気化学的なアプタマーベースのセンサーは、化学的反応性に関わらず、特定の分子標的の継続的なリアルタイムの測定のための、モジュール的手法を提供する。酸化還元活性のある「レポーター」で修飾され、かつインテロゲティング電極に付着したアプタマーの「プローブ」からなるプラットフォーム(図1A)は、レポーターからの電子移動を変更してその結果として容易に測定可能な電気化学的出力をもたらす、結合により誘導される構造変化を介して、信号を送る(図1B)。それらの信号伝達機構は、天然に存在する体内のレポーターにより使用される、構造に関連づけられた信号伝達を模倣するため、E-ABセンサーは非特異的結合に特に反応せず、かつ流れている無希釈の血清中で直接、継続的な長時間の測定を容易にサポートする。さらに、無希釈の全血中で試した場合、E-ABセンサーは有意なドリフトを示すことが多い一方、本開示の発明者らは、保護膜、改善された表面不動態化性質、および/または活性化ドリフト補正機構と組み合わせた場合、E-ABセンサーは全血中および生体内の本来の位置でさえ、数時間にわたって、特定分子の継続的なリアルタイムの測定をサポートすることを最近示した。

10

## 【0090】

アプタマーに結合した酸化還元レポーターの、電子移動動態の結合により誘導される変化によって、E-AB信号伝達が駆動される。以前はピーク電流の観察によりこの変化を「読み取る」ために、循環電流、交流、または矩形波ボルタンメトリーが用いられてきた。これらのうち最も一般的に使用される、矩形波ボルタンメトリー(SWV)は、センサーを一連の電位パルスに供し、結果として生じるファラデー電流を矩形波の周波数により規定される遅延の後にサンプリングすることによって、この変換を成し遂げる。それゆえに、観察される電流の大きさは、結果として標的の濃度に量的に依存する、電子移動速度(これは測定される時まで電流がどれほど減衰したかを規定する)に依存的である。具体的には、E-ABセンサーがSWVによりインテロゲートされる場合、結果として生じるピーク電流は、標的濃度の上昇とともに(矩形波の周波数に応じて)単調に上昇または低下する(図1B)。この結合により誘導される変化の相対的な大きさ(すなわち、信号利得)は、センサーにおいて使用されるアプタマーに依存的であり、矩形波の周波数および振幅を最適化することによって最大化され得る。

20

30

## 【0091】

SWVは、結合により誘導される電子移動動態の変化を容易に測定可能な出力に変換する、特に簡便かつ信頼性のある手段であることが判明しているが、該手法は制限がないわけではない。第一に、SWVにより産生されるピーク電流(アンペアで測定される)は、標的の有無だけでなく、製作上の差異のために装置ごとに変動し得る、センサー表面上の酸化還元レポーターで修飾されたアプタマーの数にも依存的である(図2A)。以前は、この差異は使用前に公知の(一般的にゼロの)標的濃度の参照試料において各装置を較正することにより対処され、これは効果的であるが(図2B)、複雑さを増大させる。第二に、SWVによりインテロゲートされるE-ABセンサーは、無希釈の血清中に直接配置するのに十分選択的であるが、それらは全血中にインビトロまたはインビボのどちらかで配置される場合、有意なドリフトを示し、これは以前は様々なドリフト補正およびドリフト回避機構を用いて克服された問題である。最後に、SWVの必要な数百ミリボルトの電位窓をスキャンするのに要する時間のために、その時間分解能は数秒に制限される。本明細書において実証されるのは、電子移動速度の変化を間接的に測定するボルタンメトリーを、それらを直接測定するクロノアンペロメトリーに置き換えることによって、これらの制限を克服して、生体内の本来の位置での特定分子の、較正不要なサブ秒分解測定を達成することである。

40

## 【0092】

## 結果および考察

電子移動速度の変化をピーク電流の変化に変換し、それゆえに移動動態について間接的

50

に報告するSWVとは異なって、クロノアンペロメトリーは電子移動動態を直接測定する。酸化還元レポーターが十分に酸化または還元される値への電極電位のステップに応じて生成される、過渡電流の寿命を割り出すことによって、クロノアンペロメトリーは前記の測定を行う。アミノグリコシド抗生物質に結合しているE-ABセンサーについて、十分な陰電位を適用して全てのメチレンブルーレポーターを完全に還元し、結果として生じる電流を測定した(図3)。2つの指数関数的プロセスの和として最適に説明される電流減衰のトレースが観察された。それらの標的の非存在下において、例えばこれらのセンサーは、 $100 \pm 30 \mu$ 秒の寿命を有する1つの速い対数期(本文書全体を通して、誤差は独立して製作された5個のセンサーからの標準偏差を表す)、および $6.5 \pm 0.5$ ミリ秒の寿命を有する、より遅い対数期を示す。より速い期は、この電位バイアスで電極表面上に形成される二重層の充電(すなわち、 $\mu$ 秒の時間尺度を有する水溶性イオンの移動)に起因し、依然として標的濃度の変化の影響を受けない。対照的に、より遅い期はロイコメチレンブルーへのメチレンブルーのファラデー還元に対応する。飽和標的濃度を加えると、第二期は $1.20 \pm 0.01$ ミリ秒の寿命を伴って速くなる。この、約5分の1への寿命の減少(標的を欠く試料と比較した場合)は、電極表面への酸化還元レポーターの近さの変化と一致し、標的のないアプタマーよりも速く電子を移動させる、標的に結合したアプタマーの総数をおそらく反映する。

#### 【0093】

理論上は、アミノグリコシド結合アプタマーの構造力学が二状態モデルに従う場合、対数期の相対振幅(結合および非結合アプタマーの総数を反映する)は標的濃度とともに単調に変化する。しかしながら、二状態モデルは2つの対数期を独立して測定できると仮定する。しかしここではそれは当てはまらない。なぜなら2つの対数期の寿命は任意の所与の標的濃度においてかなり類似しているために、十分な精度でそれらの振幅を抽出することが困難であるためである。つまり、ここで当てはまるように、アプタマーの結合状態と非結合状態の間の相互変換の動態が電子移動事象よりも急速である場合、構造平衡を別々の静的総数としてサンプリングすることはできない。代わりに、測定された寿命は結合および非結合状態の総数加重平均を反映する。この制限は、単一指数関数的フィットを用いて電流減衰寿命を見積もることにより、克服される(図4A)。

#### 【0094】

E-ABセンサーのクロノアンペロメトリーによる寿命とその標的の濃度との単調な関係は、E-AB測定を行うための較正不要な手法を提供する。つまり、センサー上のアプタマーの総数に依存する絶対的なSWVピーク電流と異なって、クロノアンペロメトリーによる減衰の寿命は、結合および非結合アプタマーの相対的総数にのみ依存する。それゆえに、所与のタイプのセンサーについて寿命-濃度関係が確立されると、それを用いて、個々のセンサーを較正する必要なく標的濃度を割り出すことができる。寿命-濃度は、流れている全血中でインビトロでトブラマイシンを検出するために使用される場合、アミノグリコシド検出E-ABセンサーのために確立された関係であった。具体的には、ラングミュア等温線への寿命対濃度の非線形回帰を行い(図4Bにおける赤線)、濃度について解析した。5個の新しいE-ABセンサー(すなわち、初期訓練セットにはないセンサー)のバッチを全血中でトブラマイシンを用いて試し、あらかじめ決められたラングミュア等温線を用いて、観察されたクロノアンペロメトリーによる寿命を推定濃度に変換した(図4C)。これは、 $1 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$ の範囲にわたって、10%よりも良好な精度および正確さで、薬物の濃度を首尾よく割り出した。

#### 【0095】

クロノアンペロメトリーにより割り出された電流減衰寿命の、標的濃度を規定する手段としての使用は、較正不要であることに加えて、ドリフトに耐性もある。さらに、SWVによりインテロゲートされるE-ABセンサーは、無希釈の血清中で上手く機能するのに十分選択的であるが、それらは流れている全血中で直接配置される場合、重大な基線ドリフトを示すことが多い(図5A)。これはこれまで、多周波で成される測定を伴う矩形波ボルタンメトリーの手法を用いて補正されてきた(図5A)。対照的に、クロノアンペロメトリーに

10

20

30

40

50

よる寿命測定は、本質的にそのようなドリフトに耐性があり；上記のように、過渡電流の全振幅は有意にドリフトするが（おそらく単層<sup>22</sup>の表面再編成により）、その指数関数的減衰の寿命はその振幅に依存せず、それゆえにほとんどドリフトがない（図5B）。

#### 【0096】

クロノアンペロメトリーによりインテロゲートされるE-ABセンサーのドリフト耐性は、生きた動物の血中での直接インサイチューの継続的なリアルタイムの測定をサポートするのに十分である。アミノグリコシド結合E-ABセンサーを直径75 $\mu$ mの金の微小ワイヤー上に製作し、構造的支持のために22ゲージのカテーテルに入れ、生きたラットの頸静脈中に直接配置した（図6A）。30mg/kgの静脈投与に続いて、計2時間継続的なクロノアンペロメトリー測定を行うことにより、抗生物質であるトブラマイシンの血漿薬物動態をモニターした（図6B）。わずか100ミリ秒の持続時間で各パルスを保ちながら、-0.1Vと-0.3Vの間で連続的にE-ABセンサーの電位をパルスすることにより、継続的な測定を達成した。次に、-0.3Vで生成された過渡電流の非線形回帰分析を行ってリアルタイムで電流減衰寿命を導き出し、これらの寿命をあらかじめ決められたラングミュア等温線を用いて濃度に変換した（図6C）。300ミリ秒の時間分解能（アプタマー-標的結合動態、データ取得および算定時間により制限される）で、クロノアンペロメトリー測定は、薬物注入の持続時間だけでなく、注入の終了後に薬物が血流中で「混ざり」、かつ均一になるのにかかる時間も解析する（図6C）。

10

#### 【0097】

クロノアンペロメトリーによりインテロゲートされるE-ABセンサーのサブ秒時間分解能での薬物動態の測定は、前例のない精度を有する。トブラマイシンの分配および排出、寿命は、インビボのデータを2区画薬物動態モデルにフィッティングさせることにより割り出した。クロノアンペロメトリーによりインテロゲートされるE-ABセンサーの300ミリ秒の時間分解能は、1000個を超える測定ポイントおよびフィットからの約1%の計算された標準誤差を伴う、薬物の分配期、 $t_{1/2} = 3.74 \pm 0.04$ 分の測定をサポートする。同様に、薬物の排出期は、フィットの標準誤差をわずか3%に下げつつ、14000個の測定ポイントを伴う $t_{1/2} = 69 \pm 2$ 分として測定され、この小さなずれの大部分はおそらく、実験過程の間の動物における代謝の変動により生じる（すなわち、 $t_{1/2}$ は正確には定数ではない）。この精度は、矩形波ボルタンメトリーを用いて達成される、以前のインビボE-AB測定に比べて1桁改善され、その結果、採血およびエクスピボ分析を用いる先の測定に比べて大きな改善となった。

20

30

#### 【0098】

本明細書において、クロノアンペロメトリーによるE-ABセンサーのインテロゲーションを用いて、直接インビボでの特定の小分子の較正不要なサブ秒分解測定を達成した。この手法の前例のない時間分解能は、薬物の取り込み、ホルモンおよび神経伝達物質の放出、ならびに中枢神経系内での薬物および代謝産物の動きのような、急速に変動する生理的事象に関する本発明者らの理解を向上させ得ることを示唆する。治療薬モニタリングから長期間にわたるフィードバック制御された薬物送達に及ぶ適用において、特定分子のリアルタイムの体内での較正不要な測定を実施できることにより、薬物を投与する効率および正確さを高めることもできるであろう。

40

#### 【0099】

E-ABセンサーは、分析物の検出に関して結合により誘導される電子移動動態の変化に依存するバイオセンサーの唯一のクラスではない。他の例には、液相酸化還元レポーターからの電子移動の変化、結合により誘導されるリガンドの置換に起因する電子移動の変化、レポーターの再編成エネルギーの変化、または足場に付着した酸化還元レポーターが下部の電極表面に接近する効率の立体的に誘導される変化を測定するセンサーが含まれる。この観点から、本発明者らは、クロノアンペロメトリーが電子移動動態を直接測定できることは、これらの他のプラットフォームのインテロゲーションにおいても価値があり得ると仮定する。

#### 【0100】

50

## 方法

E-ABセンサーを以下のように製作した：純金ワイヤー（長さ12cm）、白金ワイヤー（11.5cm）、および銀ワイヤー（11cm）の切片を切断してセンサーを作った。これらのワイヤーの両端の絶縁体を外科用ブレードを用いて約2cm除去し、電気接触を可能にした。これらを次に、60%錫/40%鉛松脂入りはんだ（直径0.8mm）を用いて、コネクタケーブルの3つの末端のうちの1つにそれぞれはんだ付けし、さらに各ワイヤーの端にある約5mmの小さな窓を除いて、ワイヤー本体を囲む収縮性の管材料に熱を加えることによって、それらを互いに付着させた。ワイヤーは層状様式で付着させ、まず金ワイヤーのみ、次に金ワイヤーと白金ワイヤーの両方を一緒に、最後に3つのワイヤー全てを一緒に絶縁した。この三層厚の絶縁の目的は、可鍛性のプローブ本体に機械的強度を与えることだった。ワイヤー間の電氣的短絡を防ぐため、上記のように各ワイヤーについて異なる長さを用いた。金ワイヤーにおけるセンサー窓（すなわち、絶縁体のない領域）を長さおよそ3mmに切断した。銀ワイヤーは、まず一晚漂白剤に浸して塩化銀フィルムを形成することにより、参照電極として使用した。金作用電極の表面積を増やすため（より大きなピーク電流を得るため）、センサー表面を0.5Mの硫酸に浸し、続いて16,000パルスの間、電位をAg/AgClに対して $E_{initial} = 0.0V$ から $E_{high} = 2.0V$ の間で行ったり来たりステップさせることにより、該表面を電気化学的に粗面化した。各電位ステップは「平穩時」のない20ミリ秒の持続時間であった。センサーを製作するため、1000倍モルの過剰なトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンを用いて、DNA構築物のアリコート室温で30分間還元した。新たに粗面化したプローブを次に脱イオン水でリンスしてから、PBS中で200nMの還元したDNA構築物の溶液中に、室温で1時間浸した。これに続いて、センサーを一晚、PBS中で20mMの6-メルカプト-1-ヘキサノール中に4で12時間浸して、残りの金表面をコートした。この後、センサーを脱イオン水でリンスして、PBS中で保存した。

10

20

## 【0101】

SWV測定のために、50mVの振幅、1~5mVの電位ステップサイズ、および10ヘルツから500ヘルツまでの変動周波数を用いて、センサーをAg/AgClに対して0.0Vから-0.5Vまでインテロゲートした。全てのSWV測定は、三電極機構を用いて、飽和KCl溶液で満たされた市販のAg/AgCl参照電極および白金対電極を用いるCH Instruments（商標）electrochemical workstation（Austin, TX, Model 660D）によって行った。クロノアンペロメトリーのために、センサーの電位を-0.1Vから-0.3Vまで連続的にステップさせ、各ステップは100ミリ秒の持続時間とした。電流のサンプリングは、インビトロ測定については10 $\mu$ 秒ごとに、インビボ測定については（実験ポイントおよび速度データ取得の数を減らすため）100 $\mu$ 秒ごとに行った。全てのクロノアンペロメトリー測定は上記の三電極E-ABセンサーを用いて行い、GAMRY（商標）Reference 600+ Potentiostat/Galvanostat/ZRA（Warminster, PA）により記録した。

30

## 【0102】

クロノアンペロメトリーの電流減衰の挙動を研究するため、アプタマーの親和性を測定するため、および信号利得を標的濃度に関連付けるため、まずは流れているPBS中で、次に流れているヘパリン化ウシ血液中で、対応する標的の濃度を上げながら、矩形波ボルタンメトリーまたはクロノアンペロメトリーのどちらかによりセンサーはインテロゲートされた。これらの実験は、静脈中で見られる血液輸送のタイプを模倣するよう意図された、閉鎖流動システムにおいて行った。血流は磁気歯車ポンプを用いて達成され、流速を流量計によって測定される毎分1~10mLに設定した。結合曲線（標的によるアプタマーのタイトレーション）を作成するため、トブラマイシンの原液をPBS緩衝液または血液中でそれぞれ測定直前に調製した。較正不要な動きを実証するためのセンサーの挑戦は、トブラマイシン標準品から作製した原液に対して、アミノグリコシド結合E-ABセンサーの新しいバッチを試すことによって行った。

40

## 【0103】

インビボ測定は、注入のためにシラスティックカテーテルを挿入したが、または測定のためにE-ABセンサーを頸静脈に置いた、麻酔下のラットにおいて行った。参照電極が上記

50

のように塩化銀フィルムでコートされた銀ワイヤーであり、対電極が白金ワイヤーである三電極機構を用いて、全てのインピボ測定を行った。300ミリ秒ごとに1ポイントのサンプリング速度で、3時間まで記録を取った。本発明者らのリアルタイムデータから薬物動態プロファイルを得るため、静脈注射をフィッティングするために2区画モデルを用いて、非線形回帰分析を行った。回帰において使用された式は以下であった：

$$C_p = Ae^{-t/\alpha} - Be^{-t/\beta}$$

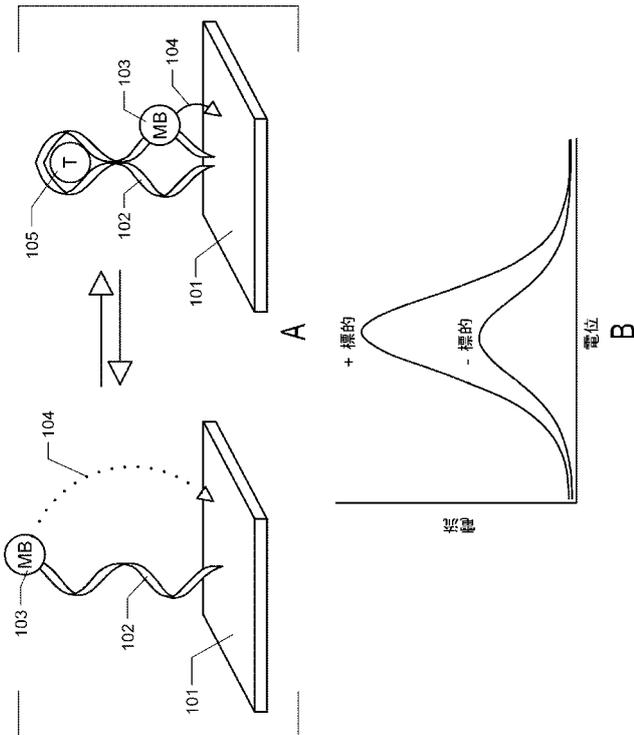
式中、 $C_p$ は測定された血漿濃度であり、AおよびBは最大濃度 $A + B = C_{MAX}$ への各薬物動態区画の寄与であり、 $\alpha$ は薬物分配の一次時定数であり、 $\beta$ は薬物の排出時定数である。回帰分析の間、二乗誤差を最小限にすることにより最良フィットを割り出すように、全ての変数は流動的であった。

10

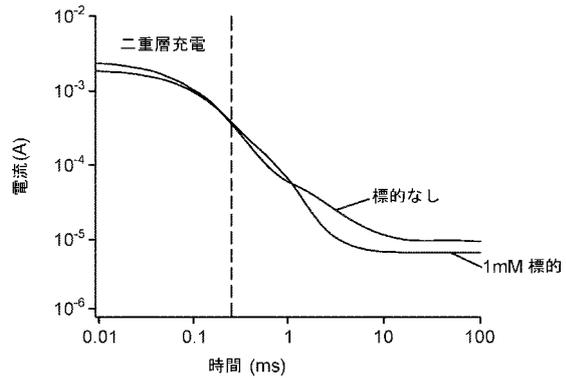
【0104】

この明細書で引用される全ての特許、特許出願、および刊行物は、各独立した特許出願、または刊行物が、参照により組み入れられるように具体的かつ個別に示された場合と同じ程度に、参照として本明細書に組み入れられる。開示される態様は、限定ではなく例証のために提示される。本発明はその記載された態様に関して説明されたが、全体として本発明の意図および範囲から逸れることなく、本発明の構造および要素に変更を加えることができることが、当業者に理解される。

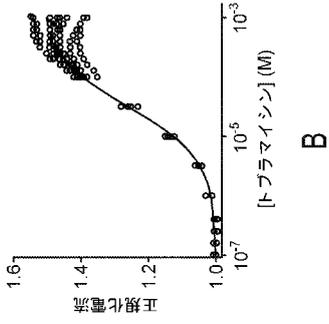
【図1】



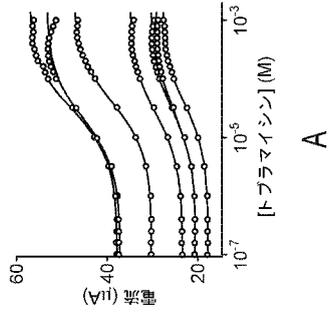
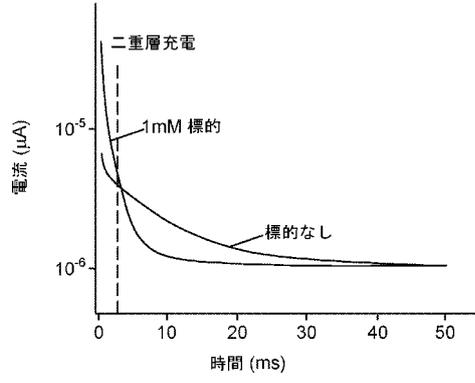
【図2】



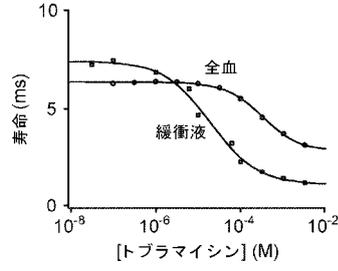
【図3】



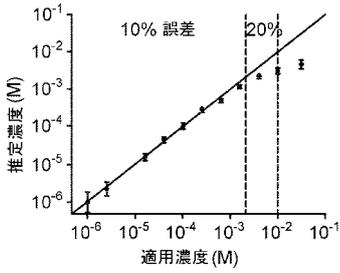
【図4A】



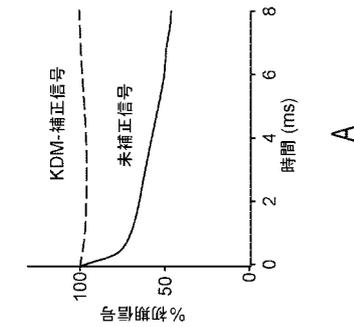
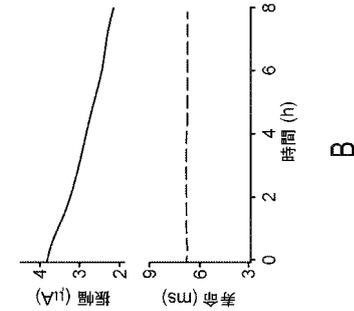
【図4B】



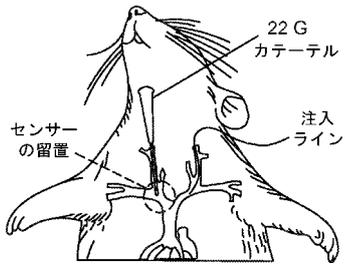
【図4C】



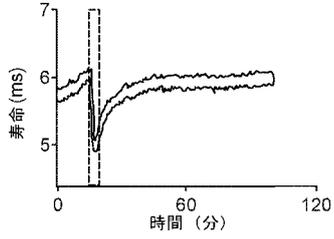
【図5】



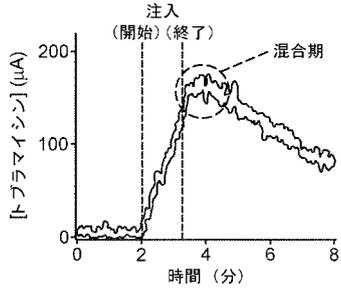
【図 6 A】



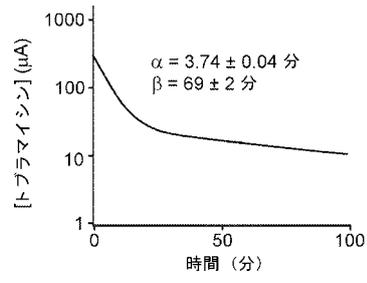
【図 6 B】



【図 6 C】



【図 6 D】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2018/058020</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61B 5/04(2006.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, A61B 5/00(2006.01)i		
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) A61B 5/04; A61B 5/145; A61B 5/15; G01N 27/12; G01N 27/327; G01N 27/403; G01N 27/407; G01N 27/416; G01N 33/543; A61B 5/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: concentration, electrochemical, sensor, faradic, current, pulse, decay, calculate		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015-0276650 A1 (BROADMASTER BIOTECH CORP.) 01 October 2015 See the whole document.	1-26
A	US 2016-0166186 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 16 June 2016 See the whole document.	1-26
A	US 2012-0123690 A1 (WANG et al.) 17 May 2012 See the whole document.	1-26
A	US 2015-0377821 A1 (ANAXSYS TECHNOLOGY LIMITED) 31 December 2015 See the whole document.	1-26
A	US 2015-0126391 A1 (GENMARK DIAGNOSTICS INC.) 07 May 2015 See the whole document.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 March 2019 (08.03.2019)		Date of mailing of the international search report <b>11 March 2019 (11.03.2019)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Kim, Yeonkyung  Telephone No. +82-42-481-3325

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2018/058020**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015-0276650 A1	01/10/2015	None	
US 2016-0166186 A1	16/06/2016	WO 2014-143427 A1	18/09/2014
US 2012-0123690 A1	17/05/2012	CA 2633326 A1 CA 2633326 C CA 2882514 A1 DK 1968448 T3 EP 1968448 A2 EP 1968448 B1 EP 2442101 A1 JP 2009-521999 A US 2007-0163894 A1 US 2010-0324853 A1 US 2012-0310063 A1 US 7774038 B2 US 8249683 B2 US 9125607 B2 US 9125608 B2 WO 2007-079025 A2 WO 2007-079025 A3	12/07/2007 12/05/2015 12/07/2007 21/01/2013 17/09/2008 03/10/2012 18/04/2012 11/06/2009 19/07/2007 23/12/2010 06/12/2012 10/08/2010 21/08/2012 08/09/2015 08/09/2015 12/07/2007 02/05/2008
US 2015-0377821 A1	31/12/2015	AU 2007-274795 A1 AU 2014-200951 A1 CA 2693175 A1 CN 101511266 A CN 101511266 B EP 2043518 A1 EP 2548505 A1 EP 2710955 A1 GB 2440556 A GB 2440556 B HK 1135006 A1 JP 2009-544936 A JP 2013-117546 A JP 2015-028491 A US 2010-0050735 A1 WO 2008-009980 A1	24/01/2008 13/03/2014 24/01/2008 19/08/2009 11/01/2012 08/04/2009 23/01/2013 26/03/2014 06/02/2008 10/06/2009 09/11/2012 17/12/2009 13/06/2013 12/02/2015 04/03/2010 24/01/2008
US 2015-0126391 A1	07/05/2015	AU 1999-62550 A1 AU 1999-62550 B2 AU 2004-201157 A1 AU 6255099 A AU 768546 B2 CA 2341379 A1 EP 1114317 A2 EP 1114317 B1 JP 2002-525577 A JP 4530541 B2	03/04/2000 18/12/2003 22/04/2004 03/04/2000 18/12/2003 23/03/2000 11/07/2001 14/12/2016 13/08/2002 25/08/2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2018/058020**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2004-0146909 A1	29/07/2004
		US 6740518 B1	25/05/2004
		US 9874542 B2	23/01/2018
		WO 00-16089 A2	23/03/2000
		WO 00-16089 A3	17/08/2000

## フロントページの続き

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

(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ブラックスコ ケビン  
アメリカ合衆国 93106 カリフォルニア州 サンタバーバラ メール コード 9510  
ケミストリー 1103 ユニバーシティ オブ カリフォルニア

(72) 発明者 アロヨ クラス ネサワルコヨトル  
アメリカ合衆国 93106 カリフォルニア州 サンタバーバラ メール コード 9510  
ケミストリー 1103 ユニバーシティ オブ カリフォルニア

Fターム(参考) 4C038 KL02 KL09 KX01

