



## (12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103069270 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201180040585. 4

(22) 申请日 2011. 06. 22

(30) 优先权数据

12/820, 830 2010. 06. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 02. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/041379 2011. 06. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/163320 EN 2011. 12. 29

(71) 申请人 药物代谢动力公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 叶赫沙·沙查尔

托马斯·陈

温斯顿·吴

布雷特·乔丹

海尔文·陈

帕拉丁·卢波夫

凯尔·齐默曼

(72) 发明人 叶赫沙·沙查尔 托马斯·陈

温斯顿·吴 布雷特·乔丹

海尔文·陈 帕拉丁·卢波夫

凯尔·齐默曼

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

权利要求书4页 说明书18页 附图13页

### (54) 发明名称

通过使用半抗体生物传感器形成稳态环用于检测和调节血管内皮生长因子(VEGF)的方法和装置

### (57) 摘要

用于检测血管内皮生长因子(VEGF)杂交的生物传感器使用并联电容器的阵列来检测循环的VEGF与固定的VEGF单克隆半抗体( $\alpha$ -VEGF mhAb)的电化学结合。结合 $\alpha$ -VEGF mhAb可调节电路的阈值电压,从而改变所述电路的阻抗。涂敷有p-Si底物的电极可增强所述VEGF分子之间的亲和力。流体单元送递VEGF样品到所述芯片的活性表面上。以互相交叉模式排列的并联电容器的阵列可检测所述流体中的VEGF。所述检测器提供精确测量的和可计量速率的体内VEGF分子的变化,提供用于测量所述肿瘤对送递的化学治疗剂和生物反应调节剂(BRM)的反应的实时反馈,目的是确定肿瘤负荷和化学治疗的效力,作为治疗的稳态环的一部分。

1. 一种 VEGF 单克隆半抗体 (a-VEGF mhAb) 探针复合体, 其在检测器中用于检测靶 VEGF 分子的存在, 所述探针复合体包括:

所述检测器中的电极; 和

所述电极上的 a-VEGF mhAb, 其能够结合到指示物 VEGF 蛋白并且能够固定所述指示物 VEGF 蛋白, 使得可通过所述检测器检测靶 VEGF 分子。

2. 要求 1 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述 a-VEGF mhAb 能够高度特异性地结合到 VEGF 蛋白, 并且还包括偶联到所述电极的电路, 以通过向所述电极施加电流来选择性地释放与所述 VEGF 蛋白的结合, 从而使得所述探针复合体可重复使用。

3. 权利要求 1 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述 a-VEGF mhAb 可高度特异性地结合到 VEGF 蛋白, 并且还包括流体性线路, 以通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述结合。

4. 权利要求 2 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述 a-VEGF mhAb 可高度特异性地结合到 VEGF 蛋白, 并且还包括流体性线路, 以通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述结合。

5. 权利要求 4 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其与流体源组合, 其中所述流体性线路通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述结合, 所述流体性线路包括压电泵, 所述压电泵具有流体性地偶联到所述流体源的输入和流体性地偶联到所述电极的输出, 所述压电泵和电极被排列和配置以使得可通过所述压电泵提供的流体流来流体性冲洗所述电极。

6. 权利要求 1 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述 a-VEGF mhAb 由化学分裂的 **Avastin®** 组成。

7. 权利要求 1 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述 a-VEGF mhAb 由化学分裂的人源化单克隆抗体 VEGF (rhMab VEGF; 贝伐单抗) 组成。

8. 权利要求 1 的 a-VEGF mhAb 探针复合体, 其中所述检测器包括硅底物, 并且还包括由附着到马来酰亚胺封端的自组装单层 (m-SAM) 的 a-VEGF mhAb 组成的连接体, 所述 m-SAM 通过以氨基硅烷化而键合到所述硅底物。

9. 一种靶的传感器阵列, 其包括:

底物;

多个绝缘的微机械电容器, 其至少一部分上放置所述底物, 所述电容器以互相交叉模式排列;

附着到所述多个电容器的识别基团, 所述识别基团特异性地结合到所述靶;

检测器电路, 用于传感所述多个电容器; 和

用于再配置所述识别基团以使得所述传感器阵列可重复使用的装置。

10. 权利要求 9 的传感器阵列, 其中所述多个电容器中的至少一个具有多个基面, 所述多个基面的每一个具有附着到所述基面的识别基团, 并且还包括偶联到所述多个基面的电路, 以通过向所述多个电容器施加电流以选择性地释放与所述靶的结合并从而使得所述传感器阵列可重复使用。

11. 权利要求 9 的传感器阵列, 还包括流体性线路以通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述识别基团的结合。

12. 权利要求 11 的传感器阵列,还包括流体性线路以通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述识别基团的结合。

13. 权利要求 12 的传感器阵列,其与流体源组合,并且其中所述流体性线路通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述识别基团的结合,所述流体性线路包括压电泵,所述压电泵具有流体性地偶联到所述流体源的输入和流体性地偶联到所述多个电容器的输出,所述压电泵和所述多个电容器被排列和配置以使得可通过所述压电泵提供的流体流来流体性冲洗所述电极。

14. 权利要求 9 的传感器阵列,其中所述识别基团由化学分裂的**Avastin®**组成。

15. 权利要求 9 的传感器阵列,其中所述识别基团由化学分裂的人源化单克隆抗体 VEGF (rhuMab VEGF; 贝伐单抗)组成。

16. 权利要求 9 的传感器阵列,其中所述识别基团包括 a-VEGF mhAb,所述 a-VEGF mhAb 能够结合到指示物 VEGF 蛋白并且能够将所述指示物 VEGF 蛋白固定到所述电容器以使得可通过所述检测器检测靶 VEGF 分子。

17. 权利要求 9 的传感器阵列,还包括偶联到所述传感器阵列的微控制器,其中所述多个电容器的至少一个具有结合到所述靶的识别基团,并且所述检测器检测至少一个电容器上所述靶的存在并将对所述靶的检测与所述微控制器通信。

18. 权利要求 16 的传感器阵列,还包括置于至少一个电容器的至少一部分上的连接体,以将 a-VEGF mhAb 固定在所述至少一个电容器上。

19. 权利要求 18 的传感器阵列,其中所述连接体包括琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯和杂交物质(3-氨基丙基-三甲氧基硅烷)。

20. 一个用于检测流体中 a-VEGF mhAb 的靶的系统,其包括:

传感器,所述传感器包括:

底物;

密封的微机械网孔电容器阵列,在所述阵列的至少一部分上放置所述底物;

附着到所述底物的识别基团,所述识别基团选择性地结合到所述 a-VEGF mhAb 的靶;

和

检测器,用于通过所述识别基团检测所述 a-VEGF mhAb 的靶的结合;

送递系统,用于将用于分析的流体送递到所述传感器;和

用于再配置所述识别基团的装置,以使得选择性释放所述靶以使得所述传感器阵列可重复使用。

21. 权利要求 20 的系统,其中所述送递系统包括输入端口、连接到所述输入端口用于所述流体的容器、以及连接到所述容器的输出端口,所述底物的至少一部分暴露于所述容器中的流体。

22. 权利要求 20 的系统,其中所述电容器阵列具有预先确定的电容,所述电容被选择以使靶结合所述电容器阵列最大量的功能化表面面积,并且其中所述送递系统的尺寸和结构被排列和配置为所述预先确定的电容的函数以提供穿过所述传感器的无限制流体流动。

23. 权利要求 20 的系统,其中所述用于再配置所述识别基团以选择性释放所述靶以使得所述传感器阵列可重复使用的装置,包括偶联到所述多个基面的电路,以通过施加到所述电容器阵列的电流来选择性地释放与所述靶的结合并从而使得所述传感器阵列可重复

使用,或者包括流体性线路,以通过使用所述流体性线路提供的流体流来选择性地释放所述结合。

24. 一种体内实时检测患者流体中 VEGF 的方法,包括:

化学分裂人源化单克隆抗体 VEGF (rhuMab VEGF; 贝伐单抗);

将所述分裂的人源化单克隆抗体 VEGF 附着到传感器中的电容器表面;

使所述传感器暴露于待分析的包含 VEGF 的流体,所述分析使用分裂的人源化单克隆抗体 VEGF;

通过使所述 VEGF 结合到所述分裂的人源化单克隆抗体 VEGF,将所述 VEGF 结合到所述传感器内的测量表面,以形成作为分析物分子的配体杂交的靶 VEGF ;和

检测所述分析物分子以测量所述杂交的靶 VEGF ;和

从所述传感器产生可指示所测量的杂交靶 VEGF 的输出。

25. 权利要求 24 的方法,其中化学分裂人源化单克隆抗体 VEGF(rhuMab VEGF; 贝伐单抗)包括化学分裂 **Avastin®**。

26. 权利要求 24 的方法,其中检测所述分析物分子包括,通过传感器阻抗大小的变化或者传感器阻抗改变的时间速率检测所述传感器的电容值变化。

27. 权利要求 24 的方法,其中化学分裂人源化单克隆抗体 VEGF(rhuMab VEGF; 贝伐单抗)包括通过使用三(2-羧乙基)膦(TCEP)作为还原剂以选择性地切割连接 mAb 的两条重链的二硫键以产生两个 VEGF 半抗体(mhAb)而将 VEGF 单克隆抗体( $\alpha$ -VEGF mAb)分裂为两个半抗体。

28. 权利要求 24 的方法,还包括依据患者体液中 VEGF 的实时体内检测来提供至少一种医疗剂的有指导的治疗介入。

29. 一种对表面进行表面修饰方法,包括:

使所述表面水合以形成氢氧化物表面;

使用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷溶液在所述表面上合成马来酰亚胺封端的 SAM 以形成  $-NH_2$  封端的 SAM ;和

将所述  $-NH_2$  封端的 SAM 与琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)溶液孵育,并洗去未反应的化合物以形成具有马来酰亚胺封端的功能性表面基团的 SAM。

30. 权利要求 29 的方法,其中使所述表面水合以形成氢氧化物表面包括使所述表面水合以形成氢氧化硅(SiOH)表面。

31. 权利要求 30 的方法,其中使用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷溶液在所述表面上合成马来酰亚胺封端的 SAM 以形成  $-NH_2$  封端的 SAM 包括,使用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液在所述 SiOH 表面上合成马来酰亚胺封端的 SAM 以形成  $-NH_2$  封端的 SAM,所述  $-NH_2$  封端的 SAM 能够容易地与活化的羧酸反应,用于进一步修饰所述表面。

32. 权利要求 30 的方法,其中将  $-NH_2$  封端的 SAM 与琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)溶液孵育,并洗去未反应的化合物以形成具有马来酰亚胺封端的功能性表面基团的 SAM 包括,将  $-NH_2$  封端的 SAM 与琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)的二甲基亚砜(DMSO)溶液孵育,并用蒸馏水洗去未反应的化合物以形成具有马来酰亚胺封端的功能性表面基团的 SAM,其中马来酰亚胺封端的

SAM 能够与具有一个或多个游离巯基官能团的生物分子——例如蛋白质、肽、半抗体和其他抗体片段——自发地反应,并因而将所述生物分子固定到所述表面上。

33. 权利要求 29 的方法,还包括用蒸馏水洗涤所述水合的 SAM,在持续的氮气流中干燥所述洗涤的 SAM,并在约  $-20^{\circ}\text{C}$  储存所述干燥的 SAM。

34. 权利要求 33 的方法,还包括用 MeOH/HCl (1/1) 在室温清洁所述储存的 SAM,用超纯水冲洗所述清洁的 SAM,以氩干燥所冲洗的 SAM,通过以 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTES) 在气相或液相中硅烷化来以  $\text{NH}_2$  基团修饰所述 SAM。

35. 权利要求 29 的方法,其中使所述表面水合以形成氢氧化硅( $\text{SiOH}$ ) 表面,包括用 piranha 溶液( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$  (v/v)) 处理所述表面;  
用蒸馏水冲洗所述处理的表面以清洁所述表面;  
将所述表面浸入 50% 乙醇溶液( $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}=50:50$  (v/v)) 以使所述表面水合;  
再次用 piranha 溶液处理所述表面一段时间;和  
用蒸馏水洗涤所述处理的表面。

36. 权利要求 29 的方法,其中在所述  $\text{SiOH}$  表面上合成马来酰亚胺封端的 SAM 包括,通过浸渍过程以 3-氨基丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液处理所述  $\text{SiOH}$  表面。

37. 一种方法,包括将半抗体固定到底物表面上,在所述底物表面上捕获抗原,和电化学地检测所述捕获的抗原。

38. 一种方法,包括在底物上制造固定的半抗体的自组装单层,和电化学地检测置于所述底物上的流体中的抗原,所述底物具有固定的半抗体的自组装单层。

## 通过使用半抗体生物传感器形成稳态环用于检测和调节血管内皮生长因子(VEGF)的方法和装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学生物传感器,或者更具体地涉及固定并联板化学生物传感器和电容阵列,以及使用固定的单克隆半抗体制造它们的方法。

### 背景技术

[0002] 在正常生理发育中,VEGF 是胚胎发生(血管生成(vasculogenesis))和成体血管形成(血管发生(angiogenesis))中血管发育的关键调节物。VEGF 和 VEGF-受体蛋白家族的成员具有不同、但重叠的配体-受体特异性、细胞类型表达和功能。VEGF-受体活化反过来又可调节身体中促进内皮细胞生长、迁移和存活信号传递过程网络。VEGF 还在发生于多种疾病(包括癌症)的病理性血管发生中起关键作用。VEGF 和 Flk-1/KDR RTK 已被认为是病理性血管发生(包括肿瘤新血管形成)所需的内皮细胞-特异性因子信号传递通路。在肿瘤发展中,激活 VEGF 通路可促进肿瘤血管形成、加速肿瘤生长和转移。异常 VEGF 功能还与包括动脉粥样硬化、银屑病、年龄相关性黄斑变性、糖尿病失明、类风湿性关节炎和甲状腺功能亢进的其他疾病相关。

[0003] 对血管发生的生物学理解的进展已经导致开发了数种治疗形式,用于抑制 VEGF 酪氨酸激酶信号传递通路。在正在生长的肿瘤中,抑制 VEGF 酪氨酸激酶信号传递通路可阻断新血管形成,导致肿瘤生长停滞或消退。人肿瘤的生长和转移的发生依赖于血管的重新形成,以实现低氧肿瘤微环境并向其提供养分。新血管形成受到靶向受体酪氨酸激酶(RTK)的特异性生长因子的严格调控。通过使用人源化单克隆抗体贝伐单抗(bevacizumab) (**Avastin®**, Genentech/Roche) 以及靶向 VEGF 受体(VEGF-R)酪氨酸激酶的两种激酶抑制剂索拉非尼(sorafenib, Nexavar; Bayer) 和舒尼替尼(sunitinib, Sutent, Pfizer) 阻断 VEGF 的初步努力开始在人癌症患者中显示出希望,这凸显了优化 VEGF 阻断对神经系统癌症的重要性。许多的这些形式正在临床研究中被调查以评价它们治疗多种形式的人癌症的可能性,但这类研究的能力受限于这样的事实,即不容易进行 VEGF 水平和 VEGF 转导趋向的局部实时体内测量。

[0004] 已知可连续监测其周围环境以提供背景统计并对不健康状态提出警示的生物传感器被用于医学技术中。在本申请中,寻求微量溶液以使所述生物传感器的成本和影响最小,并使其使用寿命最大。在治疗持续期间由于监控肿瘤生长和消除过程的内在需求,使用一次性使用的生物传感器具有局限性。

[0005] 现有技术对“生物传感器”主题的讨论是广泛和深远的。有许多生物传感器的实例(例如重量分析生物传感器(gravimetric biosensor))。检测基础是当各种分析物连接至共振元件时发生的共振器共振频率降低。生物分析物的分析物特异性是通过用配体功能化(处理)所述共振器的暴露表面而被赋予的,所述配体可识别并结合所述靶分析物。靶生物分析物的合适结合实例包括抗体、受体、凝集素、适体和寡核苷酸。

[0006] 现有技术中存在的一种类型的生物传感器是重量分析生物传感器,其中固定的结

合基团位于膜表面上的一个或多个区域。所述固定的结合基团的位置、大小、区域和固定密度被设计为,使观察到的由所述靶分析物结合引起的所述膜频率和 / 或幅度的改变最大化。这继而使通过随后基于特异性和非特异性结合的所有组合的所述膜频率和 / 或幅度改变而可观察到的区别最大化。该区别可以采取三种形式:(a) 所述膜共振频率的变化,(b) 较高阶谐振的出现或消失,或者(c) 振幅衰变率的变化。在这类生物传感器中,单个的膜可以由多个用于驱动和用于传感目的的可单独寻址元件组成。这使得可特异性激活所选择的较高阶振动模式并且能够同时振动驱动警报电路或类似装置。声波分析——其可用于重量分析传感器——的原理是公知的,其在文献中已经出现十年以上。

[0007] 分子相互作用可以通过生物大分子的极化率而用电子方法检测,通过使用荧光标签而用光学方法检测,通过使用放射性标记的标签而用放射测量法检测,或者用声学方法检测。最近,基于 MEMS 的传感器已被纳入生物技术和生物医学领域。声学传感器的应用包括细胞检测、葡萄糖生物传感、抗体-抗原识别和蛋白质吸附检测。

[0008] 20 世纪 50 年代后期以来,压电石英晶体微天平(QCM)已经被用于检测气相和液相分析物。QCM 技术在最近被应用于生物分析物。QCM 已被用于跟踪蛋白质对未修饰的和修饰的石英晶体表面电极的非特异性吸附。将抗体固定于所述晶体表面可赋予分析物以特异性。

[0009] 需要一种装置,其具有的结构可用于构建用于无标记检测 VEGF 杂交的固态生物传感器。

## 发明内容

[0010] 提供如下本发明所列举的实施方案概要以帮助理解本发明特有的一些创新特征,但不是意欲进行全面描述。可以通过将整个说明书、权利要求书、附图和摘要作为一个整体而获得对本发明各个方面的全面了解。对本领域普通技术人员来说,一旦阅读本说明书,本发明的其他目标和优点就会明显。

[0011] 本发明列举的实施方案的内容涉及通过使用固态制造技术的集成平台连同与被称为人源化单克隆抗体的蛋白元件(被选择用于以高亲和性力结合特定特异性靶蛋白靶标)的集成平台构建的生物传感器。具体地,从转移区域取得的肿瘤流体中发现的 VEGF 分子和固定的  $\alpha$ -VEGF mAb 之间的杂交改变了传感器电极的电化学性质,这种改变可通过所述装置的电路来检测。本发明列举的实施方案的目标是通过测量 VEGF 分子与所述电容器极板的结合率而将肿瘤发生的生长速率与所述肿瘤流体中的 VEGF 水平相关联,并用所述 VEGF 感应的向量 / 趋势计划所述化学疗法的过程。所述电容器极板以互相交叉模式(interdigitated pattern)排列以使给定传感器体积的检测表面积最大化。

[0012] 可精确提供对 VEGF 水平的实时反馈的植入体内装置对于任何精细调节的抗血管发生治疗是至关重要的,使得系统可被逻辑地调节,并减少或改变抗血管发生试剂的摄入。本发明列举的实施方案通过在已知时间范围内模拟 VEGF 结合到 VEGF 单克隆抗体的过程来测量 VEGF 水平,并提供适合的 VEGF 水平反馈,用于受调节的药物和化学疗法反馈回路。

[0013] 呈现了所提出的 VEGF 检测器的制造,使用了技术和设备中所取得的显著改进用于制造微型装置,并因此概述了微机械设备的的使用。硅制造和高精机械的改进开辟了用于研究和开发应用的现称为微电子机械系统(MEMS)的领域。随后开发的微型阀、泵、槽和热

交换器使得可操作极其小的流体体积。与集成电路(IC)和 MEMS 领域中改善的大规模制造技术相结合,微流体和微化学系统被应用于实现本发明列举的实施方案。

[0014] 本发明列举的实施方案包括具有可在单个流体样品上操作的多个装置的协同且可变通的传感器系统。所述装置可以借助板载处理逻辑块进行全自动化学分析。

[0015] 所述列举的实施方案包括一种具有如下结构的装置,所述结构可用于构建用于无标记检测 VEGF 杂交的固态生物传感器。这个装置是通过以下方式实现:形成以互相交叉模式排列的并联电容器的矩阵阵列,以达到对于最小电化学变化的高比值信号,并伴随电等值,从而可实现低成本、便携、完全集成的装置。

[0016] 用于检测兴趣分子存在的生物传感器可应用于多个领域,包括医学诊断、生物医学研究以及生物和化学战争中所用试剂的检测。存在对具有高敏感性的廉价、袖珍传感器的需求,所述传感器用于实时地在体内、无标记环境中检测 VEGF 分子,目的是报告状态例如浓度水平的趋势,并进一步使得可以形成闭合反馈回路以使用药物有效地调节(减弱、改变)所述生物活性。

[0017] 一般而言,生物靶复合体由可通过催化表面增强底物(例如单克隆抗体)形成的种子物质加上标签。然后,所述靶复合体可以结合至包括有 VEGF 标记物的捕获剂。然后,通过还原固定的捕获分子例如 VEGF 单克隆半抗体( $\alpha$ -VEGF mhAb)而在所述种子物质上生成所述底物。

[0018] 因此,在一个实施方案中,提供了一种生物靶复合体,其包括与第一特异性结合成员缔合的靶分析物。所述靶复合体进一步包括与所述第一特异性结合成员结合形成靶复合体的第二特异性结合成员。所述第二特异性结合成员包括适用于催化表面增强的  $\alpha$ -VEGF mhAb 底物形成的种子颗粒(seed particle)。在另一个实施方案中,适于结合任何已知的癌症标志物的任何种子颗粒都可使用本公开的方法被附着到所述靶复合体上。随后,所述复合体底物可以借助所述电子电路而活化,以提供所必需的阻抗效应变化。这些重要目标和其他重要目标根据如下对本发明的描述将变得明显。

[0019] 本发明的一个实施方案的目的是提供流体电池,所述流体电池被配置以使 VEGF 样品可在芯片的活性表面流动。流体流过所述传感器的速率是受控制的,使得可以实现 VEGF 分子在所述流体中与所述固定的  $\alpha$ -VEGF mhAb 的杂交和去杂交。详细计算所述杂交能量是去杂交并洗去所述 VEGF 分子以使所述传感器可重复用于进一步检测的计划的一部分。

[0020] 所述装置还需要通过使用基于适于结合 VEGF 单克隆抗体的电化学结合机制来检测所述 VEGF 分子的存在。当血液或肿瘤流体流过所述生物传感器时,漂浮的 VEGF 抗原将被所述表面固定的 VEGF 半抗体捕获,其中所述半抗体的抗原结合位点(称为 Fab)特异性结合到所述抗原的表位位点。所述结合是由下述力的组合驱动和决定的:静电键、氢键、范德华力、疏水力和芳香  $\pi$  键。

[0021] 在具体的进一步开发中,本发明中至少一个实施方案的方法有利地利用电化学检测的方法,特别是将氧化还原循环与单克隆抗体标记物结合以产生半抗体。连接  $\alpha$ -VEGF mhAb 的两条重链的二硫键可被选择性地切割以产生两个  $\alpha$ -VEGF mhAb,所述  $\alpha$ -VEGF mhAb 具有完整的结合位点和反应性巯基并可以以位点特异的方式共轭结合到 VEGF。

[0022] 由单个 VEGF mhAb 产生两个半抗体的目的是降低所述固定的  $\alpha$ -VEGF mhAb 的 Fab

和 VEGF 之间的结合亲和力水平。该结合亲和力水平小于报道的 VEGF 与 a-VEGF mAb 键之间的结合亲和力水平 ( $K_d=3.4 \pm 0.9 \text{ nM}$ )。

[0023] 本发明进一步的目的是利用 a-VEGF mhAb 半抗体分子, 因为 a-VEGF mhAb 和 VEGF 结合亲和力低于所述生物传感器表面形成中所产生的所有其他键的结合亲和力。因为 a-VEGF mhAb 和 VEGF 之间的键的亲和力具有高特异性但是其亲和力弱于本发明中呈现的其他键, 所以所述 VEGF 分子可从它们与 a-VEGF mhAb 分子的键“释放”以使得所述生物传感器表面可被重复使用多次。该“释放”是通过在所述生物传感器板上引入小的电流以提供能源, 并通过本发明公开的压电微流体泵产生的流体流而产生的。

[0024] 另一项开发是制备具有马来酰亚胺封端的自组装单层 (SAM) 的硅表面, 使得所述 a-VEGF mhAb 可直接结合到该表面并且以方向特异的方式固定到所述  $\text{SiO}_2$  表面。该化学反应将保持所述 a-VEGF mhAb 的抗原结合位点朝向外外部。所述 a-VEGF mhAb 在所述底物上的涂敷密度将通过制备过程中 hAb 的浓度确定。

[0025] 本发明的一个实施方案的目的是产生具有电极性的传感器, 目的是自然地吸引 VEGF 分子本身带的负电荷, 同时进一步调整所述电路的阈电压。所述新的传感器应该用优选涂敷有 p-Si 底物的绝缘电极构建, 以帮助将所述 VEGF 分子带到所述电极的表面并增强所述 VEGF 分子和抗体之间的亲和力。本发明的另一个目的是能够反转所述电极性, 目的是从所述固定的 a-VEGF mhAb 排斥并释放 VEGF。所述电极性产生的力使得它可以克服 VEGF 与 a-VEGF mhAb 之间由于静电键、氢键、范德华力、疏水作用力和芳香  $\pi$  键的结合, 但小于多种连接分子之间的共价键。

[0026] 本发明实施方案之一的另一个目的是一种具有并联电极阵列的装置, 所述并联电极阵列以互相交叉模式排列, 以最大化 VEGF 杂交的表面面积并提高检测敏感度。

[0027] 本发明的多个实施方案涉及用于多重生物测定的信号放大方法, 所述方法使用至少一个装置来监测所述芯片的矩阵阵列位置上的 VEGF 分子杂交。所述装置应装配有计算装置, 目的是在所述时间范围内提供传感输出, 从而检测、报告并形成稳态环以指导医药剂的治疗性介入。所述装置周期性地测量、储存并报告传感输出电值, 所述电值与 VEGF 分子和固定的 a-VEGF mhAb 的杂交有关。

[0028] 本发明的一个实施方案是体内检测 VEGF 分子, 这不仅提供了肿瘤负荷的当前状态信息, 而且 VEGF 分子随时间的趋势可用于反映化学治疗剂和生物学反应调节剂 (BRM) 的效力, 用于肿瘤负荷降低和消除的目的。

[0029] 本发明一个实施方案的一个目标是通过无线电设备实时监测与肿瘤负荷的当前状态信息相关的 VEGF 检测传感输出。所述装置应装配有被批准用于经皮无线电频率 (RF) 通信的医学植入式通信服务 (MICS) 无线电设备。

[0030] 本发明的另一个实施方案是用泵控制所述 VEGF 分子在所述芯片的矩阵阵列位置上的杂交。在本发明至少一个实施方案的排列上存在至少一个用于控制液体流速的装置及相关控制装置。为此具体目的, 在至少一个实施方案中, 所述传感器芯片被连接到包括精密泵的微流体系统。所述液体流控制的一个具体能力是允许在检测完成后将所述去杂交的 VEGF 分子从所述电极冲掉, 这使得所述传感器可重复使用。

## 附图说明

[0031] 附图——其中同样的参考数字在所有各个视图中是指相同或功能相似的元件并且其被纳入说明书中并形成说明书的一部分——进一步举例说明本发明，并且与具体实施方式一起用于解释本发明的原理。

[0032] 图 1 是所述装置的正投影截面图，含所述电子检测模块的示意图。

[0033] 图 1A 是本发明一个实施方案的电学示意图，描绘来自所述电容器阵列的等效电极 - 电解质节点的一个单元。

[0034] 图 2 是 VEGF 检测器的电容排列的横截面等轴视图。

[0035] 图 2A 是电容 VEGF 传感器的正投影俯视图。

[0036] 图 3 描绘了带有组成型杂交元件的 VEGF 传感器。

[0037] 图 3A 描绘了被 VEGF 单克隆半抗体 ( $\alpha$ -VEGF mhAb) 功能化之前的马来酰亚胺封端的 SAM。

[0038] 图 3B 示出了将 VEGF 单克隆抗体 ( $\alpha$ -VEGF mAb) 分裂成两个半抗体的选择性还原过程。

[0039] 图 3C 示出了包括马来酰亚胺 - 巯基共轭以产生  $\alpha$ -VEGF mhAb 功能化的  $\text{SiO}_2$  底物的自发反应。

[0040] 图 4 是所述生物传感器电容器阵列的横截面图，其矩阵阵列设计包括包围腔 (chamber containment)。

[0041] 图 4A 为所述电容器矩阵阵列的示意图，其描绘了所述等效电路。

[0042] 图 5 示出了配置在送递装置框图内的 VEGF 检测器的设计。

[0043] 图 5A 是优选实施方案的示意性框图——生物传感器被纳入作为检测、分析和报告系统的一部分。

[0044] 图 5B 是使用所述生物传感器的优选实施方案时形成的稳态环的示意性框图。

[0045] 定义

[0046] 本文使用的所有技术术语、科学术语或其他术语具有的含义与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同。提供下述定义意在阐明或解释所定义术语的普通含义，而不应解释为限制或缩小这些术语含义的范围。虽然与本文描述的方法和材料类似或等价的任何方法和材料均可用于实施或测试本发明，但将还是描述所述方法、装置和材料。本文提及的所有出版物通过引用的方式纳入本文，目的是为了描述并公开所述出版物中报告的可能用于本发明的材料和方法。本文中任何内容都不能被解释为承认本发明由于在先发明而没有资格早于这些公开物。

[0047] 本文使用的“人源化 VEGF 单克隆半抗体”是指通过三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP) 将连接两条重链的二硫键切割后所产生的两个单克隆抗体片段。所产生的半抗体 (hAb) 具有完整的结合位点和反应性巯基。这些 hAb 保留了它们的靶向能力，但其尺寸较小，可以以位点特异的方式共轭以及与所述马来酰亚胺封端的  $\text{SiO}_2$  表面反应。

[0048] 本文使用的“VEGF-A 和 VEGF 单克隆抗体杂交”是指 VEGF1 与 VEGF 单克隆抗体 11 杂交的过程，是通过 VEGF-A 和 VEGF 单克隆半抗体之间的分子识别来实现的。所述人源化 VEGF 单克隆抗体 (rhuMab VEGF; 贝伐单抗; **Avastin®**) 与 VEGF 结合的亲和力与原始抗体与 VEGF 结合的亲和力 ( $K_d$  约 0.5nM) 非常相似。与其小鼠对应物相同，贝伐单抗结合并中和所有的人 VEGF-A 同种型和生物活性的蛋白水解片段。贝伐单抗的结合表位已通过 Fab- 配

体复合体的晶体结构分析被确定。该分析预测人 VEGF 中的 Gly88 对于结合贝伐单抗是必需的,并且该残基还构成贝伐单抗结合的种特异性的基础,因为在小鼠和大鼠中 VEGF 的相应位点发现的是丝氨酸残基。贝伐单抗不中和 VEGF 基因家族的其他成员例如 VEGF-B 或 VEGF-C。贝伐单抗在几个物种中的药物代谢动力学性质此前已有记载,并且其与典型的人源化单克隆抗体一致。贝伐单抗在人体内的终末半衰期是 17-21 天。重要地,迄今为止进行的任何临床试验中都没有发现对贝伐单抗的抗体反应证据,这验证了其人源化的成功。

[0049] 本文使用的“VEGF 单克隆半抗体固定”是指所述半抗体结合到所述表面的过程,其中马来酰亚胺-巯基偶联快速并自发地发生。所述马来酰亚胺封端的 SiO<sub>2</sub> 底物会与抗 VEGF hAb 溶液以需要的浓度孵育 2 小时。所述 hAb 会以方向特异的方式自发地偶联到所述底物表面。如图 3 所示,抗原结合位点将保持向外。所述 VEGF hAb 的浓度将被用于控制所述底物上的 hAb 涂敷密度。孵育后,用 PBS 缓冲液冲洗所述底物以除去所有未共轭的化合物。

[0050] 本文使用的“表征 VEGF 半抗体固定”是指通过使用荧光测量来确认并定量所述偶联反应的过程。在 TCEP 还原之前,用 Alex-488 荧光团共价标记 CEA mAb。为确认所保留的荧光是由于马来酰亚胺-巯基共轭而不是 VEGF hAb 或未切割的 mAb 的非特异性吸收,使用完整的 mAb 作为阴性对照以确保用 PBS 缓冲液冲洗之后 mAb 不会吸收并粘附到所述底物。然后,VEGF 蛋白将被用于进一步评估所述固定的 VEGF hAb 的结合敏感度和特异性。

[0051] 本文使用的“表面修饰”是指制备 SiO<sub>2</sub> 表面 14 的过程,其为,首先用 piranha 溶液 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=3:1 (v/v)) 处理 20min,然后用蒸馏水冲洗以完全清洁所述表面。然后,将所述底物浸入 50% 乙醇溶液 (EtOH:H<sub>2</sub>O=50:50 (v/v)) 2 小时以完全水合所述表面。然后,再用 piranha 溶液处理所述水合表面 20min,并用蒸馏水洗涤。所述整个过程将导致 SiO<sub>2</sub> 表面的完全羟基化以形成氢氧化硅 (SiOH) 表面。用氮气干燥所得的 SiOH 底物并将其保存在 -20°C 用于后续使用。然后,在 SiOH 底物上合成马来酰亚胺封端的 SAM。简单地通过浸渍过程,用 1M 3-氨基丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液处理所述 SiOH 底物 1hr。这将形成胺 (-NH<sub>2</sub>) 封端的自组装单层 (SAM)。该 -NH<sub>2</sub> 封端的 SAM 能够容易地与活化的羧酸反应,用于进一步修饰所述表面。在优选的实施方案中,将所述 -NH<sub>2</sub> 封端的 SAM 与 1M 琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC) 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液孵育 2hr,然后用蒸馏水洗去未反应的化合物。该过程将导致形成具有马来酰亚胺封端的功能性表面基团的 SAM。然后,这些马来酰亚胺封端的 SAM 可自发地与具有一个或多个游离的巯基官能团的任何类型的生物分子 (例如蛋白质、肽、半抗体和其他抗体片段) 反应,并因此将所述生物分子固定到所述底物表面上。为制备清洁且高质量的 SAM,需要用蒸馏水洗涤所形成的 SAM 并将其在连续的氮气流下干燥,然后储存在 -20°C 用于后续使用。将所述表面在室温下以 MeOH/HCl (1/1) 清洁 30 分钟,以超纯水 (Milli-Q Gradient A1018, 2MΩ) 冲洗,并以氩气干燥。在下一步骤中,在气相或液相中通过使用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 的硅烷化步骤将所述表面用 NH<sub>2</sub> 基团修饰。为了进行气相硅烷化,将所述芯片置于含有几滴甲硅烷的干燥器中。将所述干燥器密封并加热至超过 100°C,使所述芯片在低压 (约 1mbar) 下与甲硅烷蒸气反应 1-2 小时。

[0052] 本文使用的“表面表征”是指例如原子力显微镜 (AFM)、扫描电镜 (SEM) 和 X-射线光电子能谱 (XPS) 的方法。可通过使用傅里叶变换红外 (FT-IR) 光谱法监测形成 SAM 的每

一步的证据,该方法将提供所述 SAM 中官能团的特征信号。

[0053] 本文使用的“靶分析物”是指测试样品中有待于使用本发明检测的物质。所述分析物可以是存在其天然捕获剂(例如抗体、多肽、DNA、RNA、细胞、病毒等)或可制备其捕获剂的任何物质,并且在测定中所述靶分析物可结合一个或多个捕获剂。“靶分析物”还包括任何抗原性物质、抗体及其结合物。所述靶分析物可包括蛋白、肽、氨基酸、碳水化合物、激素、甾体、维生素、药物(包括出于治疗目的给予的药物以及出于非法目的给予的药物)、细菌、病毒和任意上述物质的代谢物或抗体。

[0054] 本文使用的“靶分析物类似物”是指可与分析物捕获剂交叉反应的物质,尽管其反应程度可能较所述靶分析物本身更强或更弱。所述靶分析物类似物可包括修饰的靶分析物以及所述靶分析物分子的片段部分或合成部分,只要所述靶分析物类似物具有至少一个与所述兴趣靶分析物相同的表位位点。

[0055] 本文使用的“捕获剂”是能够结合靶分析物或靶试剂的分子或化合物,其可直接或间接附着于基本上为固体的材料。所述捕获剂可以是存在其天然靶分析物(例如抗体、多肽、DNA、RNA、细胞、病毒等)或可制备其靶分析物的任何物质,并且在测定中所述捕获剂可结合一个或多个靶分析物。

[0056] 本文使用的“测试样品”是指含有有待于使用本发明检测和测定的靶分析物的样品。除所述靶分析物以外,所述检测样品还可含有其他组分,可具有液体或固体的物理属性,并可为任意大小或体积,所述测试样品包括例如移动的液体流。所述测试样品可含有除所述靶分析物以外的任何物质,只要所述其他物质不干扰所述靶分析物与所述捕获剂的结合或第一结合成员与第二结合成员的特异性结合。测试样品的实例包括但不限于:血清、血浆、痰、精液、尿、其他体液,以及环境样本例如地下水或废水、土壤浸出物、空气和杀虫剂残留物。

[0057] 本文使用的“方法和试剂”(出于分析和测试本发明装置的目的,发明人采用并使用了 HS Lee et al., 2008 文章中提供的信息,目的是鉴定所述方法)是指试剂,例如:3-氨基丙基二乙氧基硅烷(APDES)、琥珀酰(SA)、碳酸钠(SC)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂、十二烷基硫酸钠(SDS)、1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(硫代-NHS)、氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)(Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO)。人 VEGF165 (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA) 作为检测蛋白。据报道,编码人 VEGF165 的 cDNA 被亚克隆至表达载体中并在酵母中表达。据报道,重组人 VEGF165 同型二聚体被进一步纯化并保存在含有 0.1%BSA 的磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH7.4)中。

[0058] 本文使用的“合成 VEGF 单克隆抗体”是指通过化学过程将人源化的 VEGF 抗体切成两半。摩尔量超过所述 VEGF 单克隆抗体(mAb)摩尔浓度 3 倍的三(2-羧乙基)膦(TCEP)将被用作还原剂。在室温下,将所述 TCEP 还原剂与所述 VEGF mAb 在 PBS 缓冲液中混合 2hr。所述 TCEP 将选择性地切割连接 mAb 的两条重链的二硫键,并产生两个 VEGF 半抗体(hAb)。所得的 hAb 具有完整的结合位点和反应性巯基。这些 hAb 保留了它们的靶向能力,但其大小较小且能够以位点特异的方式共轭。在本研究中,所得的 hAb 可直接(未经预先纯化)用于与所述马来酰亚胺封端的 SiO<sub>2</sub> 表面反应。

[0059] 本文使用的“表征 VEGF 单克隆半抗体”是指确定所合成的半抗体。可使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)优化所述选择性还原过程。为确认 hAb 的产生

并优化所述选择性还原过程,将 VEGF mAb 与不同摩尔量的过量 TCEP 混合 2hr,然后分离并可视化。具体地,使用 NovexSureLockXcell 电泳系统(Invitrogen)在 Tris- 乙酸电泳缓冲液中在 SDS-PAGE3-8%Tris- 乙酸 10 孔迷你凝胶上分离所述切割的 mAb。所述样品将在 150V 电泳 1hr,将所产生的聚丙烯酰胺凝胶在 SimplyBlue™ (Invitrogen) 中过夜染色以可视化。为定量所述 hAb 的浓度,可将 Alexa Fluor488 荧光探针预共轭到所述 mAb,然后进行还原。然后,可测量来自 hAb 的荧光强度,并与标准曲线化比较。

[0060] 本文使用的“合成的 VEGF 半抗体的结合亲和力”是指使用表面等离子共振 (SPR) 分析 (Kang et al., 2008) 来分析两个生物分子之间的相互作用。

[0061] 本文使用的“稳态控制机制”是指这样的概念,即所述生物传感器测量变量的至少三个相互依赖的组件是被调节的:受体是传感组件,杂交的 VEGF 分子改变所述电容负荷,因此监测环境改变并对其作出反应。所述受体感受刺激,其发送信息到控制电路——设定变量维持范围的组件。所述控制电路决定对所述刺激的合适反应。然后,所述控制电路发送信号至接收来自所述控制电路的信号效应器。在接收到所述信号后,发生变化,以通过用正反馈增强所述信号或者用负反馈削弱所需信号来校正偏差。

[0062] 本文使用的“血管发生”是指包括从已存在的血管生长新血管的生理过程。尽管有一些对术语的争论,但是血管发生是用于自发血管形成的术语,内填作用 (intussusception) 是用于通过分裂已存在的血管而形成新血管的术语。

[0063] 本文使用的“信号转导”是指将对细胞的机械 / 化学刺激转变为特异性细胞反应的机制。信号转导始于到达接收器的信号,终于细胞功能改变。

[0064] 本文使用的“酪氨酸激酶”是指可将 ATP 中的磷酸基团转移到蛋白的酪氨酸残基的酶。酪氨酸激酶是更大类的蛋白激酶的亚组。通过激酶来磷酸化蛋白质是信号转导中的重要机制,用于调节酶活性。

[0065] 本文使用的“微电子机械系统 (MEMS)”是指非常小的技术,其在纳米尺度合并到纳米电子机械系统 (NEMS) 和纳米技术。MEMS 由介于 1 微米到 100 微米 (即 0.001mm 到 0.1mm) 大小的组件组成,并且 MEMS 装置的大小通常介于 20 微米 (百万分之二十米) 到 1 毫米。它们通常由处理数据的中枢单元、微处理器和数个与外部相互作用的组件 (例如微传感器) 组成。

[0066] 本文使用的“寡核苷酸”是指短的核酸聚合物,通常具有 20 个或更少的碱基。虽然它们可由更长的片段通过键断裂而形成,但是现在更常见的是通过聚合单个的核苷酸前体来合成。自动化合成仪可合成具有多达 160 到 200 个碱基的寡核苷酸。

[0067] 本文使用的“凝集素”是指对自身糖基具有高度特异性的糖结合蛋白。它们在涉及细胞和蛋白质的生物识别现象中发挥作用。例如,一些病毒在感染期间使用凝集素将其自身附着到宿主生物的细胞。

[0068] 本文使用的“适体”是指结合到具体靶分子的寡核酸分子或肽分子。适体通常通过从大的随机序列库中选择它们而产生,但是天然适体也存在于核糖开关中。适体可用于基础研究和作为大分子药物用于临床目的。适体可在其靶分子的存在下与核酶结合以自切割。这些化合物分子具有其他的研究、工业和临床用途。

[0069] 本文使用的“肽”是指由  $\alpha$ -氨基酸以确定的顺序连接而形成的短的聚合物。一个氨基酸残基和下一个氨基酸残基之间的连接称为酰胺键或肽键。

[0070] 本文使用的“共振”是指系统在某些频率下比在其他频率下以更大的振幅振动的趋势。这些频率被称为该系统的共振频率。在这些频率下,甚至小的周期性驱动力可产生大振幅的振动。

[0071] 本文使用的“石英晶体微天平(QCM)”是指通过测量石英晶体共振器频率的改变来测量每单位面积的质量的装置。由于在共鸣器表面的氧化物增加/下降或膜沉积,加入或移除小的质量可干扰所述共振。

[0072] 本文使用的“酶”是指催化化学反应(即增加化学反应速率)的蛋白质。在酶促反应中,所述过程起始时的分子称为底物,所述酶将它们转变成不同的分子,称为产物。生物细胞中几乎所有过程都需要酶以在显著的速率进行。由于酶对其底物具有选择性且在许多可能的反应中只加速某些反应,细胞中制备的酶集合决定在该细胞中发生哪些代谢途径。

[0073] 本文使用的“表位”是指抗原中被免疫系统(具体是抗体、B 细胞或 T 细胞)识别的部分。抗体中识别所述表位的部分称为互补位。虽然通常认为表位源自非自身蛋白,但是可被识别的源自宿主的序列也被分类为表位。

[0074] 本文使用的“自组装单层(SAM)”是指两亲性分子的有组织的层,其中所述两亲性分子的一个末端——“头部基团”——显示出对底物的特异性亲和力。SAM 的终端还包含具有官能团的尾部。SAM 是通过亲水的“头部基团”化学吸附到来自蒸汽或液相的底物,然后通过疏水“尾部基团”的缓慢二维组织而形成的。最初,被吸附的分子形成无序的分子团或者形成“下沉相(lying down phase)”,经数小时的时间,开始在所述底物表面形成晶质结构或半晶质结构。所述亲水性“头部基团”在所述底物上组装在一起,而疏水性的尾部基团组装成远离所述底物。密集分子区域成核并生长直到所述底物的表面被单个的单层覆盖。

[0075] 本文使用的“生物学反应调节剂(BRM)”是指人体天然产生的物质,以及科学家可在实验室中制造的物质。这些物质激发身体对感染的反应。这些物质的一些被用于治疗关节炎、癌症和一些其他疾病。免疫治疗使用 BRM 来增强免疫系统活性以增加身体对癌症的天然防御机制,而用于类风湿性关节炎的 BRM 目的是减少炎症。

[0076] 本文使用的“医学植入物通信服务(MICS)”是指使用介于 402MHz 和 405MHz 之间的频带与医学植入物通信的技术规范的名称。其允许与起搏器或其他电子植入物的双向无线电通信。其最大发射功率非常低,EIRP=25 微瓦,目的是减少与其他使用相同频带的用户相互干扰的风险。在任何一个时刻所使用的最大带宽是 300kHz,这使其成为一个低比特率的系统(与 WiFi 或蓝牙相比)。与之前使用的需要外部收发器以接触患者皮肤的诱发技术相比,其主要优势为更具灵活性。MICS 的有效范围为数米。

[0077] 本文使用的“电容器”是指由被电介质(绝缘体)分开的导体对组成的无源电子组件。当所述导体之间存在电势差(电压)时,在所述电介质中呈现电场。所述电场储存能量,并在所述导体之间产生机械力。当在大面积的导体之间有窄的间隔时,所述效应最大,因此电容器的导体通常被称为板。

## 具体实施方式

[0078] 图 1 是所述装置的正投影截面视图,含所述电子检测模块的示意图。生物传感器有其绝缘罩 100。绝缘罩 100,配置有流体入口 101 和流体出口 102。装置 100 包括形成电

容性板 103 的涂有 VEGF 传感元件的电极阵列并形成 VEGF 电容检测器电路, 容性板 103 与电子模块 200 交界。所述 VEGF 电容检测器电路被连接到运算放大器 (OpAmp) 缓冲器 201, 并且连接到电流电压放大器 202, 然后连接到 OpAmp 集成电路 203, 包括偏置电阻器 204、205 和电容器 206。输入电压  $V_{in}$  207、电流输出 I209 和 V1209 代表杂交后各自的电势和电路 200 中所得的电容变化的积分值。所述电极被设计成互相交叉模式, 以在小体积中最大化所述传感器的表面积。

[0079] 图 1A 是图 1 的一个实施方案的示意图, 描绘形成电容器阵列 110 的等效电极 - 电解质节点的一个单元。电路图 110 可表示为: 通过电阻 105 和其电容负载  $C_a$  106 描绘电极 a/ 溶液界面的电阻 ( $R_a$ )。所述传感器本体 100 中的溶液的电阻由 ( $R_s$ ) 107 表示, 而电极 B/ 溶液界面的电阻表示为 ( $R_b$ ) 108, 其电容负载为 ( $C_b$ ) 109。形成生物传感器 110 的所述阵列电容器的一节点单元与电容检测器电路 200 交界。方波发生器产生的输入 ( $V_{in}$ ) 信号 207 被 OpAmp 201 缓冲, 并产生电流 208, 电流 208 代表 VEGF 与 a-VEGF mhAb 结合杂交后所述电路中各自的衰减值  $R_1$  204。在等效电路节点 110 所示的由于 VEGF 分子与 a-VEGF mhAb 结合产生电容改变之后, 电流 208 耦合到所述 OpAmp (充当电流电压放大器 202), 以指示电容单元 110 各自的积分值。所述信号被 OpAmp 203 和与之相连的电阻器 205、电容器 206 进一步整合, 产生输出电压 ( $V_{out}$ ) 210。

[0080] 图 2 是 VEGF 检测器的电容排列的横截面等轴视图。该图描绘了图 1 和图 1A 标示的元件, 其进一步解释并阐明了等效电子模块 110 和支配 VEGF 检测器性能的传感原理之间的关系。所述 VEGF 生物传感器基于电化学方法, 据此使用具有几何形状  $G_{x300}$  的电容器, 目的是用以下述方程 1 中的电介质 ( $\epsilon_r$ ) 作为变量, 并且还利用无标记检测技术 (基于生物修饰的电极 / 溶液界面的电容测量值)。传感器 100 的功能可由所述传感器将成股的 a-VEGF mhAb 11 有效固定在传导电极表面 16 的能力来最好地定义。所述电解质溶液 (电极之间的介质) 是体液, 例如脑脊液 3。电极 16 用 p-Si 底物 15 涂敷, 以增强 VEGF1 和 a-VEGF mhAb 11 之间的亲和力。绝缘层 (例如二氧化硅) 14 保护带有正电荷的底物 15, 带正电的底物 15 经杂交物质 (3-氨基丙基 - 三甲氧基硅烷) 13 与连接体 (琥珀酰亚胺基 -4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷 -1-羧酸酯) 12 键合。然后, 所述 a-VEGF mhAb 通过与所述连接体键合而被固定。由于固定 a-VEGF mhAb 造成的总表面厚度增加是约 10nm。当将 VEGF 蛋白 1 引入至体液 3 中时, 它们结合到涂敷有 a-VEGF mhAb 的电极表面。所述 VEGF 分子和 a-VEGF mhAb 的结合可改变所述电极 - 溶液界面的阻抗 (即主要是其电容)。当所述 VEGF 分子在其抗 -VEGF 片段 (抗原结合 (Fab) 域界面 10) 与 a-VEGF mhAb 杂交时, 总厚度是约 200nm。

[0081] 所述电化学单元 110 的电容 106 和 109 可以如方程 1 中所示模拟。

$$[0082] \quad C_{cell} = C_{geometry} + C_{electrode/solution} \quad (1)$$

[0083] 其中,  $C_{Geometry}$  是由所述传感器的几何形状产生的电容, 如方程 2 所示。

$$[0084] \quad C_{geometry} = \epsilon_r \epsilon_0 A/d \quad (2)$$

[0085] 其中,  $\epsilon_r$  是由 VEGF 分子、体液、a-VEGF mhAb、琥珀酸酐连接体 (Succinic linker)、氨基杂交物质、 $SiO_2$  绝缘体和 p-Si 底物组成的介质的组合相对电容率 (杂交之前所述组合介质的介电值的介电常数, " $\epsilon_r = [(\epsilon_r)_1, (\epsilon_r)_2, \dots, (\epsilon_r)_n]$ "), 并考虑总电容值

“ $C_{cell}$ ”) ;  $\epsilon_0$  是自由空间的电容率 ( $8.854 \times 10^{-12} \text{F/m}$ ) ; A 是由宽 52 和长 53 的电极板 103 所得出的总面积 ; d 是板 103 之间的间距 51。选择 A 和 d 的值,使得所述电容变化可以用如下技术有效地测量,但通过传感器单元 100 的体液环流不受限制。由于 VEGF 结合时所述表面的厚度是约 200nm 的事实,所述间距可以小至 5000nm,而没有 VEGF 杂交所导致的限制所述流的风险。电极板 103 以互相交叉的手指模式排列,以在小体积中最大化有效的表面积。体液 3 经入口 101 流入所述传感器单元,并流过出口 102,可能连接到图 5 将进一步描述的泵和阀部件。

[0086]  $C_{electrode/solution}$  是两个电极的每一个和所述溶液之间形成的双层电容。所述双层电容可以如下述方程 3 所示模拟。下面方程 9 和 10 中电极 A 和电极 B 的  $C_{electrode/solution}$  分别由  $C_A$  和  $C_B$  表示。

[0087] 
$$\frac{1}{C_{electrode/solution}} = \frac{1}{C_{insulator}} + \frac{1}{C_{linker}} + \frac{1}{C_{Macugen}} + \frac{1}{C_{VEGF}}$$

[0088] 当所有 a-VEGF mhAb 与 VEGF 键合时,  $C_{cell}$  的总值是约  $1 \mu \text{F/cm}^2$ , 其动态范围约  $0.3 \mu \text{F/cm}^2$ 。

[0089] 图 2A 是电容 VEGF 传感器的正投影俯视图,其中电容器板 103 被表示为它们各自有效的几何术语  $G_x300$ 。选择 A 和 d 的值,使得可以用以下技术有效地测量电容变化。用于选择尺寸 51 [ $(d_{cap})$ , 在计算所述电容值中传感器板之间的距离] 和 52 [ $(W_{cap})$ , 用于计算所述电容值的传感器板 103 的宽] 的边界条件是通过提供所述体液穿过传感器单元 100 的无限制环流,以及通过设置所述静态流速为恒定值来确定的。

[0090] 如图 1、1A、2 和 2A 所指出的,所述电化学单元的测量技术是基于可变电容器单元的传感原理,其中电极/溶液界面模型 110 的电介质 ( $\epsilon_r$ ) 是可变的。在该模型中,在 a-VEGF mhAb11 上停靠的 VEGF 蛋白 1 在电极和溶液之间引入另外的绝缘层 14, 导致所述界面模型的电容组件的可测量的变化。基于电荷的电容测量 (CBCM) 技术,可以测量电容组件中的这种电极-溶液界面阻抗的变化。该 CBCM 技术的测量原理是以合适频率充电和放电所述 VEGF 电化学单元,并从半周期的平均电流测量其等效电容,如方程 4 所示。

[0091] 
$$I_{avg} = \frac{\Delta Q}{T/2} = \frac{C\Delta V}{T/2} = 2C\Delta Vf$$

[0092] 其中  $\Delta V$  和  $f$  为已知,  $I_{avg}$  可测量。该测量技术在由两个单独的电路组成的电路 200 中示出。OpAmp 电压跟随器 (follower) 201 可增加所述电化学单元的输入阻抗,使得所述单元可以被几乎完美的方波 207 驱动,方波 207 来自微控制器 401 的数字输出信号线。选择所述方波的频率 ( $f$ ) 作为半周期中完全充电和放电所述电化学单元中电容器的最大频率。

[0093] 电路 200 的第二部分用已知电阻器值  $R_1204$ , 将  $I_{avg}208$  转换成电压值,并通过 Op-Amp202 将所述电压值放大。在 Op-Amp202 的输出处的  $V_1209$  可如方程 5 所示进行计算。

$$[0094] \quad V_1 = -C_{cell} R_1 \frac{dV_{in}}{dt} \quad (5)$$

[0095] Op-Amp 集成电路 203 将瞬时电压值 209 转换成方波 210, 如方程 6 所示。

$$[0096] \quad V_{out} = -\frac{1}{C_2} \int \frac{V_1}{R_2} dt$$

[0097] 将方程 2 代入方程 3, 电路 200 的输出作为其输入的函数, 可以如方程 7 计算, 得出方程 8。

$$[0098] \quad V_{out} = -\frac{1}{C_2 R_2} \int -C_{cell} R_1 \frac{dV_{in}}{dt} dt \quad (7)$$

$$[0099] \quad V_{out} = \frac{C_{cell} R_1}{C_2 R_2} V_{in} \quad (8)$$

[0100] 由 ADC402 取样的电路 200 的输出电压与  $C_{cell}$  的值成比例。

[0101] 图 3 示出带有组成型杂交元件的 VEGF 传感器, 和其中固定的  $\alpha$ -VEGF mAb11 (通过被选择用于高亲和力地结合到分子靶的 Fab 片段), 使用单链抗体作为蛋白结合的亲和分子的概念, 最初在 1998 年描述 (YA Muller et al, 1998), 并且其是基于短序列在存在靶下折叠成独特三维结构的能力, 所述三维结构可以高亲和力和特异性结合所述靶。可使用  $\alpha$ -VEGF mAb21 的一半 (例如 **Avastin**<sup>®</sup>), 因为其被证明具有对 VEGF 分子 1 的结合亲和力。 $\alpha$ -VEGF mAb11 被附着到连接体 12 [琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯, 也称为 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯, 是具有分子式  $C_{16}H_{18}N_2O_6$  的有机化合物]。所述连接体 12 被附着到杂交物质 (3-氨基丙基-三甲氧基硅烷), 这采用生物相容的支架以提供可行的替代物来形成用于粘附的假体材料。用马来酰亚胺封端的 SAM20 作为支架来生长连接体 12 是有利的, 因为其具有大的表面积, 这使得大量位点用于琥珀酸酐 12 的粘附和生长。该 NH2 封端的 SAM 可容易地与活化的羧酸反应用于进一步修饰所述表面。所述连接体 12 还与杂交物质 (3-氨基丙基-三甲氧基硅烷) 13 结合。将石英或玻璃晶片 ( $SiO_2$ 14) 的表面以不同的氨基硅烷溶液处理, 其中表面密度随反应时间

而急剧增大并产生多层。氨基-硅烷化 13 是支架,其提供可行的替代物,形成用于粘附到  $\text{SiO}_2$  绝缘体表面 14 的假体材料。可使用固定的 a-VEGF mhAb11 复合体检测循环的 VEGF 同种型 1。

[0102] 硅绝缘体表面的制造详细描述于 HS Lee et al., 2008 中,其描述了在绝缘罩 17 内部被沉积 Au 层 ( $100 \mu\text{m}$ ) 以形成电极 103 的交错阵列。在 50Torr 气压下和  $530^\circ\text{C}$  下,在  $\text{SiH}_4$  前体的恒流中, p 型掺杂的硅晶体 15 在 Au 导体表面 16 上生长。在该过程中,在  $\text{SiH}_4:\text{B}_2\text{H}_6$  的相对压力比为  $10:1 \times 10^{-3}$  下,硅晶体与作为 p 型掺杂剂的  $\text{B}_2\text{H}_6$  原位掺杂。当 p 型底物 15 达到  $1 \mu\text{m}$  时,继续  $\text{SiH}_4$  流但停止  $\text{B}_2\text{H}_6$ 。在添加的 Si 层达到 10nm 后,停止  $\text{SiH}_4$  流;将温度升高至  $820^\circ\text{C}$  并将气室向大气压开放,使得在干燥气氛中氧化以形成  $\text{SiO}_2$  绝缘层 14。

[0103] 因此,一个传感器板的组合厚度是  $102.02 \mu\text{m}$  (电极、两层 p-底物和两层绝缘体的厚度之和)。宽 d (所述板之间的距离 51) 为  $50 \mu\text{m}$ ,每个电极对需要的总空间是  $152.02 \mu\text{m}$ 。因为  $1\text{cm}^2$  的板面积可提供大约  $1 \mu\text{F}$  的足够电容,所以选择 A 为  $1\text{cm}^2$ ,任意选择 W (板的宽 52) 为  $0.5\text{cm}$ ,这导致所述板的总长为  $2\text{cm}$  或  $20000 \mu\text{m}$ 。选择 L (板的长 53) 为  $1000 \mu\text{m}$ ,以互相交叉的手指模式排列 20 个匝或电极对。因此,所述传感器的总体积是  $5000 \mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m} \times 3040.4 \mu\text{m}$ 。

[0104] 图 3A 示出在通过 VEGF 单克隆半抗体 (a-VEGF mhAb) 功能化之前马来酰亚胺封端的 SAM。SAM 的基本表征可通过使用表面表征技术例如原子力显微镜 (AFM)、扫描电镜 (SEM) 和 X-射线光电子能谱 (XPS) 来完成。形成 SAM 的每一步的证据可通过使用傅里叶变换红外 (FT-IR) 光谱法监测,该方法提供所述 SAM 中官能团的特征信号。

[0105] 图 3B 示出将 VEGF 单克隆抗体 (a-VEGF mAb) 分裂成两个半抗体的选择性还原过程。该图显示,用摩尔量超过所述 VEGF 单克隆抗体 (mAb) 21 摩尔浓度 3 倍的三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 作为还原剂。在室温下将所述 TCEP 还原剂与所述 VEGF mAb 在 PBS 缓冲液中混合 2hr。所述 TCEP 可选择性地切割连接 mAb 的两条重链的二硫键,并产生两个 VEGF 半抗体 (hAb) 22。所得的 hAb 具有完整的结合位点和反应性巯基。这些 hAb 保留了它们的靶向能力,但其大小较小且能够以位点特异的方式共轭。在一个实施方案中,所得的 hAb 可直接 (未经预先纯化) 用于与所述马来酰亚胺封端的  $\text{SiO}_2$  表面反应。

[0106] 在一个实施方案中,所述选择性还原过程可通过使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 优化。为确认 hAb 的产生并优化所述选择性还原过程,将含有 a-VEGF mAb 的溶液与不同摩尔量的过量 TCEP 混合 2hr,然后分离并可视化。具体地,使用 NovexSureLockXcell 电泳系统 (Invitrogen) 在 Tris-乙酸电泳缓冲液中在 SDS-PAGE3-8%Tris-乙酸 10 孔迷你凝胶上分离所述切割的 mhAb。将所述样品在  $150\text{V}$  电泳 1hr,并将所产生的聚丙烯酰胺凝胶在 SimplyBlue<sup>TM</sup> (Invitrogen) 中过夜染色以可视化。为定量所述 hAb 的浓度,可将 Alexa Fluor488 荧光探针预共轭到所述 mAb,然后进行还原。然后,可测量来自 hAb 的荧光强度,并与标准曲线化比较。

[0107] 图 3C 示出了包括马来酰亚胺-巯基共轭以产生 a-VEGF mhAb 功能化的  $\text{SiO}_2$  底物 25 的自发反应。马来酰亚胺-巯基偶联快速且自发地发生。将所述马来酰亚胺封端的  $\text{SiO}_2$  底物 20 与 a-VEGF mhAb22 溶液以需要的浓度孵育 2 小时。所述 a-VEGF mhAb22 以方向特异的方式自发地偶联到所述底物表面。如该图所示,抗原结合位点将保持向外。a-VEGF mhAb22 的浓度被用于控制所述底物上的 hAb 涂敷密度。孵育后,用 PBS 缓冲液冲洗所述底

物以除去所有未共轭的化合物。

[0108] 在一个实施方案中,通过使用荧光测量来确定并量化所述偶联反应。在 TCEP 还原之前,用 Alex-488 荧光团共价标记 a-VEGF mhAb。为确认所保留的荧光是由于马来酰亚胺-巯基共轭而不是 a-VEGF mhAb 或未切割的 mAb 的非特异性吸收,使用完整的 mAb 作为阴性对照以确保用 PBS 缓冲液冲洗之后 mAb 不会吸收并粘附到所述底物。然后,VEGF 蛋白将被用于进一步评估所述固定的 VEGF hAb 的结合敏感度和特异性。

[0109] 图 4 是生物传感器 100 的横截面俯视图,以其电极矩阵阵列 103 形成为电容器,并且其设计包括包围罩 17。所述生物传感器含有涂敷有 VEGF 传感器的电极阵列,其形成电容板 103,目的是通过在所述生物芯片罩 17 的参数内提供最大表面面积而使对所述电路的电容变化的响应最大化。该图还描述了,流体入口 101 和出口 102、电接口 16,并且绝缘罩 17 被描述为本发明装置的参数。

[0110] 图 4A 示出 VEGF 生物传感器 100 的等效电路 110,以及所述电路可以怎样分解以模拟所述电容器矩阵阵列中的每对电容板 103。每对电容板 103 与所述溶液形成电极-电解质界面,其可以用等效电路 120 表示。因为所述溶液介质是动态的,所以每对板的电路在所述电极/溶液界面处短路。因此,整个传感器 110 的等效电路可书写为每对板的组合电路,每对板与其相邻的对是电并联的。方程 9-13 使得 110 的参数可以由每对板 120 的参数得出。

[0111]

$$C_A = C_{a1} \parallel C_{a2} \parallel \dots \parallel C_{aN} = \sum_N C_{ai} \quad (9)$$

[0112]

$$C_B = C_{b1} \parallel C_{b2} \parallel \dots \parallel C_{bN} = \sum_N C_{bi} \quad (10)$$

[0113]

$$R_A = R_{a1} \parallel R_{a2} \parallel \dots \parallel R_{aN} = \frac{1}{\sum_N \frac{1}{R_{ai}}} \quad (11)$$

[0114]

$$R_B = R_{b1} \parallel R_{b2} \parallel \dots \parallel R_{bN} = \frac{1}{\sum_N \frac{1}{R_{bi}}} \quad (12)$$

[0115]

$$R_s = R_{s1} \parallel R_{s2} \parallel \dots \parallel R_{sN} = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{R_{si}}} \quad (13)$$

[0116] 图 5 是包括 VEGF 生物传感器 100 的送递装置 800 的可能设计的框图。该图显示 VEGF 生物传感器 100 沿导管管道 104 与其他生理传感器(包括压力传感器 406、pH 传感器 407 和 SpO<sub>2</sub>408)串联。压电泵 404 使来自肿瘤位点 600 的脑脊液环流通过所述传感器系列。来自所述传感器的数据通过 TI-ADS8344 模数转换器 402 获取,用于通过 TI-MSP430 微控制器 401 处理, TI-MSP430 微控制器 401 控制来自容器 500 的抗癌药物经泵组 405 的送递。MICS 收发器使得植入的送递装置 800 经 MICS 基站 702 与医师计算机 701 通信。

[0117] 图 5A 描述了图 5 中送递装置 800 的可能设计中的数据流和控制机制。对肿瘤位点 600 处血管发生可用的 VEGF1 量进行调节是通过循环泵 404 完成的,所述循环泵 404 可控制流体流 404. 2,从肿瘤位点带出测试样品 404. 1,并送递注入的抗癌药物 404. 4。另外的泵组 405 可调节来自容器 500 的抗癌药物的注入 404. 3。从所述肿瘤位点带回的测试样品被循环通过传感器系列,以获得与肿瘤生长以及抗癌药物治疗进展相关的信息。所述传感器(例如压力传感器 406、pH 传感器 407、SpO<sub>2</sub>408 和 VEGF 生物传感器 100)将物理和生物信息转换成电信号 402. 1、402. 2、402. 3 和 402. 4。所述信号被 ADC402 转换成数据数字 401. 1,用于通过微控制器 401 加工。通过将控制信号发送至泵 404 和 405401. 3,微控制器 401 关闭所述稳态环(在图 5B 中描述)的反馈途径,导致抗癌药物的注入 404. 3。注入方案编程在所述微控制器内的“查找表”或模型中,并可经 Zarlink-70101 医学植入物通信服务(MICS)收发器 403 进行升级 401. 5。所述 MICS 收发器还用于将传感器数据和装置状态无线传输至医师计算机 701403. 1,用于实时监测和数据记录 701. 1。

[0118] 图 5B 是本发明的实施方案形成的稳态环 801 的正投影视图。所述稳态方法被用于实现稳态平衡,所述稳态平衡可限制肿瘤生长而又不危及所述肿瘤位点附近的周围组织。所述稳态方法在微控制器 401 内部编程,其输入来自传感器例如 VEGF 生物传感器 100、压力 406、pH407 和 SpO<sub>2</sub>408。提取与肿瘤生长有关的信息例如生长因子、颅内压、组织状态和代谢率,以基于所述“查找表”中的参数确定治疗的进展。所述传感器信息还可用于计算内部状态,这可使得可对所述系统调整以实现所需参数。所述“查找表”产生驱动参数,以控制影响肿瘤位点 600 状态的泵。经无线收发器 403,基于医师的外部输入可更新所述内部状态。

[0119] 下表 1 示出了与数种癌症参考数据库(例如,美国国家癌症研究所、英国癌症研究院)中所列的不同癌症相关的标志物的对照表。已知这些在人血清中发现的生物标志物对于所述疾病的诊断和预后是可靠的。利用本发明公开的程序和方法可使生物化学领域技术人员以多种抗体产生类似的结果。因此,例如,表 1 中所呈现的每种生物标志物的特异性抗体可被用于形成对所述生物标志物特异的生物传感器。生物传感器领域技术人员将能够预见本发明中所用技术可被扩展到构建依赖但不限于表 1 中所呈现的癌症标志物的生物传感器。

[0120]

| 表 1    |  |
|--------|--|
| 癌症类型疾病 | 生物标志物  |
| 前列腺癌   | 前列腺特异性抗原 (PSA)、<br>前列腺酸性磷酸酶 (PAP)                              |
| 乳癌     | 癌抗原 15-3 (CA15-3)、<br>癌抗原 125 (CA125)、<br>癌抗原 27.29 (CA27.29)、 |

[0121]

|        |   |
|--------|---|
|        | 癌胚抗原乳腺癌 1, 早期发病 (CEABRCA1)、<br>2 型乳腺癌易感蛋白 (BRCA2)、<br>粘蛋白 1, 细胞表面相关的 (MUC-1)、<br>癌胚抗原 (CEA)、<br>锚蛋白重复结构域 30A (NY-BR-1)、<br>生长抑制因子蛋白 1 (ING-1) |
| 白血病    | 染色体异常   |
| 睾丸癌    | $\alpha$ -甲胎蛋白 (AFP)、<br>$\beta$ -人绒毛膜促性腺激素、<br>癌抗原 1 (CAGE-1)、<br>癌/睾丸抗原 1 B (ESO-1)   |
| 卵巢癌    | 癌抗原 125 (CA125)、<br>$\alpha$ -甲胎蛋白 (AFP)、<br>人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、<br>肿瘤蛋白 53 (p53)、<br>癌胚抗原 (CEA)   |
| 任何实体瘤  | 生物流体中循环的肿瘤细胞、<br>靶向的生长因子受体的表达   |
| 结肠癌和胰癌 | 癌胚抗原 (CEA)、<br>癌抗原 19-9 (CA19-9)、<br>癌抗原 24-2 (CA24-2)、<br>肿瘤蛋白 53 (p53)  |
| 肺癌     | 癌/睾丸抗原 1 B (NY-ESO-1)、<br>癌胚抗原 (CEA)、<br>癌抗原 19-9 (CA19-9)、<br>鳞状细胞癌 (SCC)、<br>细胞角蛋白片段 (CYFRA21-1)、<br>神经元特异性烯醇酶 (NSE)                        |
| 黑素瘤    | 酪氨酸酶、<br>癌/睾丸抗原 1 B (NY-ESO-1)  |
| 肝癌     | $\alpha$ -甲胎蛋白 (AFP)、<br>癌胚抗原 (CEA)   |
| 胃癌     | 癌抗原 72-4 (CA72-4)、<br>癌胚抗原 (CEA)、<br>癌抗原 19-9 (CA19-9)  |
| 食道癌    | 鳞状细胞癌 (SCC)   |

[0122]

|             |  |
|-------------|--|
| <b>滋养层癌</b> | <b>鳞状细胞癌 (SCC)、<br/>人绒毛膜促性腺激素 (hCG)</b>  |
| <b>膀胱癌</b>  | <b>棕色脂肪组织 (BAT)、<br/>纤维蛋白-纤维蛋白原降解产物 (FDP)、<br/>核基质蛋白 22 (NMP22)、<br/>膀胱癌抗原 4 (BLCA-4)、<br/>细胞角蛋白片段 (CYFRA21-1)</b> |

[0123] 因此,必须理解,说明性实施方案的描述只是为了举例,而不应被视为对本发明的限制,本发明由下文的权利要求书限定。例如,尽管权利要求书的要素在下面以某种组合的形式进行陈述,然而必须清楚地理解本发明包括如上公开的更少、更多或不同要素的其他组合,即使当最初没有要求保护这些组合时也如此。两个要素组合在一个要求保护的组合中的讲授应理解为也包括所述两个要素未相互组合,但可单独使用或在其他组合中组合的情形。本发明任何公开的要素的分割明确地被认为在本发明的范围之内。

[0124] 在本说明书中用于描述本发明及其多个实施方案的词语应理解为不应有它们通常限定的含义,还应包括超出通常限定含义范围的本说明书结构、材料或作用中的特殊定义。因此,如果要素在本说明书的上下文中可理解为包括一种以上的含义,那么其在权利要求书中的使用必须理解为,对本说明书和所述词语自身支持的所有可能的含义都是通用的。

[0125] 因此,在本说明书中所确定的以下权利要求书的词语或要素的定义不仅包括字面上描述的要素组合,而且包括以基本相同的方式、行使基本相同的功能以获得基本相同结果的所有等同结构、材料或作用。因此,在这个意义上,应考虑到可将下面权利要求书中的任一要素等同替换为两个或多个要素,或者可将权利要求书中的两个或多个要素替换为单个要素。尽管要素可在上面被描述为在某些组合中起作用,甚至最初也这样要求保护,然而应清楚地理解所要求保护的组合的一个或多个要素可在某些情况下从所述组合中分割,以及所要求保护的组合可涉及子组合或子组合的变化。

[0126] 本领域普通技术人员认为的所要求保护主题的非实质性变化——现在已知的或将来设计的——被明确地认为等同在本权利要求书的范围内。因此,本领域普通技术人员现在或将来所知的明显替换被确定为在本限定要素的范围内。

[0127] 因此,本权利要求书应被理解为包括上述具体说明和描述的内容、在概念上等同的内容、可被明显替换的内容以及本质上包含本发明本质构思的内容。

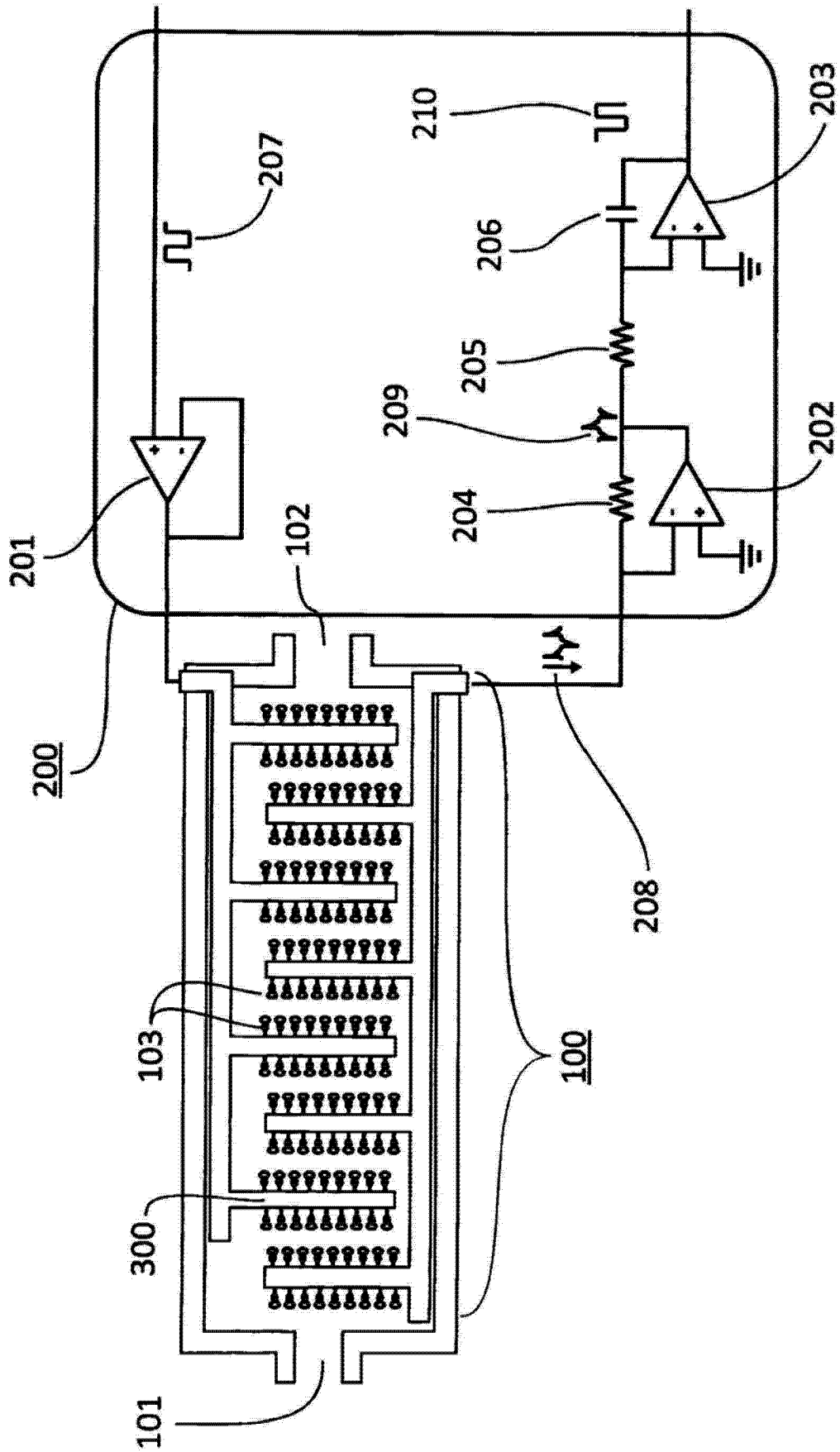


图 1

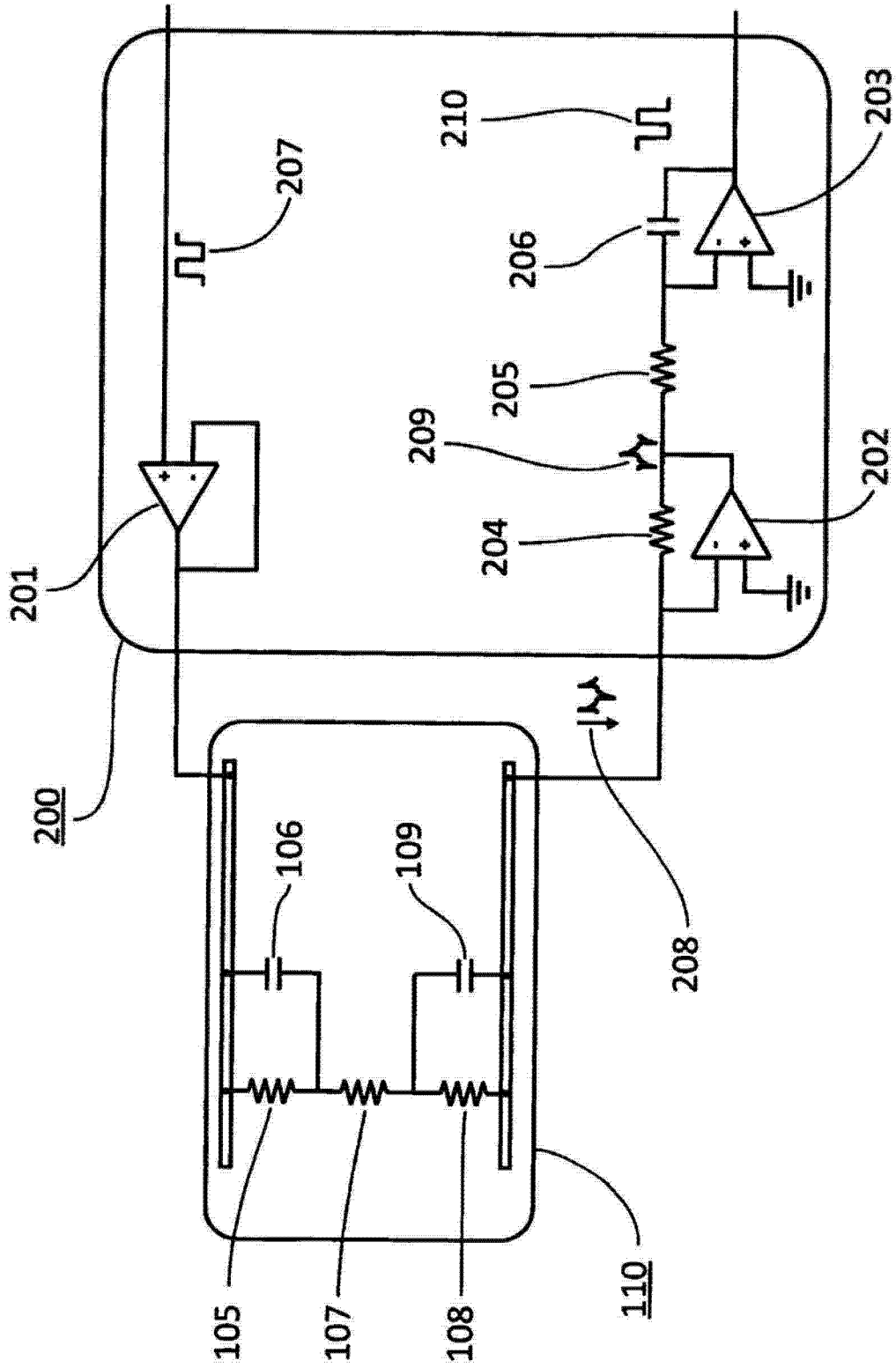


图 1A

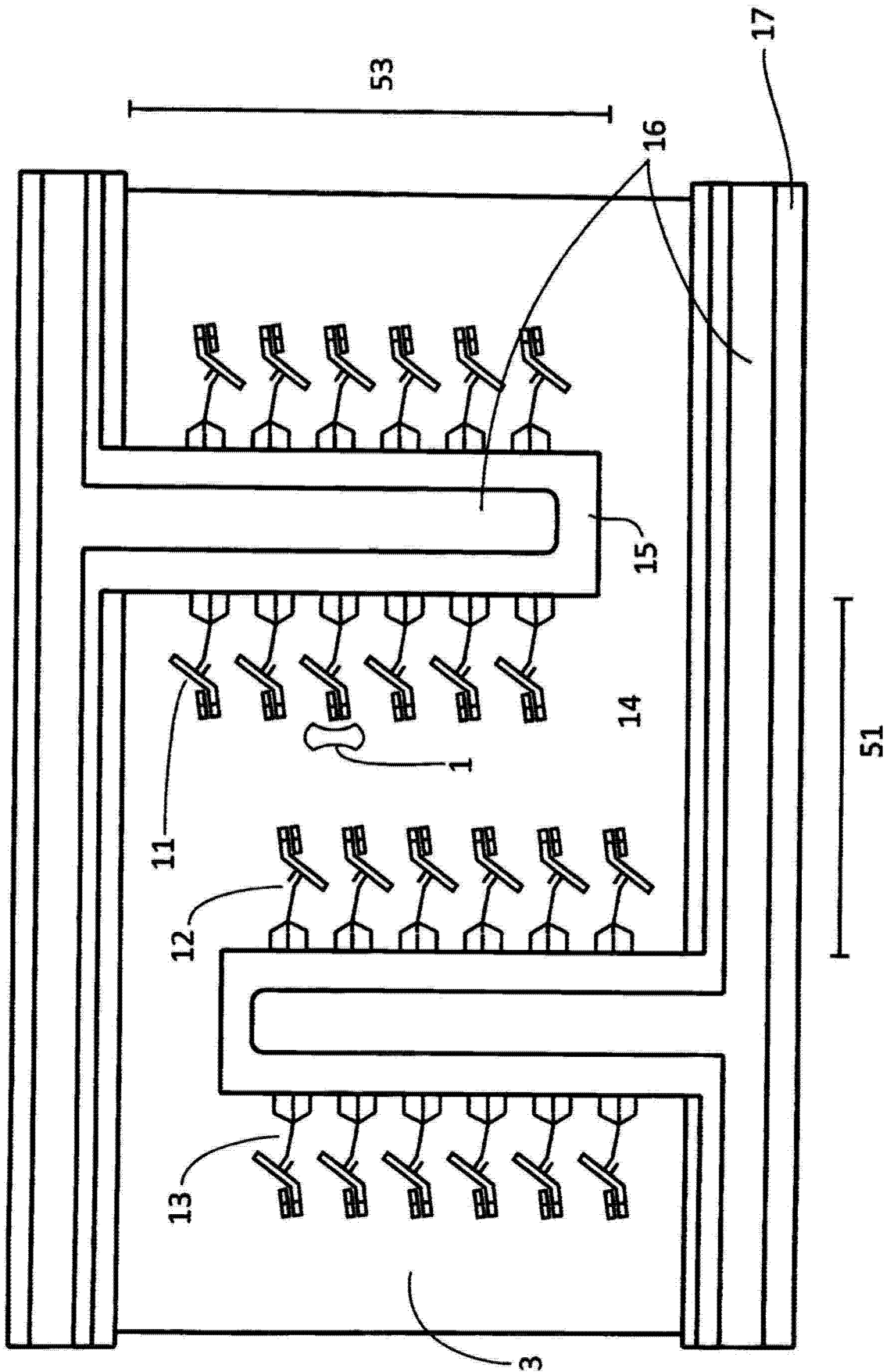


图 2

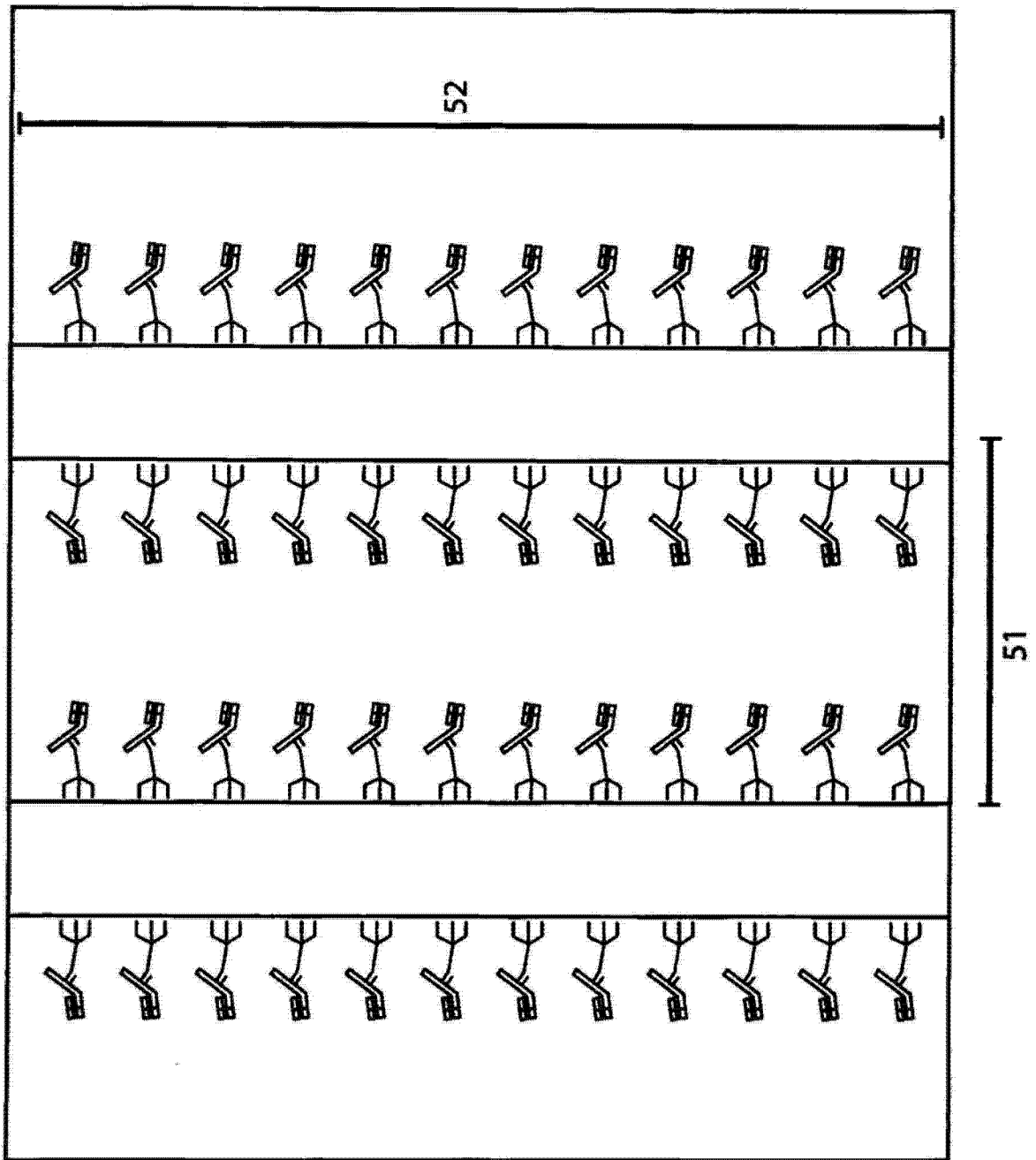


图 2A

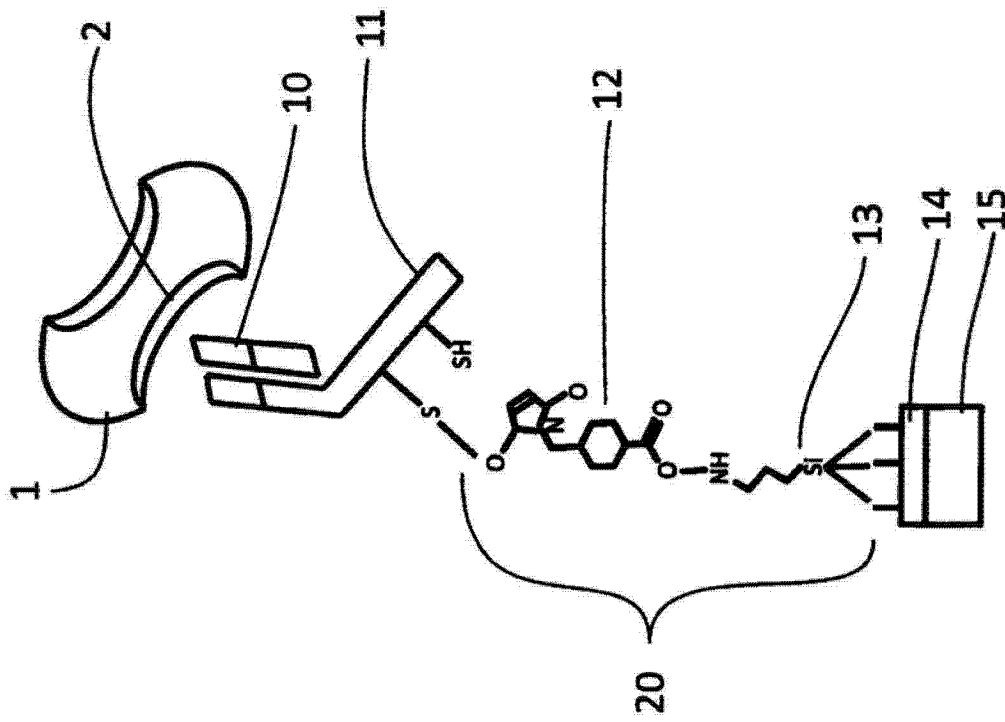


图 3

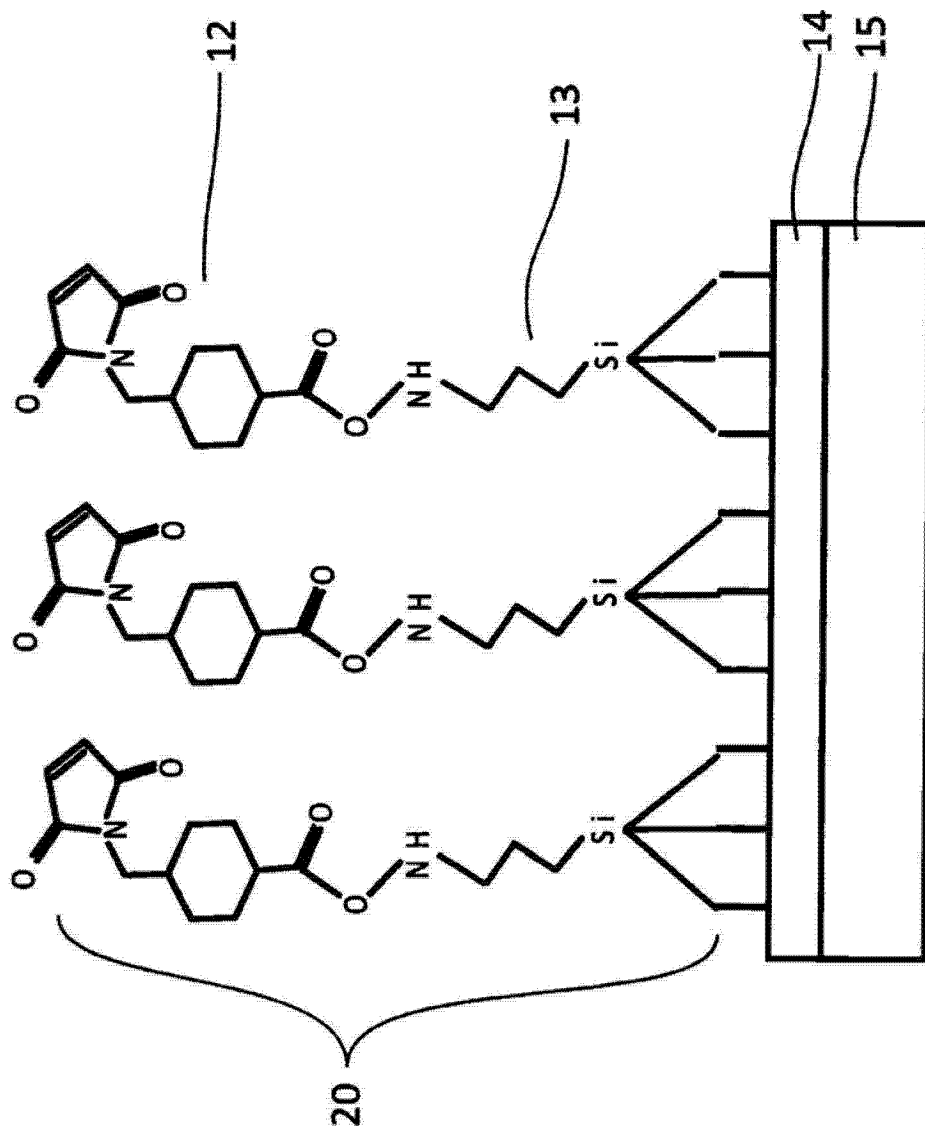


图 3A

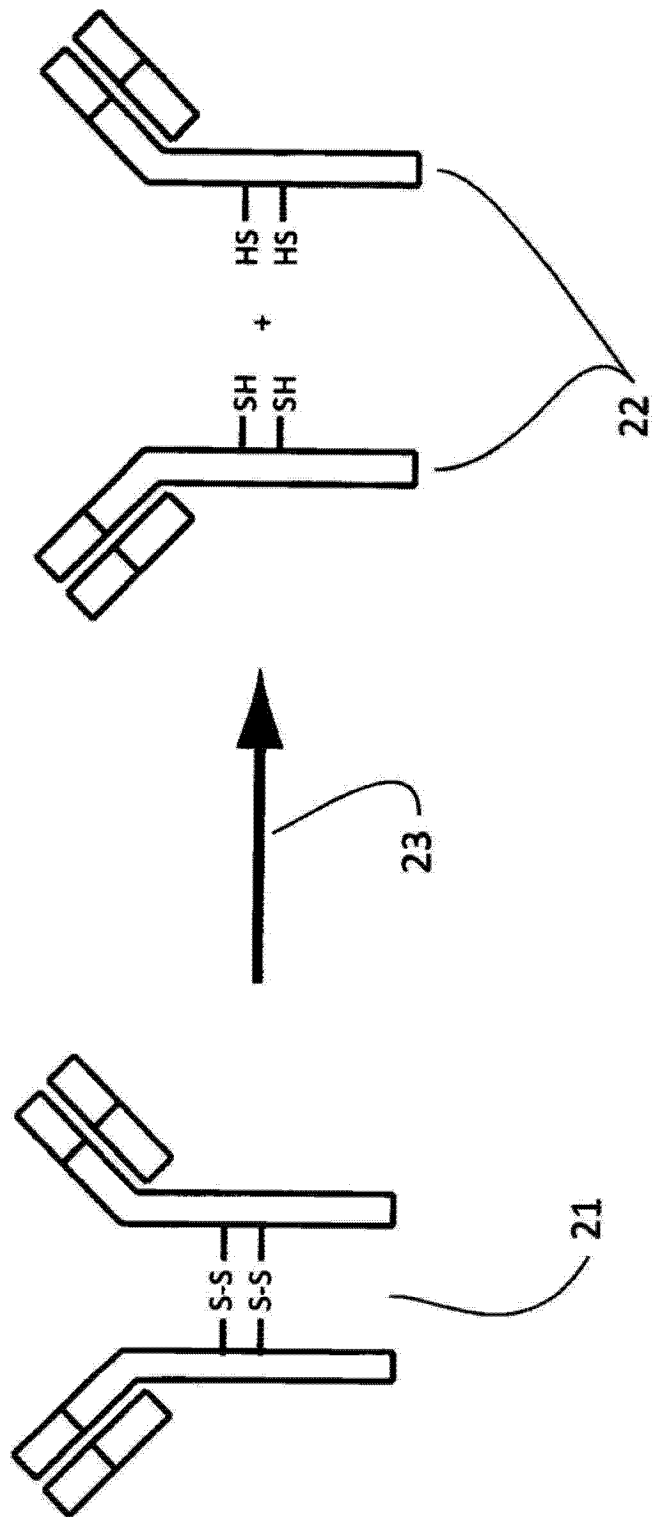


图 3B

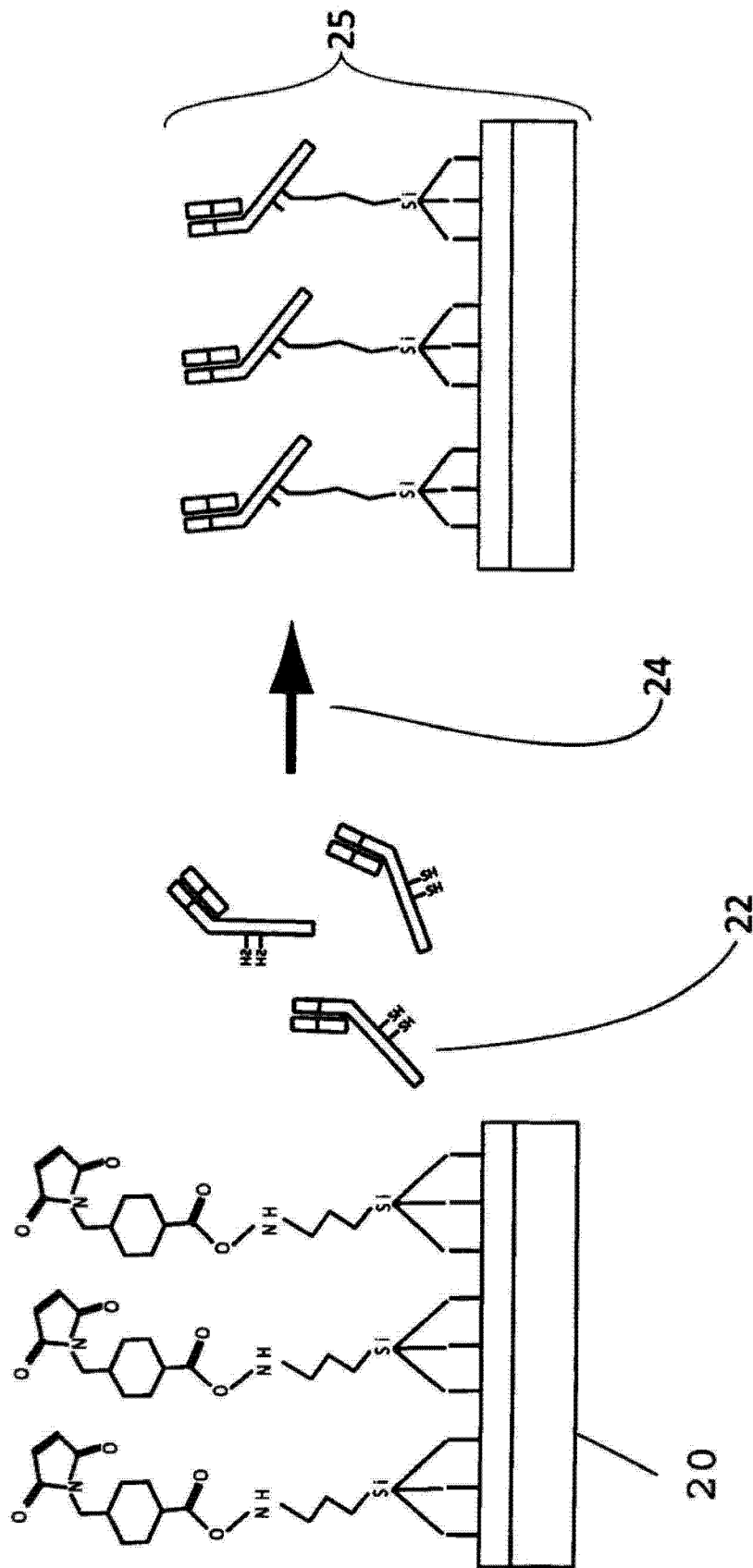


图 3C

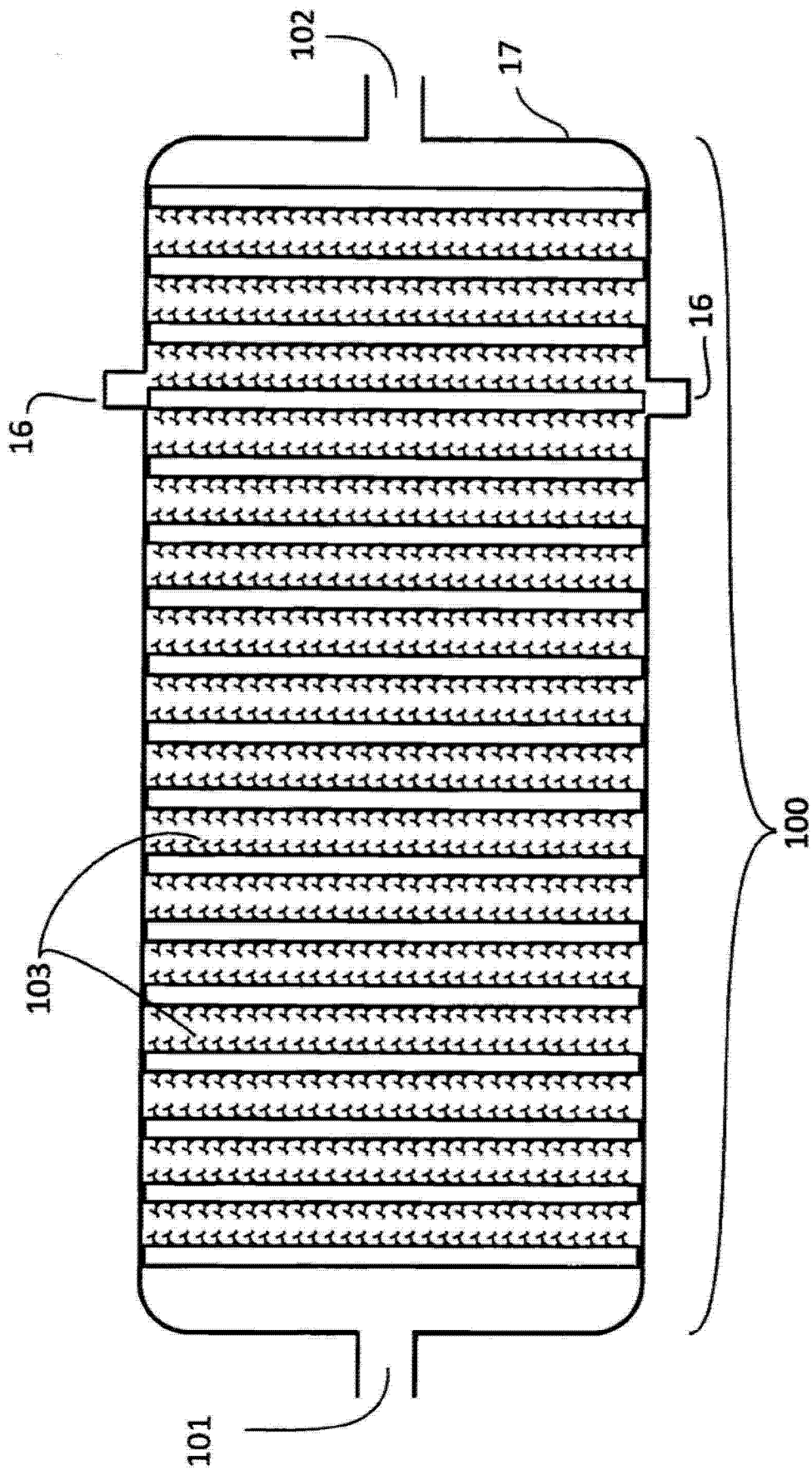


图 4

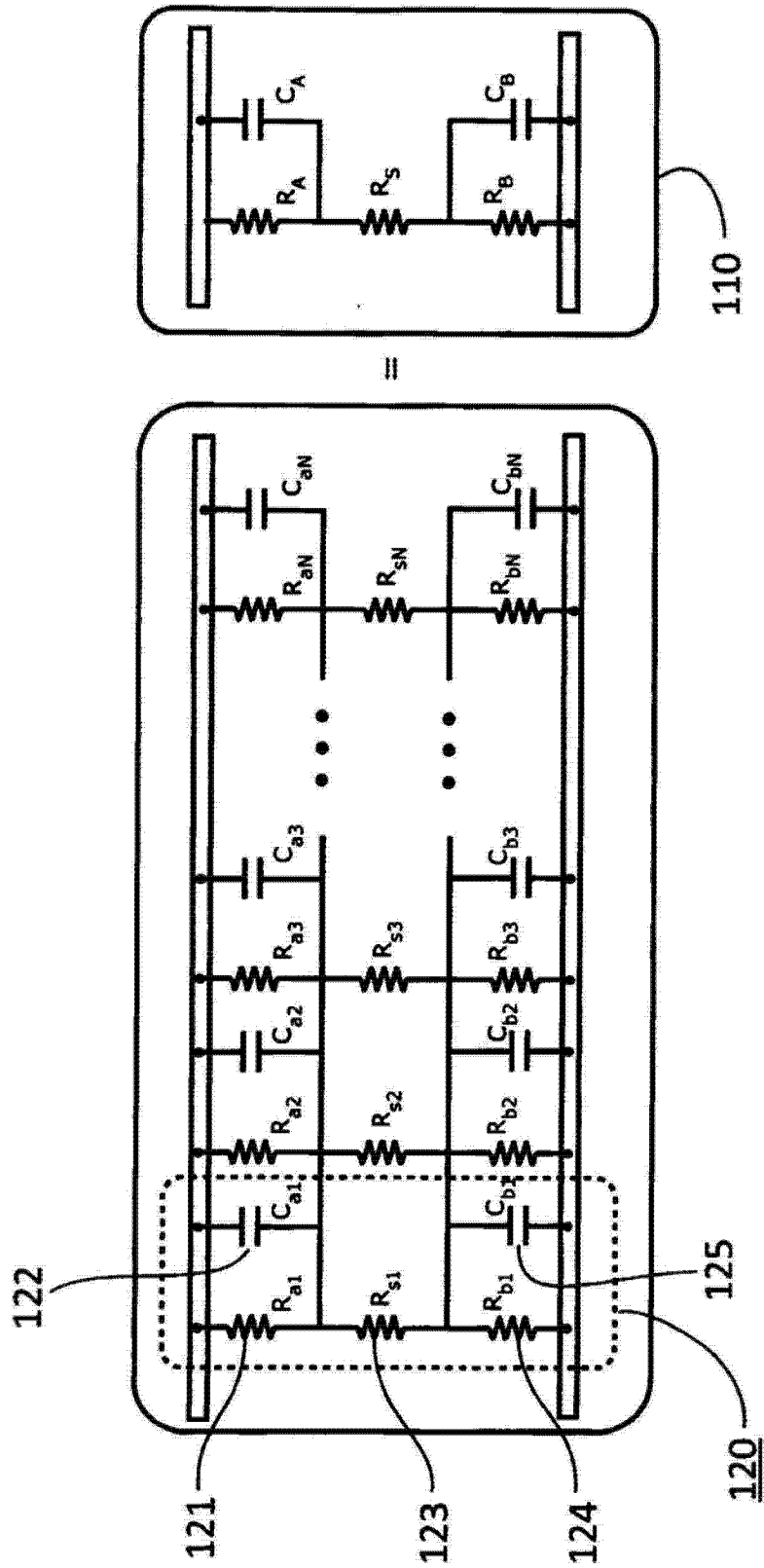


图 4A

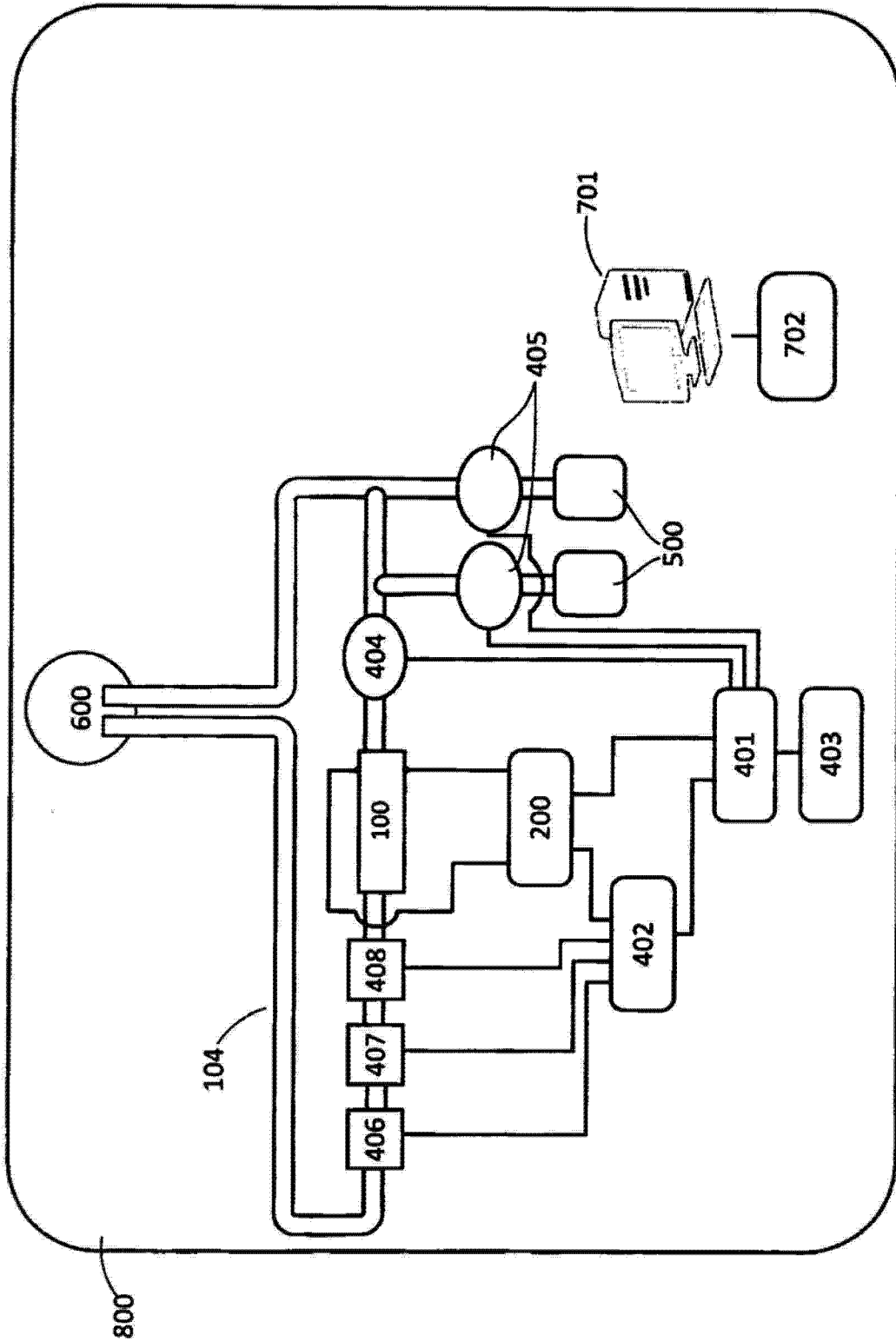


图 5

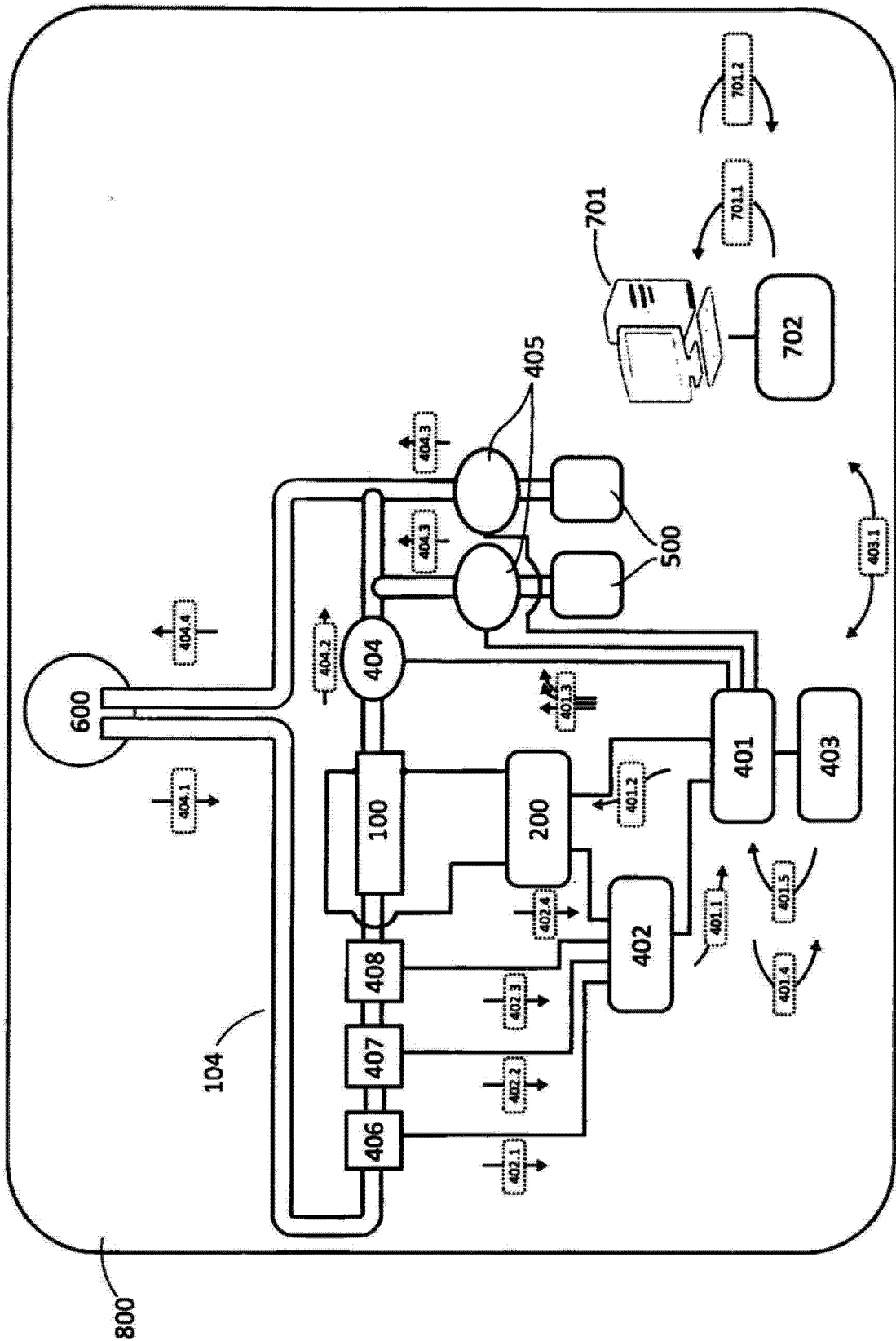


图 5A

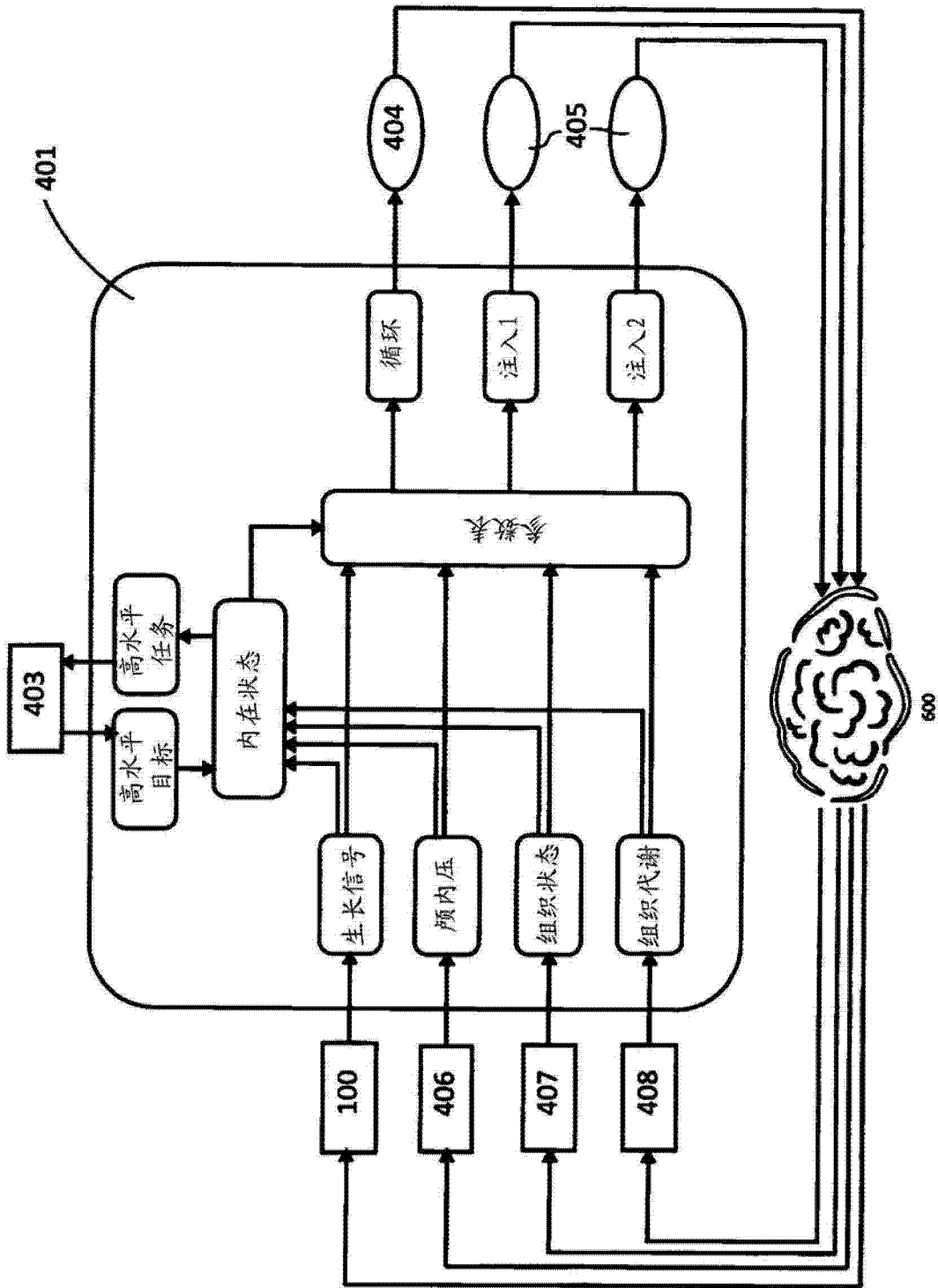


图 5B

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 通过使用半抗体生物传感器形成稳态环用于检测和调节血管内皮生长因子(VEGF)的方法和装置                                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103069270A</a>  | 公开(公告)日 | 2013-04-24 |
| 申请号            | CN201180040585.4  | 申请日     | 2011-06-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 药物代谢动力公司<br>叶赫沙·沙查尔<br>托马斯·陈<br>温斯顿·吴<br>布雷特·乔丹<br>海尔文·陈<br>帕拉丁·卢波夫<br>凯尔·齐默曼 |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 药物代谢动力公司<br>叶赫沙·沙查尔<br>托马斯·陈<br>温斯顿·吴<br>布雷特·乔丹<br>海尔文·陈<br>帕拉丁·卢波夫<br>凯尔·齐默曼 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 药物代谢动力公司<br>叶赫沙·沙查尔<br>托马斯·陈<br>温斯顿·吴<br>布雷特·乔丹<br>海尔文·陈<br>帕拉丁·卢波夫<br>凯尔·齐默曼 |         |            |
| [标]发明人         | 叶赫沙·沙查尔<br>托马斯·陈<br>温斯顿·吴<br>海尔文·陈<br>凯尔·齐默曼                                  |         |            |
| 发明人            | 叶赫沙·沙查尔<br>托马斯·陈<br>温斯顿·吴<br>布雷特·乔丹<br>海尔文·陈<br>帕拉丁·卢波夫<br>凯尔·齐默曼             |         |            |
| IPC分类号         | G01N27/327 G01N33/50 G01N33/53 G01N27/26                                      |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/5438 G01N33/74 G01N27/221 G01N33/48 G01N2333/475                       |         |            |
| 代理人(译)         | 姜建成   |         |            |
| 优先权            | 12/820830 2010-06-22 US   |         |            |
| 其他公开文献         | CN103069270B  |         |            |

## 摘要(译)

用于检测血管内皮生长因子 ( VEGF ) 杂交的生物传感器使用并联电容器的阵列来检测循环的VEGF与固定的VEGF单克隆半抗体 ( a-VEGF mhAb ) 的电化学结合。结合a-VEGF mhAb可调节电路的阈值电压，从而改变所述电路的阻抗。涂敷有p-Si底物的电极可增强所述VEGF分子之间的亲和力。流体单元送递VEGF样品到所述芯片的活性表面上。以互交叉模式排列的并联电容器的阵列可检测所述流体中的VEGF。所述检测器提供精确测量的和可计量速率的体内VEGF分子的变化，提供用于测量所述肿瘤对送递的化学治疗剂和生物反应调节剂 ( BRM ) 的反应的实时反馈，目的是确定肿瘤负荷和化学治疗的效力，作为治疗的稳态环的一部分。

