

(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2019-501383
(P2019-501383A)

(43) 公表日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/02 (2006.01)	GO 1 N 27/02	D 2 G O 6 O
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z 5 F 1 1 O
GO 1 N 27/00 (2006.01)	GO 1 N 27/00	J
HO 1 L 29/786 (2006.01)	HO 1 L 29/78	6 2 2

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2018-530021 (P2018-530021)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月8日 (2016.12.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月6日 (2018.8.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2016/051319
 (87) 国際公開番号 WO2017/098517
 (87) 国際公開日 平成29年6月15日 (2017.6.15)
 (31) 優先権主張番号 62/264, 913
 (32) 優先日 平成27年12月9日 (2015.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/264, 944
 (32) 優先日 平成27年12月9日 (2015.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501177609
 ラモット・アット・テル・アビブ・ユニバ
 ーシテイ・リミテッド
 RAMOT AT TEL AVIV U
 NIVERSITY LTD.
 イスラエル6139201テル・アビブ、
 ピー・オー・ボックス39296
 (74) 代理人 100105050
 弁理士 鷲田 公一
 (72) 発明者 パトルスキー フェルナンド
 イスラエル国 レホヴォト バステナイ
 ストリート 7/7
 (72) 発明者 クリヴィツキー ヴァディム
 イスラエル国 ブネイーアイシュ ハダケ
 ル ストリート 5エー/1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾ナノ構造体による検知のための方法およびシステム

(57) 【要約】

液体（例えば、液体）中のマーカー（例えば、マーカー）の存在および/またはその濃度を検出する方法を開示する。当該方法は、センサと前記液体とを接触させる工程であって、センサが、マーカーと相互作用する固定化された親和性部分を有し、且つ相互作用に反応して検出可能なシグナルを生じるように構成されている工程を含む。当該方法は、洗浄によってセンサから液体を取り除く工程と、洗浄の開始時点から所定時間の経過後に始まる時間窓内にセンサから受信した検出可能なシグナルに基づいて、マーカーの存在および/またはその濃度を検出する工程とを、さらに含む。

【選択図】 図7

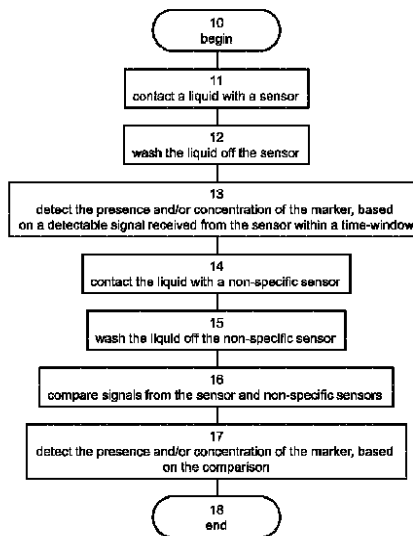


FIG. 7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体中のマーカーの存在および/またはその濃度を検出する方法であって、
センサと前記液体とを接触させる工程であって、前記センサが、前記マーカーと相互作用する固定化された親和性部分を有し、且つ前記相互作用に応答して検出可能なシグナルを生じるように構成されており、前記相互作用は、 10^{-5} M以下である K_d によって特徴付けられる工程と、

洗浄によって前記センサから前記液体を取り除く工程と、

前記洗浄の開始時点から所定時間の経過後に始まる時間窓内に前記センサから受信した検出可能なシグナルに基づいて、前記マーカーの存在および/またはその濃度を検出する工程と

を含む、方法。

【請求項 2】

前記マーカーがバイオマーカーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記液体が生物学的液体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出が、前記時間窓の始まる時点の前に前記センサから受信したシグナルに基づかない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出が、前記時間窓の始まる時点の前に前記センサから受信したシグナルに基づかない、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記所定時間が少なくとも 30 秒である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記所定時間が少なくとも 30 秒である、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記洗浄の開始時点から前記検出可能なシグナルのモニタリングを実施する工程と、前記シグナルの時間依存性の変化に基づいて、前記時間窓の始まりを特定する工程とをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記洗浄の開始時点から、前記検出可能なシグナルのモニタリングを実施する工程と、前記シグナルの時間依存性の変化に基づいて、前記時間窓の始まりを特定する工程とをさらに含む、請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記シグナルの変化率の絶対値が所定の閾値を下回った時点、前記時間窓の始まりとする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記シグナルの変化率の絶対値が所定の閾値を下回った時点、前記時間窓の始まりとする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記親和性部分が免疫原性部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記親和性部分が免疫原性部分を含む、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記免疫原性部分が抗体またはその断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫原性部分が抗体またはその断片を含む、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記免疫原性部分が抗体またはその断片を含む、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

前記免疫原性部分が抗原を含み、前記マーカーが、前記抗原に対する抗体を含むバイオマーカーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記免疫原性部分が抗原を含み、前記マーカーが、前記抗原に対する抗体を含むバイオマーカーである、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記親和性部分がリガンドを含み、前記マーカーが、受容体を含むバイオマーカーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記親和性部分がリガンドを含み、前記マーカーが、受容体を含むバイオマーカーである、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記液体を、前記マーカーに非特異的なセンサと接触させる工程と、前記非特異的なセンサからも洗浄によって前記液体を取り除く工程とをさらに含み、前記マーカーの存在および/またはその濃度の前記検出が、前記検出可能なシグナルと、前記非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較に基づく、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記液体を、前記マーカーに非特異的なセンサと接触させる工程と、前記非特異的なセンサからも洗浄によって前記液体を取り除く工程とをさらに含み、前記マーカーの存在および/またはその濃度の前記検出が、前記検出可能なシグナルと前記非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較に基づく、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

液体中のマーカーの存在および/またはその濃度を検出するためのシステムであって、検知チャンバと、前記検知チャンバ内のセンサとを有する流体デバイスであって、前記センサは、前記マーカーと相互作用する固定化された親和性部分を有し、且つ前記相互作用に応答して検出可能なシグナルを生じるように構成されており、前記相互作用が、 10^{-5} M 以下である K_D によって特徴付けられる、流体デバイスと、

前記センサを洗浄して前記液体を取り除くために、洗浄緩衝液を前記チャンバに導入する流動制御システムと、

前記マーカーの存在および/またはその濃度を検出するために、前記洗浄の開始時点から所定時間経過後に始まる時間窓にわたって前記センサから受信した検出可能なシグナルを分析するシグナル分析器とを具備する、システム。

【請求項 23】

前記シグナル分析器が、前記時間窓の始まる時点よりも前に前記センサから受信したシグナルを、前記分析から除外するように構成されている、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 24】

前記所定時間が少なくとも 30 秒である、請求項 22 または 23 に記載のシステム。

【請求項 25】

前記シグナル分析器が、前記洗浄の開始時点から前記検出可能なシグナルのモニタリングを実施し、前記シグナルの時間依存性の変化に基づいて、前記時間窓の始まりを特定するように構成されている、請求項 22 ~ 24 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 26】

前記シグナルの変化率の絶対値が所定の閾値を下回った時点、前記時間窓の始まりとする、請求項 25 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記流体デバイスが、前記検知チャンバ内に前記マーカーに非特異的なセンサをさらに備え、前記シグナル分析器が、前記検出可能なシグナルと前記非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較を行い、前記比較に基づいて、前記マーカーの存

10

20

30

40

50

在および/またはその濃度を検出するように構成されている、請求項 22 ~ 26 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 28】

前記センサがナノ構造体であり、前記親和性部分が、前記ナノ構造体の表面上に固定化されている、請求項 1 または 22 に記載の方法またはシステム。

【請求項 29】

前記センサがナノ構造体であり、前記親和性部分が、前記ナノ構造体の表面上に固定化されている、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法またはシステム。

【請求項 30】

前記センサがトランジスタである、請求項 1 または 22 に記載の方法またはシステム。

10

【請求項 31】

前記センサがトランジスタである、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法またはシステム。

【請求項 32】

前記センサが、チャンネルとしてナノ構造体を有するトランジスタであり、前記親和性部分が、前記ナノ構造体の表面上に固定化されている、請求項 1 または 22 に記載の方法またはシステム。

【請求項 33】

前記センサが、チャンネルとしてナノ構造体を有するトランジスタであり、前記親和性部分が、前記ナノ構造体の表面上に固定化されている、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法またはシステム。

20

【請求項 34】

前記トランジスタが電界効果トランジスタである、請求項 30 に記載の方法またはシステム。

【請求項 35】

前記トランジスタが電界効果トランジスタである、請求項 32 に記載の方法またはシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願

本出願は、2015年12月9日に提出された、米国特許仮出願第62/264,913号及び同第62/264,944号の両方の優先権を主張するものであり、これらの内容の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明のいくつかの実施形態は検知に関し、より詳細には、これらに限定されるものではないが、液体（例えば、これに限定されるものではないが、生物学的液体）中のマーカ（例えば、これに限定されるものではないが、バイオマーカー）を検出するための、方法およびシステムに関する。

【背景技術】

40

【0003】

主としてほとんどの生物試料が非常に多様性が高く複雑な混合物であるという事実故に、効率的な生体分子の分離および精製のための技法の開発は、現代のゲノミクス、プロテオミクス、およびバイオセンシングの領域において、非常に重要である。現在実践されている技法の大半は、特定の標的タンパク質を複雑な生物試料から迅速かつ選択的に分離および濃縮する能力に欠けており、lab-on-a-chip検知デバイスと統合することは困難である。

【0004】

半導体ナノワイヤーは、それらの表面上に吸着された化合物種に対して極めて高い感度を示すことが知られている。ナノワイヤー装置では、帯電した検体のナノワイヤー表面へ

50

の結合によって、コンダクタンス変化、又はワイヤー中を流れる電流の変化がもたらされる。1D(1次元)ナノスケール形態及び極めて大きい体積に対する表面比のおかげで、コンダクタンス変化は平面型のFET(電界効果トランジスタ)よりもナノワイヤーベースのセンサにおいてはるかに高く、単一の分子検出が可能である程度まで感度を増大できる。

【0005】

従って、ナノワイヤーベースの電界効果トランジスタ(NW-FET)は、ここ10年で化学的及び生物学的な化合物種を検出するための強力な新しいセンサになりうると考えられてきた。例えば、その全てが本明細書に示されるかのようになり、参照により組み込まれる、Patolsky et al., *Analytical Chemistry* 78,4260-4269(2006)、Stern et al., *IEEE Transactions on Electron Devices* 55,3119-3130(2008)、Cui et al., *Science* 293,1289-1292(2001)、及びPatolsky et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101,14017-14022(2004)を参照されたい。

10

【0006】

例えばDNA及びタンパク質等の、医療診断に関連する多数の生体分子種の同時多重検出のためのナノワイヤー電気装置の研究も行われきた(Zheng et al., *Nature Biotechnology* 23,1294-1301(2005)、Timko et al., *Nano Lett.* 9,914-918(2009)、及びLi et al., *Nano Lett.* 4,245-247(2004))。

【0007】

一般に、NW-FET構成では、ゲート電位が所定のソースドレイン電圧(VSD)のチャンネルコンダクタンスを制御し、ゲート電圧(VGD)の調節によって測定されるソースドレイン電流(ISD)が変化する。FETとして動作するNWセンサの場合、NW内部の担体伝導に対する帯電した分子の電場ゲーティング効果が検知機構となる。マイクロサイズ材料又はバルク材料から形成されている装置と比較して、ナノ装置の高い感度は、小さい寸法とより大きい表面/体積比とに密接に関連している。生物学的検体分子の殆どが固有の電荷を有するため、ナノワイヤー表面に対する結合は、半導体SiNWに対する分子ゲートの役割をはたすことができる(上述のCui et al., 2001)。

20

【0008】

結合親和性を使って代謝産物を標的化する抗体/酵素ナノワイヤーFETが、例えば、Lu et al. *Bioelectrochemistry* 2007,71(2):211-216、Patolsky et al. *Nanowire-based biosensors*. *Anal Chem* 2006,78(13):4260-4269、及びYang et al. *Nanotechnology* 2006,17(11):S276-S279に開示されている。

30

【0009】

酸化反応によって代謝産物を検出する、電気化学的に高感度のナノワイヤーセンサは、例えば、Lu et al. *Biosens Bioelectron* 2009,25(1):218-223、Krivitsky et al. *Nano letters* 2012,12(9):4748-4756、Shao et al. *Adv Funct Mater* 2005,15(9):1478-1482、Su et al. *Part Part Syst Char* 2013,30(4):326-331、及びTyagi et al. *Anal Chem* 2009,81(24):9979-9984に開示されている。

【0010】

米国特許第7,619,290号、米国特許出願公開第2010/0022012号及び対応出願は、とりわけ、センサとして使用できる官能化ナノワイヤーから構成されたナノスケール装置を教示している。

40

【0011】

Clavaguera et al.は、化学的に官能化されたケイ素ナノリボン電界効果トランジスタを使用した、神経剤のサブppm検出のための方法を開示した(Clavaguera et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010,49,1-5)。

【0012】

SiO₂表面化学は、分散された応答を介してアセトン蒸気及びヘキサン蒸気を区別することができる「ナノ電子鼻」ライブラリーの構成に使用されている(*Nature Materials* Vol.6, 2007, pp.379-384)。

50

【0013】

米国特許出願公開第2010/0325073号は、気体状のNOを吸収するように設計されたナノ装置を開示している。国際公開第2011/000443号には、官能化ナノワイヤーを使用して、ニトロ含有化合物を検出するナノ装置が記載されている。

【0014】

Duan et al. [Nature Nanotechnology, Vol. 7, 2012, pp. 174-179] は、シリコンナノワイヤFET検出器と、FETを細胞内流体(細胞質基質)に接続する電氣的に絶縁性のSiO₂ナノチューブとを記載している。膜電位差Vmが変化するとき、ナノチューブ内の細胞質基質の電位が変動して、FETのコンダクタンスGを変化させる。

【0015】

Kosaka et al. [Nature Nanotechnology, Vol. 9, 2014, pp. 1047-1053] は、表面固定型抗体を使用する、血清中のがんバイオマーカーの検出を開示している。

【0016】

Krivitsky et al. [Nano letters 2012, 12(9): 4748-4756] は、全血および他の複雑な生物試料の直接分析のための、オンチップ包括的SiNWフィルタリング/選択的分離/脱塩/予備濃縮プラットフォームを記載している。最初に、極めて大きな結合表面積を有する、粗度が制御された抗体修飾SiNWフォレストを使用して、未処理の生物試料から必要なタンパク質分析物を分離し、次に、制御された液体媒体中に標的タンパク質を放出させ、その後、同じチッププラットフォーム上で作製されたSiNW型FETアレイによって、標的タンパク質を検出する。

【0017】

国際公開第2015/059704号は、1つ以上の試料チャンバと流体連通した、酸化還元反応性ナノ構造体FETアレイを用いる1つ以上の検知コンパートメントを具備した、一体化されたマイクロ流体ナノ構造体検知システムを開示する。当該システムによる、生理学的溶液における細胞代謝活性の多重リアルタイムモニタリングが示されており、オーダーメイド医療のための代謝ネットワークと、癌の要件との理解を進めるうえで効率的なツールであることが明示されている。

【0018】

さらなる背景技術としては、例えば、Chen et al., Nano Today (2011) 6, 131-54およびそこで引用されている参考文献、ならびにStern et al., Nature Nanotechnology, 2009が挙げられる。

【発明の概要】

【0019】

本発明の一部の実施形態の一態様によれば、液体中のマーカーの存在および/またはその濃度を検出する方法が提供される。当該方法は、センサと前記液体とを接触させる工程であって、センサが、マーカーと相互作用する固定化された親和性部分を有し、且つ相互作用に応答して検出可能なシグナルを生じるように構成されている工程を含む。当該方法は、洗浄によってセンサから液体を取り除く工程と、洗浄の開始時点から所定時間の経過後に始まる時間窓内にセンサから受信した検出可能なシグナルに基づいて、マーカーの存在および/またはその濃度を検出する工程とをさらに含む。

【0020】

本発明の一部の実施形態によれば、マーカーはバイオマーカーである。

【0021】

本発明の一部の実施形態によれば、液体は生物学的液体である。

【0022】

本発明の一部の実施形態によれば、検出は、時間窓の始まる時点の前にセンサから受信したシグナルに基づかない。

【0023】

本発明の一部の実施形態によれば、所定時間は少なくとも30秒である。

【0024】

10

20

30

40

50

本発明の一部の実施形態によれば、方法は、洗浄の開始時点から検出可能なシグナルをモニタリングを実施する工程と、シグナルの時間依存性の変化に基づいて、時間窓の始まりを特定する工程とを含む。

【0025】

本発明の一部の実施形態によれば、親和性部分は免疫原性部分を含む。

【0026】

本発明の一部の実施形態によれば、免疫原性部分は抗体またはその断片を含む。

【0027】

本発明の一部の実施形態によれば、免疫原性部分は抗原を含み、マーカーは、抗原に対する抗体を含むバイオマーカーである。

【0028】

本発明の一部の実施形態によれば、親和性部分はリガンドを含み、マーカーは、受容体を含むバイオマーカーである。

【0029】

本発明の一部の実施形態によれば、方法は、液体を、マーカーに非特異的なセンサと接触させる工程と、非特異的なセンサから洗浄によって液体を取り除く工程とを含み、マーカーの存在および/またはその濃度の検出は、検出可能なシグナルと非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較に基づく。

【0030】

本発明の一部の実施形態の一態様によれば、液体中のマーカーの存在および/またはその濃度を検出するためのシステムが提供される。当該システムは、検知チャンバと、検知チャンバ内のセンサとを有する流体デバイスであって、センサは、マーカーと相互作用する固定化された親和性部分を有し、且つ相互作用に応答して検出可能なシグナルを生じるように構成されている流体デバイスと、センサを洗浄して液体を取り除くために、洗浄緩衝液を前記チャンバに導入する流動制御システムと、マーカーの存在および/またはその濃度を検出するために、洗浄の開始時点から所定時間の経過後に始まる時間窓にわたってセンサから受信した検出可能なシグナルを分析するシグナル分析器とを具備する。

【0031】

実施形態のいずれかでは、相互作用は、場合によっては、 10^{-5} M以下である K_D 、または 10^{-6} M以下である K_D 、または 10^{-7} M以下である K_D 、または 10^{-8} M以下である K_D 、または 10^{-9} M以下である K_D 、または 10^{-10} M以下である K_D によって特徴付けられることが好ましい。

【0032】

本発明の一部の実施形態によれば、シグナル分析器は、時間窓の始まる時点の前にセンサから受信したシグナルを、分析から除外するように構成されている。

【0033】

本発明の一部の実施形態によれば、シグナル分析器は、洗浄の開始時点から検出可能なシグナルのモニタリングを実施し、シグナルの時間依存性の変化に基づいて、時間窓の始まりを特定するように構成されている。

【0034】

本発明の一部の実施形態によれば、シグナルの変化率の絶対値が所定の閾値を下回った時点と、時間窓の始まりとする。

【0035】

本発明の一部の実施形態によれば、流体デバイスは、検知チャンバ内のマーカーに非特異的なセンサをさらに備え、シグナル分析器は、検出可能なシグナルと非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較を行い、比較に基づいて、マーカーの存在および/またはその濃度を検出するように構成されている。

【0036】

本発明の一部の実施形態によれば、センサはナノ構造体であり、親和性部分は、ナノ構造体の表面上に固定化されている。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明の一部の実施形態によれば、センサはトランジスタである。

【0038】

本発明の一部の実施形態によれば、センサは、チャンネルとしてナノ構造体を有するトランジスタであり、親和性部分は、ナノ構造体の表面上に固定化されている。

【0039】

本発明の一部の実施形態によれば、トランジスタは電界効果トランジスタである。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態について、その例示のみを目的として添付の図面を参照して本明細書に記載する。以下、特に図面を詳細に参照して示される事項は、例示を目的とし、また本発明の実施形態の詳細な説明を目的とすることを強調する。同様に、図面と共に示す説明は、本発明の実施形態をどのように実践し得るかを当業者に明らかにする。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1-1】図1A~1Bは、本発明の一部の実施形態に係る、直径20nmのP型シリコンナノワイヤ(SiNW)FETデバイスの画像を示す図である。

【図1-2】図1C~1Gは、本発明の一部の実施形態に係る、直径20nmのP型シリコンナノワイヤ(SiNW)FETデバイスの作製過程の概略図である。

【図2】図2は、本発明の一部の実施形態に係る、抗体によるSiNW FETデバイスの修飾のための過程についての、概略図である。

【図3】図3は、本発明の一部の実施形態に係る実験において、複数のSiNW FETを収容する流体システムへの洗浄緩衝液の導入に続く、抗原含有緩衝液の導入によって得られた、例示的な抗体修飾SiNW FETの応答較正曲線を示す図である。

【図4】図4は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、生物試料中の、抗体修飾SiNW FETの較正された応答を示す図である。

【図5】図5は、図4の生物試料の存在下の応答較正曲線を示す図である。ただし、応答較正曲線は、本発明の一部の実施形態に係る洗浄操作の開始後のものである。

【図6】図6は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、洗浄操作の開始後に生物試料の存在下で取得可能な2つの応答較正曲線を示す図である。

【図7】図7は、本発明の一部の実施形態に係る、生物学的液体中のバイオマーカーの存在および/またはその濃度の検出に適した方法を概略的に図示する、フローチャートである。

【図8】図8Aおよび8Bは、本発明の一部の実施形態に従った使用に適したセンサの概略図である。

【図9】図9は、本発明の一部の実施形態に係る、液体(例えば、生物学的液体)中のマーカー(例えば、バイオマーカー)の存在および/またはその濃度を検出するためのシステムの概略図である。

【図10】図10は、本発明の一部の実施形態に係る、抗体修飾SiNW FET検知デバイスによる抗原の検出について、動作原理を説明する概略図である。

【図11】図11は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、未処理の血清試料中の様々な濃度の標的抗原CA15-3に対する、代表的な抗CA15-3固定化SiNW FET検知デバイスの、正規化された会合応答を示す図である。

【図12】図12は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、代表的な抗トロポニン抗体修飾SiNW FET検知デバイスによる、低イオン強度条件下でのその特異的抗原であるトロポニンTの会合および解離に対する、正規化された電氣的応答を示す図である。

【図13】図13は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、低流速条件下での血清中の抗トロポニン抗体の解離曲線と、その当てはめ曲線を示す図である。

【図14】図14Aおよび14Bは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、トロポニンT抗原含有血清試料と、対照であるトロポニンT不含血清試料との間で、

10

20

30

40

50

解離の動力学を比較した結果を示す図である。

【図15】図15は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、低流速条件下での血清解離曲線と、その当てはめ曲線とを示す図である。

【図16】図16は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、低流速条件下での血清中の抗CA15-3抗体の解離曲線と、その当てはめ曲線とを示す図である。

【図17A】図17Aは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分1チャンバ体積交換という流量における、未処理の血清試料中のCA15-3抗原の濃度依存的検知を示す図である。

【図17B】図17Bは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分1チャンバ体積交換という流量における、未処理の血清試料中のCA15-3抗原の濃度依存的検知を示す図である。

【図17C】図17Cは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分1チャンバ体積交換という流量における、未処理の血清試料中のCA15-3抗原の濃度依存的検知を示す図である。

【図17D】図17Dは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分1チャンバ体積交換という流量における、未処理の血清試料中のCA15-3抗原の濃度依存的検知を示す図である。

【図18】図18は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、CA15-3抗原に対する抗体で修飾されたナノワイヤデバイスからの、CA15-3抗原の再生曲線を示す図である。

【図19A】図19Aは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分330チャンバ体積交換という流量での、特異的に化学修飾されたSiNW FETデバイスと、非特異的に化学修飾されたSiNW FETデバイスとを使用した、CA15-3抗原の多重単一チップ差分検出の実例を示す図である。

【図19B】図19Bは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、毎分330チャンバ体積交換という流量での、特異的に化学修飾されたSiNW FETデバイスと、非特異的に化学修飾されたSiNW FETデバイスとを使用した、CA15-3抗原の多重単一チップ差分検出の実例を示す図である。

【図20】図20は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、高流速条件下での抗原不含血清の解離曲線と、その当てはめ曲線とを示す図である。

【図21】図21は、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、低流速条件下での未処理の抗原不含血液の解離曲線と、その当てはめ曲線とを示す図である。

【図22】図22Aおよび22Bは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、ウォーターゲート構成下におけるp型SiNW FETナノデバイスの電気的特徴を示す図である。

【図23A】図23Aは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、SiNWの走査電子顕微鏡(SEM)像を示す図である。

【図23B】図23Bは、本発明の一部の実施形態に係る実験において得られた、SiNWの走査電子顕微鏡(SEM)像を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本発明のいくつかの実施形態は検知に関し、より詳細には、これらに限定されるものではないが、液体(例えば、これに限定されるものではないが、生物学的液体)中のマーカー(例えば、これに限定されるものではないが、バイオマーカー)を検出するための、方法およびシステムに関する。

【0043】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、必ずしもその用途が、以下の記載によって提供される説明、ならびに/あるいは図面及び/又は実施例で示される具体例によって明示されるような詳細な構成及び要素や方法の組み立てに限定されるものではないことを理解するべきである。本発明は、他の実施形態が可能であり、又

10

20

30

40

50

、さまざまな方法で実践若しくは遂行することが可能である。

【0044】

本発明者らは、液体中のマーカの検知に使用可能であり、所望により、そして好ましくはその存在、より好ましくはその量のモニタリングに使用可能な、検知システムおよび検知方法を設計した。本検知システムおよび検知方法を、多くの種類の液体中の多くの種類のマーカに対する多重リアルタイムモニタリングに使用することができる。

【0045】

本明細書の実施形態の検知システムは、これらに限定されるものではないが、化学的用途、遺伝学的用途、生化学的用途、薬学的用途、生物医学的用途、医療用途、放射線学的用途及び環境への用途を含む多数の用途に使用することができる。

10

【0046】

医学用途の場合、本実施形態の検知システムおよび検知方法は、生理溶液等の生物学的液体中のバイオマーカの存在、より好ましくは、レベルのモニタリングに適している。

【0047】

環境学的用途の場合、本実施形態の検知システムおよび検知方法は、水中の危険物質の存在、好ましくはそのレベルのモニタリングに最適である。当該マーカは、水汚染物質、化学薬品、生物体、または水中の放射能の状態の指標となるが、これらに限定されるものではない。

【0048】

液体は、全血または血液成分のいずれかの血液製品を含む液体でもよい。例えば、液体は、血液試料である。液体は他の体液を含んでもよく、他の体液としては、唾液、脳脊髄液、尿などが挙げられるが、これらに限定されない。液体は、核酸溶液、タンパク質溶液、ペプチド溶液、抗体溶液などの緩衝液または溶液でもよいが、これらに限定されない。1種以上の生物学的または化学的な試薬を含む液体も想定内であるが、このような試薬としては、酸化剤、還元剤、酵素、受容体リガンド、細胞外成分、代謝物質、脂肪酸、ステロイドなどが挙げられ、これらに限定される物ではない。本実施形態のシステムおよび方法でマーカを検知することができる液体の代表的な例としては、水、食塩水、尿、血液、精液、唾液、粘液、月経液、リンパ液、脳脊髄液、腔滲出液、膿、嘔吐物、汗、および無機液体（これらに限定されないが、石油系液体、油、または他の滑剤）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0049】

本発明の一部の実施形態によれば、マーカ（例えば、バイオマーカ）を含む液体（例えば、生物学的液体）を、当該マーカと相互作用する固定化された親和性部分を有し、当該相互作用に应答して検出可能なシグナルを生じるように構成されているセンサを備える流体システムに導入する。この相互作用は、所望により、そして好ましくは、 10^{-5} M以下である K_D 、または 10^{-6} M以下である K_D 、または 10^{-7} M以下である K_D 、または 10^{-8} M以下である K_D 、または 10^{-9} M以下である K_D 、または 10^{-10} M以下である K_D によって特徴付けられる。液体に由来するマーカは、親和性部分に選択的に結合する。塩および生体分子等が挙げられるが、これらに限定されない、あらゆる種類の物体が含まれ得るバックグラウンド成分が、センサの表面に非特異的に吸着され得る。

40

【0050】

マーカがセンサの表面に選択的に吸着された後、センサを洗浄緩衝液で洗浄する。この結果、バックグラウンド成分がセンサの表面から脱着する。マーカと親和性部分との間の相互作用はバックグラウンド成分とセンサの表面との相互作用より強いので、バックグラウンド成分はマーカよりもはるかに速くセンサの表面から離れる。マーカのセンサからの脱着の動力学は、バックグラウンド成分のすべてまたは大半が洗い流された後で検出することが好ましい。

【0051】

以下の実施形態は、生物学的液体中のバイオマーカを特に強調して記述されているが

50

、他の種類のマーカーおよび他の種類の液体も想定内であることを理解されたい。

【0052】

本実施形態のシステムは、所望により、そして好ましくは、単一チップ上での生物試料の直接分析を提供する。本実施形態のシステムは、望ましくない成分（塩、生体分子、タンパク質、細胞等）を除去しつつ、少ない存在量の特定のバイオマーカーを選択的に検出することができる。遠心分離、脱塩、およびアフィニティカラムといった操作は時間が掛かることが知られているので、好ましくはこれらのうちの少なくとも1つを行わずに、より好ましくはいずれをも行うことなく分析を行う。本発明の一部の実施形態において、分析過程は、15分未満、または10分未満、または5分未満で行われる。

【0053】

本発明の一部の実施形態において、生物試料中のバイオマーカーの量も測定される。この測定は、例えば、一部のセンサが親和性部分を含み、一部のセンサが親和性部分を含まないシステムを提供することによって行うことができる。親和性部分を含まないセンサからの脱着を、バックグラウンドと定める。親和性部分を含むセンサからのバイオマーカーの脱着の動力学を、所望により、そして好ましくは、このバックグラウンドと比較し、この比較に基づいて、親和性部分を含むセンサから脱着したバイオマーカーの量を、例えば、互いのシグナルを差し引くことによって決定する。表面へのバイオマーカーの比吸収率は、生物試料中のバイオマーカーの濃度に比例するので、バックグラウンドを超える脱着の動力学は、濃度依存的である。

【0054】

次に、本発明の一部の実施形態に係る、液体（例えば、生物学的液体）中のマーカー（例えば、バイオマーカー）の存在および/またはその濃度の検出に適した方法を概略的に図示するフローチャートである、図7を参照する。

【0055】

別段の規定がない限り、以下に記載する操作は、多くの組合せまたは実行の順序で、同時または連続的のいずれかで実行することができることを理解されたい。具体的には、フローチャートの順序付けは限定と解釈されるものではない。例えば、以下の記載またはフローチャートに登場する、特定の順序の2つ以上の操作を、異なる順序で（例えば、逆順序で）、または実質的に同時に実行することができる。さらに、以下に記載されるいくつかの操作は任意選択であり、実行しなくてもよい。

【0056】

本方法は10で始まり、所望により、そして好ましくは、11に続き、液体をセンサと接触させる。この接触は、当技術分野において公知の任意の技法によって達成することができる。必ずしも必須ではないが、センサは、流体システム内に存在することが好ましく、マイクロ流体システム内に存在することがより好ましく、液体を流体システム内に導入することが好ましい。

【0057】

図8Aおよび8Bは、本実施形態に適したセンサの概略図である。図8Aは、固定化された親和性部分48を含むセンサ20を示す。本実施形態の技法で使用されるセンサは、マーカーまたはバイオマーカーの存在下で検出可能なシグナルを発する、任意の電位差測定センサとすることができる。

【0058】

検出可能なシグナルは、多くの場合、センサの電気特性（電気伝導度、抵抗率、キャパシタンス）がマーカーまたはバイオマーカー50との相互作用に反応して変動したときに発生する。一部の実施形態では、センサはトランジスタである。これらの実施形態では、所望により、そして好ましくは、部分48がトランジスタのチャネルの表面に固定化されている。

【0059】

一部の実施形態によれば、センサはナノ構造体であり、親和性部分は、ナノ構造体の表面上に固定化されている。本発明の一部の実施形態によれば、センサは、チャネルとして

10

20

30

40

50

ナノ構造体を有するトランジスタであり、親和性部分は、ナノ構造体の表面上に固定化されている。

【0060】

一部の実施形態によれば、センサは、非ナノメートル規模の構造体である。これらの実施形態では、親和性部分がある上に固定された構造体のすべての寸法（長さ、幅、および厚さ）は、1000 nm超、または10 μm超、または100 μm超、または1 mm超である。

【0061】

本発明の一部の実施形態によれば、センサは、チャンネルとして非ナノメートル規模の構造体を有するトランジスタであり、親和性部分は、ナノ構造体の表面上に固定化されている。

10

【0062】

本発明の一部の実施形態によれば、トランジスタは、電界効果トランジスタ（FET）である。

【0063】

センサがトランジスタ（例えば、FET）を備え、親和性部分がトランジスタのチャンネル上に固定化されているとき、チャンネルの電気特性の変化は、トランジスタのゲート電圧に対する特徴的な応答（例えば、ゲート電圧の関数としての、ソース-ドレイン間電流）の変化を誘起することがあり、この変化を検出および分析することができる。

【0064】

図8Aは、センサ20が、ナノ構造体等であるがこれに限定されない構造体40を備え、親和性部分48が構造体40の表面上に固定化されている実施形態を図示する。

20

【0065】

親和性部分48は、液体または生物学的液体中のマーカーまたはバイオマーカー50と特異的に反応する（例えば、結合する）のに有効である。

【0066】

センサ20は、親和性部分48と、マーカーまたはバイオマーカー50との相互作用に反応して検出可能なシグナル、多くの場合、電気的シグナルを生じるように構成されている。

【0067】

本明細書において使用される「親和性部分」という用語は、所定の親和性で、好ましくはマーカーまたはバイオマーカーと特異的に結合する分子を指す。

30

【0068】

親和性部分48と、マーカーまたはバイオマーカー50とは、所望により、そして好ましくは、親和性ペアを形成する。ここで部分48は、マーカーまたはバイオマーカー50に対して、不可逆的又は可逆的に結合することができる。部分48とマーカーまたはバイオマーカー50との間の相互作用は、一般的に、共有結合の特徴的な親和度と比較して弱いことで特徴付けられ、これは K_D で表した場合、典型的には約 10^{-15} Mに相当する。本発明の実施形態のいずれかでは、部分48とマーカーまたはバイオマーカー50との間の相互作用は、好ましくは 10^{-5} M以下である K_D 、または 10^{-6} M以下である K_D 、または 10^{-7} M以下である K_D 、または 10^{-8} M以下である K_D 、または 10^{-9} M以下である K_D 、または 10^{-10} M以下である K_D によって特徴付けられる。

40

【0069】

親和度を測定する方法は当技術分野において周知であり、表面プラズモン共鳴および競合アッセイが挙げられる。

【0070】

親和性部分は、天然に存在するものであっても、合成により設計または作製されたものであってもよい。

【0071】

親和性部分の例としては、抗体-抗原（免疫原性部分）、リガンド-受容体（例えば、

50

可溶性または膜結合型受容体)、炭水化物-レクチン、RNA-アプタマー、核酸配列相補性などにおける、構成要素が挙げられる。

【0072】

本発明の一部の実施形態によれば、親和性部分は免疫原性部分を含む。本発明の一部の実施形態によれば、免疫原性部分は抗体またはその断片を含む。本発明の一部の実施形態によれば、免疫原性部分は抗原を含む。これらの実施形態では、マーカーは、好ましくはこの抗原に対する抗体を含むバイオマーカーである。本発明の一部の実施形態によれば、親和性部分はリガンドを含む。これらの実施形態では、マーカーは、受容体を含むバイオマーカーであることが好ましい。

【0073】

部分48は、当技術分野において公知の任意の技法により、ナノ構造体40の表面に結合させることができる。このような技法は、例えば、抗体捕捉単位の断片化に基づく技法であって、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Elnathan et al., Nano Lett 2012, 12, (10), 5245-5254に記載される技法等であるが、これに限定されない、

【0074】

部分48を、部分48内の反応性基と、ナノ構造体40の表面上の適合する反応性基とによって、直接またはリンカーを介して、ナノ構造体40の表面に結合させることができる。この結合は、共有結合であることが好ましい。例示的な実施形態では、リンカーはナノ構造体の表面上に反応性アミン基を生じさせ、所望により、この反応性アミン基が還元アミノ化に供されて、部分48と結合するアルデヒド末端表面を生じさせる。ナノ構造体40の表面上の反応性基は、元から備わっているか、または処理の際に生じ得る。

【0075】

ナノ構造体40は、細長いことが好ましい。

【0076】

本明細書で使用する「細長いナノ構造体」は、概して、固体物質で形成されている3次元体を指し、また、その長手方向に沿った任意の地点で、少なくとも1つの断面寸法を有し、いくつかの実施形態では、1マイクロメートル未満、又は500ナノメートル未満、又は200ナノメートル未満、又は150ナノメートル未満、又は100ナノメートル未満、又は更には70ナノメートル未満、50ナノメートル未満、20ナノメートル未満、10ナノメートル未満、又は5ナノメートル未満の2つの直断面寸法を有する。いくつかの実施形態では、断面寸法は、2ナノメートル未満又は1ナノメートル未満であってもよい。

【0077】

いくつかの実施形態において、ナノ構造体は、0.5ナノメートル~200ナノメートル又は1nm~100nm、又は1nm~50nmの範囲の少なくとも1つの断面寸法を有する。

【0078】

ナノ構造体の長さは、その断面に略直交する、その伸長範囲を表す。本発明のいくつかの実施形態によれば、ナノ構造体の長さは、10nm~50マイクロメートルの範囲である。

【0079】

細長い半導体の断面は、円形、正方形、矩形、楕円形及び管状を含むがこれらに限定されない任意の形状を有してもよい。規則的形状及び不規則形状が含まれる。

【0080】

本発明のさまざまな例示的な実施形態において、ナノ構造体は、本明細書で「ナノワイヤー」と称される非空洞構造である。

【0081】

「ワイヤー」は伝導性を有する、即ちそれ自体に電荷を通過させる能力を有する任意の材料を指す。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態に従って実施した実験においては、直径が約20 nmであり、長さが約10 μmのシリコンナノワイヤーを使用した。

【0083】

いくつかの実施形態において、ナノワイヤーは、0.5ナノメートル~200ナノメートル、又は1 nm~100 nm、又は1 nm~50 nmの範囲の平均直径を有する。

【0084】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノ構造体は、中空チューブとして成形されており、中空チューブは、長手方向軸線に沿って完全に中空であり、本明細書で「ナノチューブ」又は「ナノチューブ構造」と称されるものであることが好ましい。

【0085】

ナノチューブは、単層ナノチューブ、多層ナノチューブ、又はそれらの組み合わせであってもよい。

【0086】

いくつかの実施形態において、ナノチューブの平均内径は、0.5ナノメートル~200ナノメートル、又は1 nm~100 nm、又は1 nm~50 nmの範囲である。

【0087】

多層ナノチューブの場合、いくつかの実施形態では、壁間距離は、0.5ナノメートル~200ナノメートル、又は1 nm~100 nm、又は1 nm~50 nmの範囲であってもよい。

【0088】

図8Aは単一のナノ構造体40を示しているが、一部の実施形態において、センサ20が複数(すなわち、2つ以上)のナノ構造体を備える構成も想定されることを理解されたい。複数のナノ構造体を用いるとき、所望により、ナノ構造体40は、整列させることが好ましい。例えば、ナノ構造体は、図8Bに概略的に図示されるように、互いに略平行に配設することができる。

【0089】

本明細書に記載されるナノ構造体を形成するための好適な半導体材料の選択は、本発明の実施形態を有利に実践するために提供されるガイドラインを考慮すれば、当業者に明白かつ容易に再現できるであろう。例えば、本発明の実施形態のナノ構造体は、I V族元素の半導体、並びに、元素の周期律表のI I族、I I I族、I V族、V族及びV I族のいずれかから選ばれる2つ以上の元素のさまざまな組み合わせから形成されてもよい。

【0090】

本明細書で使用する「族」は、当業者が理解するその通常定義が与えられる。例えば、I I I族元素は、B、Al、Ga、In及びTlを含み；I V族元素は、C、Si、Ge、Sn及びPbを含み；V族元素は、N、P、As、Sb及びBiを含み；V I族元素は、O、S、Se、Te及びPoを含む。

【0091】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノ構造体は、「ドーパント」として既知のドナー原子でドーパされた半導体材料から形成されている。本発明の実施形態は、ドーピングして、n型(格子構造の完成に必要とされるよりも過剰の電子)及びp型(格子構造の完成に必要とされるよりも不足する電子)の両方のドーピングを達成することを想定している。n型材料中の過剰な電子、又はp型材料中に残された正孔(電子の不足)は、それぞれ、負電荷担体及び正電荷担体としての役割を果たす。p型ドーパント及びn型ドーパントとして好適なドナー原子は、当技術分野にて既知である。

【0092】

例えば、ナノ構造体は、例えばB(これらに限定されるものではないが、典型的にはジボランである)、Ga若しくはAlでドーパされたケイ素から形成されて、p型半導体ナノ構造体を提供するか、又は、P(これらに限定されるものではないが、典型的にはホスフィンである)、As若しくはSbでドーパされたケイ素から形成されて、n型半導体ナノ構造体を提供してもよい。

10

20

30

40

50

【0093】

本発明者らが行った実験では、Siナノワイヤーと、ジボランドーパントを有するp型Siナノワイヤーとを使用した。

【0094】

本発明の一部の実施形態では、ナノ構造体は、導電性材料（例えば、炭素）でできているか、またはこれを含む。例えば、ナノ構造体は、長いグラフェンシートを巻いたものとみなすことができる、単層ナノチューブ（SWNT：single-walled nanotube）か、異なる直径を有する同心円状のSWNTの集合体と見なすことのできる、多層ナノチューブ（MWNT：multi-walled nanotube）のいずれかである、カーボンナノチューブとすることができる。SWNTの典型的な直径は数ナノメートルの単位を下回り、MWNTの典型的な直径は数十～数百ナノメートル単位である。

10

【0095】

複数のナノ構造体を用いるとき、ナノ構造体を、例えば、化学気相蒸着によって成長させることができる。別法として、ナノ構造体を、レーザ補助触媒成長（LCG：laser assisted catalytic growth）によって作製することができる。半導体ナノ構造体を形成するための方法、および複数のナノ構造体のアレイを構築する方法としては、いずれの方法も想定される。複数のナノ構造体40を用いるとき、親和性部分48は、ナノ構造体の各々の上に固定化されている。本発明の一部の実施形態では、すべての親和性部分がすべてのナノ構造体にわたって同じであり、一部の実施形態では、少なくとも2つのナノ構造体が異なる親和性部分に結合している。

20

【0096】

マーカ-またはバイオマーカ-50と部分48との間の反応事象はナノ構造体40の表面電位を変えるので、結果として、ナノ構造体40の電気特性を変化させる。例えば、ナノ構造体40は、ナノ構造体40の一部の領域またはナノ構造体40の全長にわたって、電子またはホールの密度の変化を呈し得る。ナノ構造体40は、さらに、または代わりに、その電気伝導度または抵抗率の変化を呈し得る。

【0097】

再び図7を参照すると、本方法は、所望により、そして好ましくは、洗浄によってセンサから液体または生物学的液体を取り除く12に進み、マーカ-またはバイオマーカ-の存在および/またはその濃度を検出する13へと進む。当該検出は、洗浄12の開始時点後から所定時間（例えば、少なくとも10秒、または少なくとも20秒、または少なくとも30秒、または少なくとも45秒、または少なくとも60秒、または少なくとも75秒、または少なくとも90秒、または少なくとも105秒、または少なくとも120秒、または少なくとも135秒、または少なくとも150秒）の経過後に始まる時間窓内でセンサから受信した検出可能なシグナルに基づく。検出は、時間窓内で受信したシグナルに基づくが、時間窓の始まる時点の前にセンサから受信したシグナルに基づかないことが好ましい。時間窓の長さは、約30秒から約500秒までであることが好ましい。上記範囲外にある所定時間の経過後および時間窓の長さを含めた、他の所定時間の経過後および時間窓の長さも想定される。

30

40

【0098】

本発明の一部の実施形態によれば、洗浄の開始から、より好ましくは、洗浄の開始の直前または直後からシグナルをモニタリングするが、マーカ-の存在またはレベルの決定の基準となるシグナルのモニタリングを行う時間窓の開始は、洗浄の開始時ではない。これらの実施形態では、本方法は、所望により、そして好ましくは、シグナルそれ自体から時間窓の開始を決定することが好ましい。この決定は、例えば、シグナルの時間依存性（例えば、スロープ、プラトー、時間に対する微分係数のゼロ化、時間に対する微分係数の値等）をモニタリングし、時間依存性の変化に基づいて時間窓の開始を特定することによって行うことができる。例えば、本方法では、時間窓の開始を、シグナルが減衰を呈した時点、またはシグナルがプラトー領域を脱した時点として特定することができる。

50

【0099】

検出は、所望により、そして好ましくは、電極の配列を使用してナノ構造体40の電気特性の変化をモニタリングすることによって行う。図8Aおよび8Bを参照すると、本発明の一部の実施形態によれば、センサ20は、ソース電極42とドレイン電極44とを備え、ナノ構造体40は、電極42と電極44との間に配置され、電荷キャリアチャネルとして働く。場合によっては、センサ20は、ゲート電極46をさらに備え、このゲート電極46が、電極42および電極44ならびにナノ構造体40と共に、トランジスタ、例えば、電界効果トランジスタ(FET)を形成する。ゲート電極46は、所望により、そして好ましくは、しかし必ずしも必須ではないが、ナノ構造体40とギャップ47によって隔てられている。ゲート電極46を介して、ゲート電圧をチャネルであるナノ構造体40に印加することができる。一部の実施形態では、ゲート電極46の電圧がゼロであるとき、ナノ構造体40は遊離した電荷キャリアを一切含まず、本質的に絶縁体である。ゲート電圧が上昇すると、それによって発生した電界は、ソース電極42およびドレイン電極44から電子(またはより一般的には、電荷キャリア)を引き寄せ、ナノ構造体40は導電性になる。一部の実施形態では、ゲート電圧は印加されず、電荷キャリア密度の変化は、親和性部分48とマーカーまたはバイオマーカー50との間の相互作用のみによって生じる。

10

【0100】

センサ20の電極を、回路(図示せず)に直接または間接的に接続することができる。回路は、電極のうちの1つまたは複数を通して、ナノ構造体40に電圧を印加ことができ、マーカーまたはバイオマーカー50の親和性部分48への結合にตอบสนองした、ナノ構造体40の電気特性の変化をモニタリングする。例えば、回路を、ナノ構造体40の電気特性の変化に対応する電気的な測度の測定用に構築することができる。電気的な測度は、例えば、電圧、電流、電気伝導度、抵抗、インピーダンス、インダクタンス、電荷等とすることができる。

20

【0101】

本方法は、所望により、そして好ましくは、液体または生物学的液体を別のセンサ、好ましくはマーカーまたはバイオマーカー50に非特異的なものに接触させる14へと続く。これらの実施形態では、本方法は、所望により、そして好ましくは、同様に洗浄によって非特異的なセンサから液体または生物学的液体を取り除く15へと続く。操作14および15を実行するとき、所望により、そして好ましくは、マーカーまたはバイオマーカーの存在および/またはその濃度の検出は、検出可能なシグナルと非特異的なセンサから受信したバックグラウンドシグナルとの比較16に基づく。この比較に基づく検出を、17に大まかに示す。

30

【0102】

本方法は18で終了する。

【0103】

図9は、本発明の一部の実施形態に係る、液体または生物学的液体92中のマーカーまたはバイオマーカーと50(図示せず)の存在および/または濃度を検出するためのシステム90の概略図である。システム90を、方法10の1つまたは複数の、より好ましくは、すべての操作を実行するために使用することができる。システム90は、検知チャンバ96とセンサとを有する流体デバイス94を具備し得るものであり、当該センサは、検知チャンバ96内のセンサ20等であるが、これに限定されない。システム90は、所望により、そして好ましくは、以下でさらに詳述するように、洗浄緩衝液100をチャンバ96に導入して、洗浄によってセンサ20から液体または生物学的液体92を取り除くための流動制御システム98と、センサ20から受信した検出可能なシグナルを分析するための回路104を有する、シグナル分析器102とを具備し得る。

40

【0104】

本発明の一部の実施形態において、流体デバイス94は、以下でさらに詳述するように、マーカーまたはバイオマーカーに非特異的である、非特異的なセンサ106を備える。

50

センサ 106 は、センサ 20 と同じ検知チャンバ 96 内であってもよい。これらの実施形態では、シグナル分析器 104 の回路 102 は、以下でさらに詳述するように、検出可能なシグナルとバックグラウンドシグナルとの比較を行い、この比較に基づいて、マーカーまたはバイオマーカーの存在および/またはその濃度を検出することができる。

【0105】

本明細書で使用する「約」は、 $\pm 10\%$ または $\pm 5\%$ を指す。

【0106】

「具備する (comprise)」、「具備している (comprising)」、「含む (include)」、「含んでいる (including)」、「有している (having)」及びそれらの活用形は、「含むが、限定されない」ことを意味する。

10

【0107】

「からなる」は、「含み、限定される」ことを意味する。

【0108】

「から実質的になる」は、組成物、方法又は構造が追加の成分、工程及び/又は部分を含み得ると定義する。しかし、追加の成分、工程及び/又は部分は、特許請求される組成物、方法又は構造の基本的かつ新規な特性を実質的に変更しない場合に限られる。

【0109】

本明細書で使用する単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明らかに他を指示しない限り、複数を対象とする。例えば、「化合物 (a compound)」又は「少なくとも 1 種の化合物」には、複数の化合物が含まれ、それらの混合物をも含み得る。

20

【0110】

以下は、他の技術に対する本実施形態の手法の利点の一部を示す。

【0111】

- ・フェムトモルからナノモル範囲までの感度 (試料中のバイオマーカー濃度)
- ・約 5 分未満で結果が速やかに得られる
- ・リアルタイム超高感度モニタリング
- ・迅速であり、時間の掛かる処理 (すなわち、遠心分離、透析、アフィニティカラム) が不要

30

- ・標識が不要。懸念となる工程が少なく、励起および画像化の必要がない
- ・多重性。可能な限り多くの生物学的データを抽出できる
- ・デバイ遮蔽長の克服
- ・lab on chip システムとの統合が容易
- ・非常に少量の試料で利用可能
- ・再利用可能 / 可逆性
- ・低コスト

【0112】

本願全体を通して、本発明のさまざまな実施形態は、範囲形式にて示され得る。範囲形式での記載は、単に利便性及び簡潔さのためであり、本発明の範囲の柔軟性を欠く制限ではないことを理解されたい。従って、範囲の記載は、可能な下位の範囲の全部、及びその範囲内の個々の数値を特異的に開示していると考えべきである。例えば、1 ~ 6 等の範囲の記載は、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 6、3 ~ 6 等の部分範囲のみならず、その範囲内の個々の数値、例えば 1、2、3、4、5 及び 6 も特異的に開示するものとする。これは、範囲の大きさに関わらず適用される。

40

【0113】

本明細書に数値範囲が示される場合、それは常に示される範囲内の任意の引用数 (分数又は整数) を含むことを意図する。第 1 の指示数と第 2 の指示数「との間の範囲」という表現と、第 1 の指示数「から」第 2 の指示数「までの範囲」という表現は、本明細書で代替可能に使用され、第 1 の指示数及び第 2 の指示数と、それらの間の分数及び整数の全部を含むことを意図する。

【0114】

50

特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術及び／又は科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様の又は等価な方法及び材料を、本発明の実施形態の実践又は試験に使用することができるが、例示的な方法及び／又は材料が下記に記載されている。矛盾する場合、定義を含む特許明細書が優先する。加えて、材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、必ずしも限定を意図するものではない。

【0115】

本発明の実施形態の方法及び／又はシステムの実施は、選択されたタスクを手動、自動、又はそれらの組み合わせで実行又は完了することを含み得る。更に、本発明の方法及び／又はシステムの実施形態の実際の器具類及び設備によれば、いくつかの選択されたタスクは、ハードウェア、ソフトウェア、若しくはファームウェア、又は、オペレーティングシステム、又はそれらの組み合わせを使用して実施され得る。

10

【0116】

例えば、本発明の実施形態において選択されたタスクを実行するためのハードウェアは、チップ又は回路として提供してもよい。ソフトウェアとしては、本発明の実施形態において選択されたタスクを、任意の好適なオペレーティングシステムを使用して、コンピュータにより実行される複数のソフトウェア命令として提供してもよい。本発明の例示的な実施形態では、本明細書に記載される方法及び／又はシステムの例示的な実施形態による1つ以上のタスクは、複数の命令を実行するための計算プラットフォーム等のデータプロセッサにより実行される。データプロセッサは、命令及び／又はデータを格納する揮発性メモリ、並びに／もしくは、命令及び／又はデータを格納する不揮発性記憶装置、例えば磁気ハードディスク及び／又はリムーバブルメディアを含んでもよい。

20

【0117】

所望により、ネットワーク接続が提供されてもよい。ディスプレイ及び／又はキーボード若しくはマウス等のユーザー入力装置が提供されてもよい。

【0118】

明確さのために別個の実施形態に関連して記載した本発明の所定の特徴はまた、1つの実施形態において、これら特徴を組み合わせで提供され得ることを理解されたい。逆に、簡潔さのために1つの実施形態に関連して記載した本発明の複数の特徴はまた、別々に、又は任意の好適な部分的な組み合わせ、又は適当な他の記載された実施形態に対しても提供され得る。さまざまな実施形態に関連して記載される所定の特徴は、その要素なしでは特定の実施形態が動作不能でない限り、その実施形態の必須要件であると捉えてはならない。

30

【0119】

上述したように本明細書に記載され、特許請求の範囲に請求される本発明のさまざまな実施形態及び態様は、以下の実施例によって実験的に支持されるものである。

【0120】

実施例

ここで、上記の記載と共に本発明を限定することなく説明する以下の実施例に参照する。

40

【実施例1】

【0121】

S i N W - F E T の作製

図1A～1Gは、本発明の一部の実施形態に係る、600nmの酸化物層を有する3インチのシリコンウエハ上の直径20nmのP型S i N W - F E T デバイスの画像(図1Aおよび1B)と、作製過程の概略図(図1C～1G)である。

【0122】

P型S i N W を化学気相蒸着(CVD)システム(蒸気-液体-固体(VLS: vapor liquid solid)法による)によって合成した(図1C)。リソグラフィによって事前に作製しておいた、600nmの酸化物層と外部金属パッド(5nm C

50

r、次いで60nm Au)とを有するシリコン基板の上に、P型SiNWを蒸着させた(図1D)。500nm LOR5A(Microchem社製)と500nm 1805(Shipley社製)とからなる多層フォトリソ構造体を使用して、ソース電極とドレイン電極とを蒸着させた。電極パターンの露光及び現像の後(図1E)、接点をそれぞれ電子ビーム及びNiの熱蒸着(60nm)によって金属化し、次いで、80℃でのプラズマ化学気相蒸着(ICP-PECVD、Axix Inc.社製)によって蒸着させたSi₃N₄(厚さ60nm)と、10nmのアルミナの層(Cambridge Nanotech社製のSavannah 200 systemを使用したALD堆積)とによる絶縁層で不動化させた(図1F)。露光していないフォトリソ層のリフトオフと、SiNW及び金属接点の熱アニーリングとを行った(図1G)。各FETについて、ソース電極とドレイン電極との間の間隔は、約2µmであった。FETの画像および拡大画像を、それぞれ図1Bおよび1Aに示す。

10

【実施例2】

【0123】

抗体で修飾されたSiNWの調製

抗体によるシリコンナノワイヤ(SiNW)FETデバイスの修飾を、図2に概略的に図示する。この過程を、以下に簡単に説明する。

【0124】

表面の清浄化および活性化：本明細書の実施例1において記載したように調製したSiNW FETを、アセトン、脱イオン水、およびイソプロパノールで洗浄し、N₂流下で乾燥し、その後、表面をシラン処理のために酸素プラズマ(0.200torr、100W、10分)で活性化した。

20

【0125】

シラン処理：デバイス表面を(3-アミノプロピル)-ジメチル-エトキシシランで被覆し、50℃に60分間加熱した。その後、表面をイソプロパノールで洗浄した後、ホットプレート上で脱水させた(115℃、30分)。

【0126】

架橋剤による結合：デバイスを、12mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有する8.3%グルタルアルデヒドの10mM、pH=8.5のリン酸緩衝液溶液で被覆した(60分、室温)。その後、デバイスを脱イオン水、アセトン、イソプロパノールで洗浄し、脱イオン水で再度洗浄した。

30

【0127】

チップ上へのチャネルの構築：管類およびPDMSチャネルをイソプロパノールおよび脱イオン水で洗浄した。その後、管類をシリンジポンプに接続し、リン酸緩衝液(PB)(10mM、pH=8.5)を導入することにより、システムを洗浄した。

【0128】

抗体の固定化：CA15-3 IgG(40µl、1mg/ml)を、12mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有するリン酸緩衝液(10mM、pH=8.5)700µlと穏やかに混合した。抗体溶液をシステム中に導入し(4℃で、終夜約16時間)、その後、チャネルが常に濡れている状態に表面を保ちながら、管路系をリン酸緩衝液(10mM、pH=8.5)で洗浄した。

40

【0129】

ブロッキング：エタノールアミン(100mM)および12mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有するPB(pH=8.5)であるブロッキング溶液を、室温で3時間、50µl/分の流量でシステム中に導入した。その後、システムを、リン酸緩衝液(10mM、pH=8.5)で、50µl/分の流量において30分間洗浄した。このように調製したシステムを検知のために使用した。

【実施例3】

【0130】

検知

50

上記実施例 2 で記載した通りの複数の SiNW FET を収容した流体システムを、抗原含有緩衝液、洗浄緩衝液、および生物試料を使用して、実験により検討した。この実施例では、SiNW FET を抗トロポニン T (Fab 2 断片) で修飾した。

【0131】

抗原含有緩衝液は、抗原である心筋トロポニン T (10 nM) を含むものであった。洗浄緩衝液は、150 μ M のリン酸緩衝液を含むものであった。

【0132】

図 3 は、複数の SiNW FET を収容する流体システムへの抗原含有緩衝液の導入と、それに続く洗浄緩衝液の導入における、例示的な抗体修飾 SiNW FET の応答較正曲線を示す。

10

【0133】

図 3 中の矢印 A は、抗原含有緩衝液を流体システムに導入した時点を示す。このとき、抗原は、抗体との相互作用によって SiNW 表面上に吸収され、電気的応答の変化が検出された。図 3 中の矢印 B は、洗浄緩衝液を流体システムに導入した時点を示す。このとき、結合した抗原の大半が SiNW から脱着し、電気的応答の逆変化が検出された。FET に使用したパラメータは、 $V_g = 0$ ボルト、 $V_{ds} = 0.1$ ボルトである。流体システムにおける流量は 20 μ l/min で、Mitos ポンプによって行った。

【0134】

図 4 は、生物試料中の、抗体修飾 SiNW FET の較正された応答を示す。この実験では、生物試料はウシ胎児血清であった。図 4 中の矢印 A は、生物試料をシステムに導入した時点を示す。FET に使用したパラメータは、 $V_g = 0$ ボルト、 $V_{ds} = 0.2$ ボルトである。流体システムにおける流量は、100 μ l/min であった。

20

【0135】

図 5 は、図 4 の生物試料の存在下における応答較正曲線を示す。ただし、応答較正曲線は、洗浄操作の開始後におけるものである。図 5 中の矢印 B は、洗浄緩衝液をシステムに導入した時点を示す。FET に使用したパラメータおよび流量は、上記の図 4 におけるものと同じである。30 単位/ml 未満の濃度の CA15-3 により、検出可能な電気的応答の変化が生じる。

【0136】

図 6 は、洗浄操作の開始後に生物試料の存在下において取得可能な、2 つの応答較正曲線を示す。図 6 中の矢印 B は、洗浄緩衝液をシステムに導入した時点を示す。第 1 の応答較正曲線は、親和性部分を有するセンサからのバイオマーカーの脱着に相当し、第 2 の較正曲線は、親和性部分を有さないセンサからのバイオマーカーの脱着に相当する。第 2 の較正曲線を、第 1 の曲線の比較対象とすることができるバックグラウンドと定めることができる。

30

【実施例 4】

【0137】

詳細な調査

この実施例は、抗体修飾 Si ナノワイヤセンサから得られる抗原解離レジームを、血清および未処理の血液等の複雑な生物試料中の、対象とするバイオマーカーに対する、簡便で効果的な直接検知機構として利用できることを実証する。この検知機構は、遠心分離、濾過、予備濃縮、および脱塩等の *ex situ* における時間の掛かる生物試料の処理工程を必要とせず、したがって、ナノワイヤ型バイオセンサのデバイ遮蔽限界の弊害を克服するものである。

40

【0138】

可撓性ポリジメチルシロキサン (PDMS) エラストマーから、流体送達デバイスを作製した。PDMS を、60 $^{\circ}$ C において、質量比 10 : 1 で硬化剤と共に終夜インキュベートした。次いで、得られたデバイスを寸法が 10 \times 10 \times 5 mm の矩形片に切断した。異なる寸法を有する 2 つのチャンネル、すなわち、より大きい寸法を有する矩形チャンバ ($h = 5$ mm、 $l = 7$ mm、および $w = 3$ mm) およびより小型の矩形チャンバ ($h = 0.1$

50

mm、 $l = 3.5$ mm、および $w = 1$ mm) をこの調査で使用した。上流のポリエチレンチューブ (PE 20、Intramedic社製) は、長さ 14 cm、内径 0.38 mmであった。下流のTygonチューブ (S-50-HL、Tygon社製) は、長さ 13 cmであった。

【0139】

SiNW FET表面上の固定化された抗体により、抗原の結合および非結合の動力学的検知を行うために、SiNW FETのアレイを有するチップを化学的に修飾した。抗体をSiNW表面と複合体化するために、まず、FETチップをアセトン (9005-68、J.T.Baker社製)、イソプロパノール (9079-05、J.T.Baker社製)、及び脱イオン水 (18M・cm) で続けて洗浄し、その後窒素で乾燥した。次いで、酸素プラズマ (100W、0.2 Torr) を15分間印加した。チップをガラス皿によって覆い、アルゴン雰囲気下 (水及び酸素を含まない) でグローブボックス (150B-G、Mbraun社製) に挿入して、アミノ-シラン修飾を行った。その後即座に、チップを約 150 μ l の (3-アミノプロピル)-ジメチル-エトキシシラン (APDMES; SIA0603.0、Gelest社製) で60分間被覆した。次いで、チップを約 30 ml の無水トルエン (99.8%、244511、Sigma-Aldrich社製) で3回洗浄した。チップをグローブボックスからクリーンルームへと移し、再びイソプロパノールで洗浄し、その後窒素で乾燥した。次に、チップを115のホットプレート上に25分間置いた。続けて、室温で60分間、10 mMリン酸緩衝液 (pH = 8.5) 中の12 mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有する8.3%グルタルアルデヒド溶液でデバイスを被覆した後、脱イオン水、アセトン、イソプロパノールで続けて洗浄し、さらに脱イオン水で洗浄することにより、架橋剤による結合を行った。

10

20

【0140】

次いで、イソプロパノールおよび脱イオン水で予備洗浄したPDMSチャネルを、管類をシリンジポンプに接続することでチップに仕立て、続いて10 mMリン酸緩衝液 (pH = 8.5) を流した。4において、終夜 (約16時間)、10 ~ 100 μ g/ml のIgG抗体、12 mMシアノ水素化ホウ素ナトリウム、および10 mMリン酸緩衝液 (pH = 8.5) を含有する抗体溶液をシステムに流し入れることにより、抗体をSiNW表面に固定化した。室温において、50 μ l/minの流量で150分間、10 mMリン酸緩衝液 (pH = 8.5) 中の100 mMエタノールアミンおよび12 mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有するブロッキング溶液をシステムに流し入れて、ブロッキングを行った後、50 μ l/minの流量で30分間、10 mMリン酸緩衝液 (pH = 8.5) による最終洗浄を行った。

30

【0141】

デバイスをワイヤボンディングし (ワイヤボンダ、8850型、West Bond社製を使用)、センサデバイスチップをカスタムメイドのPDMSマイクロ流体チャネルと統合した。データ取得システムを使用して、表面電荷の変化によって誘起されるSiNW FETの電流 (I_{ds}) を測定した。選択されたデバイスを、検知緩衝液中でのその性能について調べた。ゲート電圧の掃引を用いてトランスコンダクタンスの測定を行い、その後、動作のトランジスタレジームの決定を行った。適切なゲート電圧をさらに選択して、以下の検知実験すべてを実施した。検知実験は、分析物をシリンジポンプ (Fusion 200、Chemyx社製) によってマイクロ流体システムを介して検知チップに導入する間、SiNWデバイスのコンダクタンスを経時的にモニタリングすることによって実施した (電流対時間シグナルを1秒間隔で記録)。

40

【0142】

図2.2Aおよび図2.2Bは、ウォーターゲート構成下におけるp型SiNW FETナノデバイスの電気的特徴付けを示す。図2.2Aは、異なるゲート電圧 (V_g) における、ソース-ドレイン間電流対ソース-ドレイン間電圧 (V_{sd}) のプロットである。図2.2Bは、0.1 Vのソース-ドレイン間電圧 (V_g) における、ソース-ドレイン間電流対ゲート電圧 (V_g) のプロットである。

50

【0143】

図23Aおよび図23Bは、SiNWの走査電子顕微鏡(SEM)像である。図23Aは、化学気相蒸着システムによってシリコン(100)ウエハ上に合成した、20nmのp型SiNWのSEM像であり、図23Bは、ソース電極およびドレイン電極に接続されたSiNWからなるSiNW FETデバイスのSEM像である。

【0144】

生物試料中の定量的バイオマーカー分析を行う能力を制御するパラメータには、(i)抗体-抗原認識対の親和性強度(k_{off} 速度)と、(ii)溶液交換による解離工程に用いられる流量とが含まれることが見出され、前者が高親和性低速解離サブレジームの時間の長さを決定付け、後者が低親和性高速解離サブレジームの時間幅を制御する。時間の掛かるex situの生物試料の処理工程がないことにより、未処理の生物試料(5~10 μ Lの血液または血清)の直接検出が可能となるため、検知プラットフォームの携帯性が増し、被験試料として必要な体積を最小限まで減少させると共に、検出サイクルの長さを5分未満に容易に短縮する。これらは、近い将来におけるポイント・オブ・ケアの医療用途において、非常に重要な要素である。

10

【0145】

抗原の、それに対して特異的な抗体で修飾されたSiNW FETデバイスからの解離レジームを分析することは、複雑な生物試料からバイオマーカーを高感度で選択的に直接検出するための効果的で簡単な手法であることを実証する。

【0146】

分析物であるバイオマーカーを含有する生物試料を、SiNW FET検知ナノデバイスに導入した。SiNWの表面を、分析物であるバイオマーカーと特異的に相互作用する抗体で修飾した。抗体-抗原相互作用の結果、バイオマーカー分子は、ナノワイヤFETデバイスの表面に結合した抗体単位に、強固かつ選択的に結合する。血清または血液等の生理溶液中では、バイオマーカー分析物の特異的結合をバックグラウンドシグナルの変化から直接識別することは、高濃度の、塩およびタンパク質等の帯電した化学種によって引き起こされる電荷遮蔽に起因して、困難である可能性がある。

20

【0147】

バイオマーカー分子の選択的会合の後、デバイスを、低イオン強度に制御された溶液である検知緩衝液で、迅速に洗い流す。こうすることで、未結合の非特異的な化学種によるマスキング効果なしに、SiNW FETデバイスは、強固に結合した抗原種によるナノワイヤ上の表面電荷の変化を効果的に検知することができる。検知デバイスを検知緩衝液で迅速に洗浄することにより、未結合または緩く結合した非特異的な化学種(塩、タンパク質、細胞、小分子)がナノワイヤ表面近傍から速やかに除去され、強固で特異的な相互作用を介してナノワイヤ表面に結合している特異的な抗原分子のみが残されるが、これはかなり低速な解離の動力学を示す。

30

【0148】

この効果により、「解離レジーム窓」が効率的に2つのサブレジームに分けられる。すなわち、(i)最初に、低イオン強度の「検知緩衝液」をSiNW FET検知アレイ中に流すと、低親和性のもの(塩、生体分子、タンパク質等)が速やかにSiNW表面から離れ、これにより、デバイスの電気伝導度が迅速に変化する。(ii)低親和性のものの除去が終わった後(非特異的解離サブレジーム)、高親和性のものの特異的解離(特異的脱離サブレジーム)が、デバイスの電気伝導度の変化を支配する。最終的に、バイオマーカーであるタンパク質の高感度で正確な検出のために、非特異的解離サブレジームと特異的解離サブレジームとの間の遷移点が用いられる。

40

【0149】

この手法は、単一のプラットフォーム上での複雑な生物試料の直接分析に相当し、遠心分離、脱塩、またはアフィニティカラム等の時間の掛かる工程を必要とすることがなく、不要な化学種(塩、生体分子、タンパク質、細胞)を容易に除去しつつ、低濃度の特定のバイオマーカーを選択的に検出することが可能である。標識不要の超高感度タンパク質分

50

析過程の全体を、速やかに、例えば、5分以内で、実際に行うことができる。

【0150】

図10は、本発明の一部の実施形態に係る、抗体修飾SiNW FET検知デバイスからの抗原の解離レジームの検出による手法について、動作原理を概略的に説明するものである。最初に、安定なベースラインを得ることを目的として、固定化されたSiNWデバイスを低イオン強度の検知緩衝液と接触させる。次に、生物試料を、特異的な抗体で修飾したSiNW FETデバイス、または免疫不活性タンパク質で修飾したSiNW FETデバイスのいずれかに導入する(図10の(1))。

【0151】

結合レジーム窓内では、SiNW FETデバイスと、分析された試料中の生体分子との相互作用により、デバイスの電気伝導度が変化する(図10の(2))。この時点では、高イオン強度溶液中の電荷遮蔽効果に起因して、SiNW FETデバイスは、特異的な抗原の結合によって引き起こされた電気伝導度の変化と、試料中の他の生体分子および塩によって引き起こされた電気伝導度の変化とを区別できない。SiNW FETデバイスが、検知チャンバの迅速な洗出によって低イオン強度の検知緩衝液との接触に戻されたとき、生物試料に由来する未結合の生体分子および塩は、それらとSiNW FETデバイスの表面との間の相互作用の強度に依存する形で、SiNW FETデバイスの表面から除去される。

【0152】

抗体で修飾されたSiNW FETデバイスの場合、抗原の、それに特異的な抗体からの脱着の動力学が非常に低速であるため、特異的な抗原の存在によってベースラインに戻る速度が低下することになる(図10の(3))。しかし、SiNW表面を非特異的な抗体で修飾するか、または試料中に抗原が存在しないとき、特異的な高親和性の相互作用が存在しないため、ベースラインに戻る速度はかなり速い。

【0153】

図11は、未処理の血清試料中の様々な濃度の標的抗原CA15-3に対する、代表的な抗CA15-3固定化SiNW FET検知デバイスの、正規化された会合応答を示す。黒色の曲線は、FETデバイスのCA15-3不含ウシ胎児血清対照試料に対する応答を表す。赤色の曲線、青色の曲線、および青緑色の曲線は、未処理のウシ胎児血清中の、それぞれ、55 pM、135 pM、および535 pMの濃度のCA15-3抗原を含有する試料に対する、FET検知デバイスの応答を表す。黒色の矢印は、生物試料を注入する前に、低イオン強度検知緩衝液(検知緩衝液-SB、155 μMリン酸ナトリウム緩衝液、pH約8.0)をマイクロ流体チャンネルに流したときの、検知デバイスの電氣的ベースラインを表す。青色の矢印は、未処理の血清生物試料(高イオン強度試料)の注入時点を指す。これらの条件下において、分析によらない検知情報を会合曲線抽出することができる。図11の挿入図は、異なる濃度のCA15-3標的抗原を含有する生物試料に対する、同じ検知デバイスの相互作用の生データ曲線を示す。

【0154】

デバイ長の限界から、ナノFETデバイスは、高イオン強度生理条件下(デバイ長は約1 nm)において、高親和性抗原-抗体相互作用を検知することができないであろうと予測される。よって、測定された抗原会合曲線は、分析シグナルに置き換えることができない(図11を参照)。血清試料から得られた会合曲線は、0 pMから535 pMまでの様々な濃度の、乳がんの診断およびモニタリングのためのバイオマーカーであるCA15-3抗原(ヒトがん関連抗原)と、モノクローナル抗体で修飾されたナノワイヤデバイスの正規化された電氣的応答とが非常に類似していることを示す。SiNW FET検知デバイスの、未処理の血清試料中の様々な濃度の被験CA15-3抗原に対する相互作用を観測したが、生物試料の高いイオン強度に起因する分析上の違いは見られなかった。このため、会合レジームの曲線を生体分子種のリアルタイム検出のための分析手段として使用することはできない。したがって、これらの結果は、未処理の生物試料溶液、例えば、血液中のタンパク質バイオマーカーの直接検出に対して、ナノFETによる新規の検出手法を

10

20

30

40

50

開発する必要性が大きいことを実証している。

【0155】

図12は、低イオン強度条件下（検知緩衝液、SB、155 μMリン酸ナトリウム緩衝液、pH約8.0）における、代表的な抗トロポニン抗体修飾SiNW FET検知デバイスの、その特異的抗原であるトロポニンT（cTnT、1 nM）の会合および解離に対する、正規化された電気的応答を示す（赤色の曲線）。さらに、低イオン強度条件下（検知緩衝液、SB、155 μMリン酸ナトリウム緩衝液、pH約8.0）における、代表的な抗トロポニン抗体修飾SiNW FET検知デバイスの、BSA含有試料（ウシ血清アルブミン、1 nM）に対する、正規化された電気的応答も示す（黒色の曲線）。黒色の矢印は、対応する試料を注入する前に、低イオン強度検知緩衝液（検知緩衝液 - SB、155 μMリン酸ナトリウム緩衝液、pH約8.0）をマイクロ流体チャンネルに流したときの、検知デバイスの電気的ベースラインを表す。青色の矢印は、心筋トロポニンT（抗原、赤色の線で表示）またはウシ血清アルブミン（血清タンパク質、黒色の線で表示）の試料のいずれかをSiNW FETデバイスへ導入した時点を示す（会合工程）。緑色の矢印は、検知緩衝液による、その後の洗浄工程を示す（解離工程）。

10

【0156】

この例で挙げている特定の場合では、心不全の非常に重要なマーカーである心筋トロポニンTを抗原として使用し、一方で、心筋トロポニンT（cTnT）に対する抗原結合性モノクローナル抗体を、SiNW FET表面に固定化された特異的抗体受容体として使用した。最初に、SiNW FETデバイスを検知緩衝液であるSBに曝露し、デバイスの電気的応答を、以下の式1に従って正規化した。

20

【0157】

$$100\% \times (I_{SB} - I_t) / I_{SB} \quad (\text{式1})$$

式中、 I_{SB} は、検知緩衝液（SB）中での電流であり、 I_t は、測定中のある時点における電流である。

【0158】

次に、検知緩衝液中の心筋トロポニンT抗原を含有する試料を、検出チャンネル内に導入したところ（図12中では、青色の矢印で示される）、ナノデバイスの表面のごく近傍で遊離トロポニン分子の濃度が急激に増加し、その後、表面に固定化された抗体単位に対するトロポニン分子による高親和性の会合が、徐々に見られた。その結果、デバイスの正規化された電気的応答が増加し、ついには、ナノデバイスの表面に結合したトロポニン抗原の量が最大であることを示す、飽和点またはプラトーに達した。次に、低イオン強度検知緩衝液で、検知ナノデバイスを迅速に洗出した。これに反応して、結合したトロポニン分子の量は徐々に減少し、ついには、検知緩衝液による元のベースラインの電気的シグナルとなった。注目されるのは、観測されたトロポニン抗原の解離の動力学は、その会合の動力学に比べてかなり低速であった点である。これらの観測は、固定化された抗体受容体単位と抗原分子との間で高親和性の相互作用が生じるといふ推測と一致する。

30

【0159】

抗cTnT抗体受容体単位で修飾されたSiNW FETデバイスを、タンパク質であるBSA（ウシ血清アルブミン）を高濃度で含有する低イオン強度溶液に曝露したとき、それぞれのデバイスの電気伝導度に、顕著な変化は観測されなかった。これらの結果は、タンパク質分子の抗体修飾SiNW型検知デバイスへの会合は、特異的な高親和性抗原-抗体相互作用に支配されており、ナノワイヤ上の表面の化学的性質によって、特異的な標的抗原分子以外の生体分子による非特異的な結合が防がれることを実証している。低イオン強度条件下で得られた抗原会合曲線によって、抗原分子の会合がプラトーに達する飽和時間を導出することができる。整合性を得るために、抗原会合がプラトーに達した後、その後の全解離実験データを得た。

40

【0160】

特異的な抗原分子が完全に会合した後、低イオン強度検知緩衝液を使用した抗体修飾SiNWデバイスに対する迅速な洗出工程を行うことにより、デバイスは、分析によって、

50

解離レジーム時間窓を2つの別々の解離サブレジーム、すなわち、(i)低親和性相互作用を行う化学物質(例えば、塩、非特異的なタンパク質、細胞、および小分子化学種)に関連した、高速解離動力学サブレジームと、(ii)高親和性相互作用を行う化学物質(例えば、特異的な抗原)に関連した、低速解離動力学サブレジームとに分けることが可能となる。

【0161】

言い換えると、低イオン強度検知緩衝液を使用した洗出操作により、低親和性で高速解離性の、未結合または緩く結合した非特異的な分子を、ナノワイヤ表面のごく近傍から速やかに除去することと、これにより、これらの帯電した化学種によって引き起こされる電荷遮蔽効果を最小化し、その結果として、低親和性種が完全に除去された後、高親和性で低速解離性の、結合した抗原種の存在を測定する能力を得ることが、同時に達成される。低速解離性種の解離速度と比べてかなり対照的な、高速解離性種の解離反応速度($k_{off}^{抗原} \gg k_{off}^{非特異的な化学種}$)により、解離窓レジームを上述のサブレジームに経験的に分けることが可能となる。よって、選択された表面結合抗体に固有の親和性定数と、SB洗出工程中に用いられる流量の両方について選択を行うことで、解離レジーム窓に基づいた、抗原種の正確な定量的検出を行うことができる。

10

【0162】

本発明の様々な例示的な実施形態において、SB溶液を使用した迅速なイオン強度交換工程は、特異的に結合した抗原種の量に大きな影響を与えない。このことは、例えば、抗原-抗体対解離時間が、未結合、および弱く結合した非特異的な化学種を完全に除去するための時間窓(非特異的解離サブレジーム)に比べてかなり長くなるように時間窓を選択することによって、確実に実現できる。非特異的な化学種の解離時間窓は、解離レジーム窓内において洗出用のSB溶液の流量を増加させることによって、制御および短縮することができる。

20

【0163】

親和性/解離定数が大きく異なることを特徴とする2つのモデル抗体系について、抗原解離レジーム窓を、複雑な生物試料中のバイオマーカーの定量的検出のための潜在的な手段として試験した。本発明者らの仮説を検証するため、まず、元の全抗体より抗原に対する会合親和性が低い、野生型全抗体分子の構造修飾断片である、抗トロポニン抗体断片を用いた。結果を図13に示す。図13は、低流速条件下での、血清中の抗トロポニン抗体の解離曲線を、当てはめ曲線と共に示す。抗トロポニン抗体断片についての解離速度(オフ速度 k_{off})を、低イオン強度SB下で測定された抗原解離曲線から導出したところ、 $k_{off} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ と推定した。

30

【0164】

図14Aおよび図14Bは、(F(ab')₂)固定化SiNW FETデバイスから得たトロポニンT抗原含有血清試料(トロポニン濃度は10nM)と対照であるトロポニンT不含血清試料との間で、解離の動力学を比較した結果を示す。測定は以下のように行った。初めは、試料(トロポニンT含有血清またはトロポニンT不含血清対照試料のいずれか)を、マイクロ流体チャネルを通じて、100μL/min(毎分1チャンバ体積交換、チャンバ体積:100μL)の流量で、会合プラトーに達するまで固定化SiNW FETデバイスに導入した。次に、固定化SiNW FETデバイスを低イオン強度検知緩衝液で洗浄した。得られた解離動力学曲線から、トロポニンT含有血清試料とトロポニンT不含対照試料のいずれについても、正規化された電気的応答が類似して時間変化していることがわかる(図14Aおよび14B、赤色および黒色の曲線)。ナノFETデバイスでは、ベースラインの電気的応答への比較的高速な復帰(低イオン強度検知緩衝液下)が見られるとともに、解離と関係する経時的な電気的応答が類似していた。抗原不含血清試料の見かけの k_{off} は約 $2.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であり、非特異的な化学種の解離が特異的なバイオマーカー分子の解離と同時に起こったことを暗示している。図15は、低流速条件下での血清解離曲線を、当てはめ曲線と共に示す。

40

【0165】

50

このように、選択した低親和性抗トロポニン抗体受容体は、解離レジーム窓を効果的に分け、複雑な生物試料中の抗原分子を定量的に検出するにはあまり適さない。

【0166】

次に、特異的な抗原に対してさらに著しく強い結合親和性を有する抗体受容体を使用した。高親和性抗体は、その抗原からの解離速度が低いことで特徴付けられるが、これを使用することにより、バイオマーカータンパク質の抗体固定化SiNWデバイスからの解離時間がより長くなり、したがって、高親和性低速解離サブレジーム（抗原）から低親和性高速解離サブレジーム（イオン性種、非特異的なタンパク質、小分子化学物質、および細胞）を分けることが可能となる。本実施例では、マウスモノクローナル抗ヒトがん抗原15-3 IgG（抗CA15-3）を使用した。図16は、低流速条件下での、血清中の抗CA15-3抗体の解離曲線を、当てはめ曲線とともに示す。得られた k_{off} は、 $k_{off} = 6.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であり、当該抗体の抗原に対する強い結合相互作用を示している。

10

【0167】

図17A~17Dは、毎分1チャンバ体積交換という低い流量での、解離レジームモードによる手法を使用した、未処理の血清試料中のCA15-3抗原の濃度依存的検知を示す。図17A中、黒色の曲線、赤色の曲線、青色の曲線、および青緑色の曲線は、代表的な抗CA15-3修飾SiNW FET検知デバイスによる、未処理のウシ血清試料中の、それぞれ、0 pM（対照である抗原不含試料）、55 pM、135 pM、および535 pMの濃度の当該抗体の特異的抗原CA15-3の会合および解離（上昇期）に対する、電気的応答の全生データを示す。図17B中、黒色の曲線、赤色の曲線、青色の曲線、および青緑色の曲線は、それぞれ、0 pM（対照である抗原不含試料）、55 pM、135 pM、および535 pMのCA15-3濃度である未処理のウシ血清試料中の、抗CA15-3修飾SiNW FET検知デバイスによる、解離レジームでの正規化された電気的応答を示す。各抗原試料を約6分間（会合プラトーに達するまで）流した後、低イオン強度検知緩衝液による洗浄除去（検知緩衝液 - SB、155 μMリン酸ナトリウム緩衝液、pH約8.0）を行った。黒色の矢印は、未処理の血清試料から低イオン強度検知緩衝液への溶液交換を行った時点を示す。図17Cは、図17B中の測定された解離レジーム曲線中の異なる時点で抽出した、CA15-3抗原の濃度依存的な較正曲線を示す。黒色の正方形、赤色の円、ならびに青色、緑色、桃色、および茶色の三角形は、それぞれ、図17B中の、黒色、赤色、青色、緑色、桃色、および茶色の点線で表された時点に対応する。これらの曲線から、青緑色の円で表示した、分析上関係のある高親和性レジームが、図17B中の解離曲線中で450秒後に始まっていることがわかる。赤色の円は、解離レジーム曲線中の、分析上関係のない時点を表す。図17Dは、図17C中の、青緑色の円で表示した分析上関係のある時点における、CA15-3抗原の濃度依存的な較正プロットを示す。

20

30

【0168】

図17A~17Dから、より高い親和性の抗体受容体を選択することで、100 μL/min（毎分1チャンバ体積交換、チャンバ体積：100 μL）の流量で、解離レジーム窓を2つの解離サブレジーム、すなわち、非特異的高速解離サブレジームと特異的低速解離サブレジームとに、約250秒のレジーム間遷移時間で分けることができることがわかる。

40

【0169】

得られた曲線（図17A）から、解離窓は2つの明確に分かれたサブレジーム、すなわち、約250秒続く高速解離ゾーンと、その後、それ程の変化を伴わずに数十分間続き、低イオン強度検知緩衝液下において抗原との相互作用が生じる前の、デバイスのベースラインの電気的シグナルからの振幅が異なる、低速解離プラトー様ゾーンとからなることが認められる。この観測から、抗原分子は、低親和性の非特異的な化学種の完全な除去に要求される時間枠と比べて、かなり長い間、ナノワイヤに固定化された抗体種と結合したままであることがわかる（ $k_{off}^{\text{抗原}} > k_{off}^{\text{非特異的な化学種}}$ ）。この後者の解離ゾ

50

ーンは、検知緩衝液によるベースラインの電氣的応答（図17B、水平の青色の点線）よりも高い電氣的応答によって特徴付けられるが、血清中の、SiNW FETデバイス表面に強固に結合したままである抗原タンパク質CA15-3の濃度に対する、強くかつ再現可能な依存性を示している。

【0170】

ナノデバイスの表面に限局されたタンパク質抗原の存在についてのさらなる実験的証拠は、再生緩衝液（グリシン緩衝液、 $pH = 3$ ）を使用することによって示された。再生緩衝液は、高親和性抗原-抗体対の解離を迅速にもたらし、続く低イオン強度検知溶液の流入の後、ナノデバイスの電氣的応答をその最初のベースラインの電氣的レベルに戻す。これを図18に示す。図18は、CA15-3抗原に対する抗体で修飾されたナノワイヤデバイスからの、CA15-3抗原の再生曲線のグラフである。

10

【0171】

さらに、異なる濃度のCA15-3抗原を添加した未処理の血清試料に対して濃度依存実験を行ったところ、解離レジーム窓の簡便な検査に基づくこの定量的検出手法のロバスト性が明らかとなった。被験血清試料中のCA15-3の濃度が増加するにつれて（図17B）、より多くのバイオマーカー分子がSiNWデバイス表面と会合し、その結果、（SBによるベースラインの応答と関連して）安定したより大きな電氣的応答がもたらされる。

【0172】

抗CA15-3と抗原CA15-3との間の強力な特異的相互作用のおかげで、非特異的に吸着された塩および生体分子を検知チャンネル内で完全に洗い落とすことができる。これは、CA15-3抗原分子の試料中濃度を定量的に測定するために、低イオン強度検知緩衝液を用いた高速洗出を行いつつも、表面に結合したCA15-3抗原分子の大部分を維持する。

20

【0173】

したがって、高い親和性を有する、抗体が固定された表面からの抗原の解離レジームをモニタリングすることによって、いかなる試料処理工程を用いることもなく、SiNW FET型デバイスを使用した分析的直接検出を行うことができる。これにより、関連する生理的濃度範囲内（67 pM超）のCA15-3に対する臨床診断法にとって十分な感受性で、定量的タンパク質測定を行うことが可能となる。

30

【0174】

このように、本発明の一部の実施形態によれば、 k_{off} が約 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1 \times 10^{-8} s^{-1}$ の間の範囲にある解離速度を示す抗体種は、検出受容体として働き得る。

【0175】

解離流量工程の増加を制御することにより、より親和性の低い抗体も使用することができるように、非特異的な化学種の解離サブレジーム窓を選択することができる。

【0176】

本発明の様々な例示的な実施形態において、例えば、電氣的シグナルのプラトーによって確認される抗原種の完全な会合は、解離が始まる前に達成される。このことは、試験中の抗原の最終濃度は、抗原の会合の前の、低イオン強度条件下におけるベースラインの電氣的シグナルと、低親和性種を検知デバイスの近傍から完全に除去した後に達成される、解離曲線のプラトー（高親和性レジーム）との間の差に基づいて計算されるため、濃度依存的な分析的検知の結果が望まれるときに有利である。よって、検知中に用いられる抗原会合時間の差に起因して、ナノ検知デバイスに会合した抗原種の量が変化することで、導出される濃度依存的な較正曲線が変化する可能性がある。

40

【0177】

したがって、本発明の様々な例示的な実施形態において、分析の一貫性を得るため、一定の長さの抗原会合時間を用いるか、あるいは、完全に会合させる。

【0178】

50

抗原濃度を定量的に評価するため、最初に、検知デバイスを抗原不含血清試料に曝露することで、解離サブレジーム間の遷移時間を測定した。この試料は、低親和性種の完全な除去が達成された正確な時点を導出するための参照としての役割を果たした。この時点の後、抗原種が低速で解離するという前提の下で、図 17C および 17D に示されているように、抗原濃度の正確な定量的評価を確信をもって行うことができる。

【0179】

本発明者らは、このような較正工程が必ずしも必須でないことを見出した。これより、図 19A および 19B を参照してこれを説明する。図 19A および 19B は、毎分 330 チャンバ体積という流量での、特異的に化学修飾された SiNW FET デバイスと非特異的に化学修飾された SiNW FET デバイスを使用した、CA15-3 抗原の多重単一チップ差分検出の実例を示す。このように、本実施形態の検知アレイを、主に 2 種類の化学修飾ナノデバイスによって作製することができる。第 1 のグループは、調査対象の抗原に特異的な抗体で化学的に修飾された検知ナノデバイスに相当し、第 2 のグループのナノデバイスは、非免疫反応性タンパク質（または非特異的な抗体受容体）で化学的に修飾されており、オンチップの内部参照デバイスとして働く。

10

【0180】

後者のグループのデバイスは、試験対象である生物試料中の抗原との特異的相互作用が存在しないため、生物試料中に存在する低親和性高速解離性種と非特異的に相互作用するのみであって、第 1 の解離サブレジームに達する正確な遷移時間を簡単に導出することが可能であり、抗原濃度の定量的評価を行うことができる。このように、これらの非反応性オンチップ参照デバイスを使用することにより、リアルタイムモードでのバイオマーカーに対する高感度の定量的同時検出が可能となる。さらに、解離に関連した洗出工程の流量を増加させることにより、低親和性高速解離サブレジーム時間窓を狭めることができ、よって、抗原種のより高速でより正確な定量的検出が可能となる。これを目的として、流体ポンプ送出システムで容易に達成可能な流量で、数値上、かなり大きな流量（チャンバ体積交換速度）を得ることが可能となるように、より小さい寸法のマイクロ流体チャンバを使用した。

20

【0181】

さらに、先に使用した 100 μ L の大型のチャンバの代わりに、より小さい寸法のマイクロ流体チャンネルを使用することで、解離洗浄レジーム中の流体交換がより効率的になるとともに、必須要件となる生物試料の体積がかなり小さくなり、恐らく数マイクロリットルを下回る。図 19A および図 19B は、上記で解説した差分オンチップ検出手法による、CA13-5 バイオマーカーの検出を目的として行われた測定の実例を示す。ここでは、100 μ L/min というかなり大きな有効流量（毎分 330 チャンバ体積のチャンバ体積交換速度、チャンバ体積：0.3 μ L）を使用している。

30

【0182】

非免疫活性タンパク質で修飾されたナノワイヤデバイスから得られた解離曲線と、特異的な抗体で修飾されたデバイスによって得られた解離曲線とを比較することにより、抗体修飾ナノワイヤ型デバイスと会合したバイオマーカーの量を測定することができる。バイオマーカー CA15-3 に対する特異性を有さないタンパク質である BSA で修飾された SiNW デバイスは、検知緩衝液による洗出後約 25 秒でプラトーに達した（図 19A、赤色および青色の曲線）。高流速条件下での抗原不含血清の解離曲線を、当てはめ曲線と共に図 20 に示す。 k_{off} を計算したところ、約 $1.4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。

40

【0183】

抗体修飾 SiNW デバイスからの脱着の動力学はかなり低速であり、標的抗原の濃度とよく相関する。より大きな溶液交換速度を用いることにより、高速解離サブレジーム窓が、約 250 秒から約 25 秒へと 10 分の 1 に狭まり、これにより、抗原バイオマーカーの正確で高感度な定量的評価に影響を与えず、オフラインの較正工程を必須としない、かなり高速の検出サイクルが可能となることを実証している。これらの結果は、適切な k_{off} 値を有する生体受容体と十分な寸法（考えられる中で最速の流体交換が可能）を有する

50

マイクロ流体チャンバの使用とを同時に組み合わせることで、その解離レジームに基づいて、高速で、高感度で、かつ正確な、生体分子の直接検出が可能となる。

【0184】

より高流速である条件により、かなり親和性の低い抗体受容体またはその他の生体受容体を使用することができる。この実施例で記述した技法を、未処理の血液試料に適用することができる。この実施例で行った測定は、低流速条件下で約300秒、高流速条件下ではより短い約80秒の時間の後に、低親和性の非特異的な化学種（血液細胞、タンパク質、塩、および小分子化学物質）の完全な除去が達成できることを実証している。図21は、低流速条件下での未処理の抗原不含血液の解離曲線を、当てはめ曲線と共に示す。得られた k_{off} は、 $1.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。

10

【0185】

本実施例は、複雑な生物試料、血清、および未処理の血液中の直接検出において使用するために、抗体修飾ナノワイヤセンサからの抗原解離レジームを利用する実例を示すものである。本実施形態の技法は、濾過、予備濃縮、および脱塩等の、時間の掛かる $ex\ situ$ における生物試料の処理工程を必要としない。

【0186】

高親和性抗体受容体と高流量の溶液交換とを組み合わせることにより、複雑な解離レジーム窓が、2つの完全に別々の解離サブレジームに効果的に分けられ、これにより、バイオマーカーの定量的検出が可能となる。 $Ex\ situ$ における処理工程がないことにより、検知プラットフォームの携帯性が増し、未処理生物試料の直接検出が可能となり、被験試料の要求体積が減少し（例えば、約5～約10 μL の血液または血清）、検出サイクルの長さが5分未満に短縮される。

20

【0187】

本発明をその特定の実施形態との関連で記載してきたが、多数の変更、修正及び変化が当業者には明らかであろう。従って、そのような変更、修正及び変化の全ては、添付の特許請求の範囲の趣旨及び広い範囲内に含まれることを意図するものである。

【0188】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許及び特許出願のそれぞれが具体的に及び個別に参照により本明細書に組み込まれる場合と同程度に、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。加えて、本明細書中の任意の参考文献の引用又は特定は、それらの参考文献が本発明の先行技術として使用できることの容認として解釈されるべきではない。また、各節の表題が使用される範囲において、必ずしも限定するものとして解釈されるべきではない。

30

【 図 1 - 1 】

図 1A

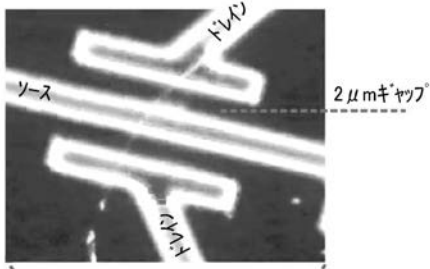
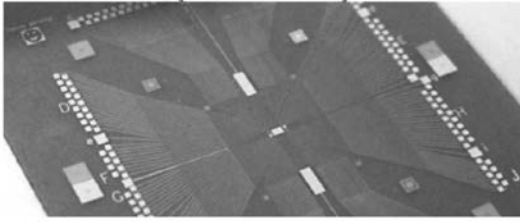


図 1B



【 図 1 - 2 】

図 1C

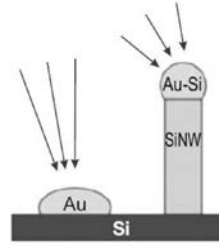


図 1D



図 1E



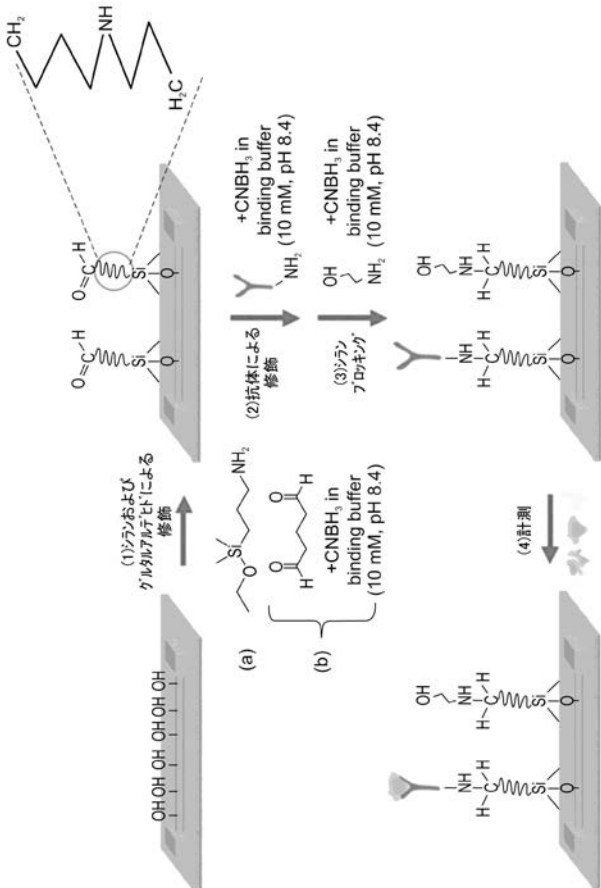
図 1F



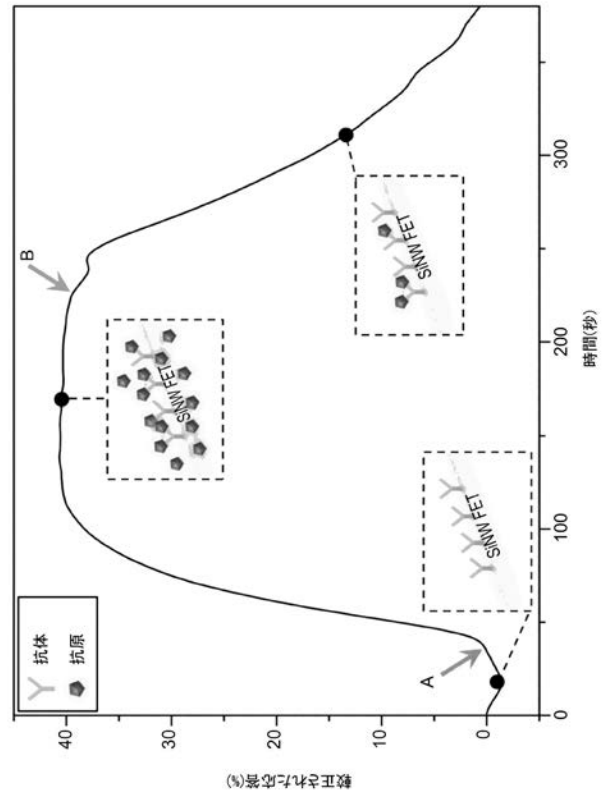
図 1G



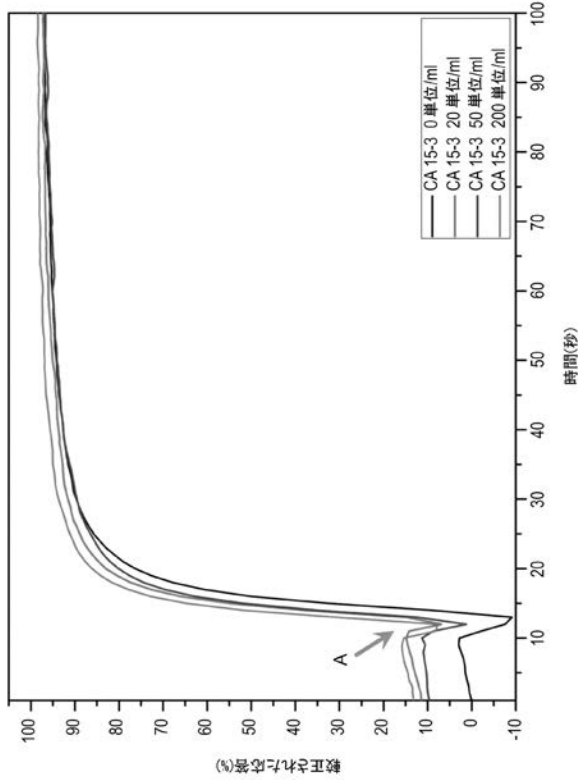
【 図 2 】



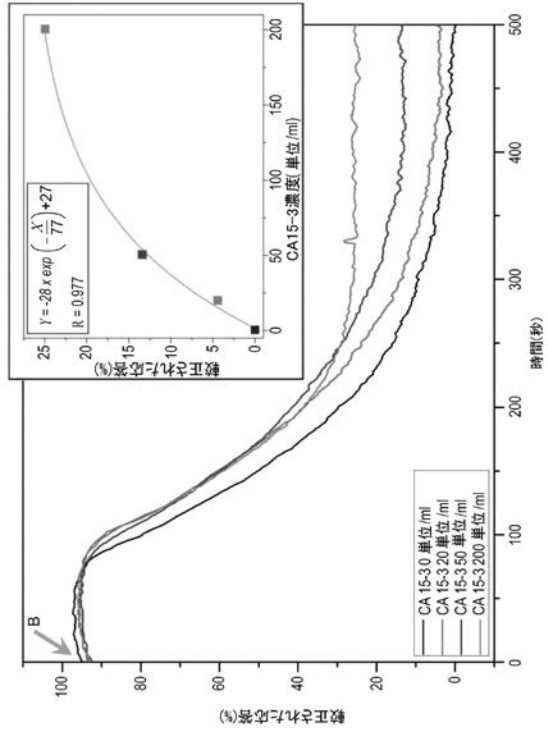
【 図 3 】



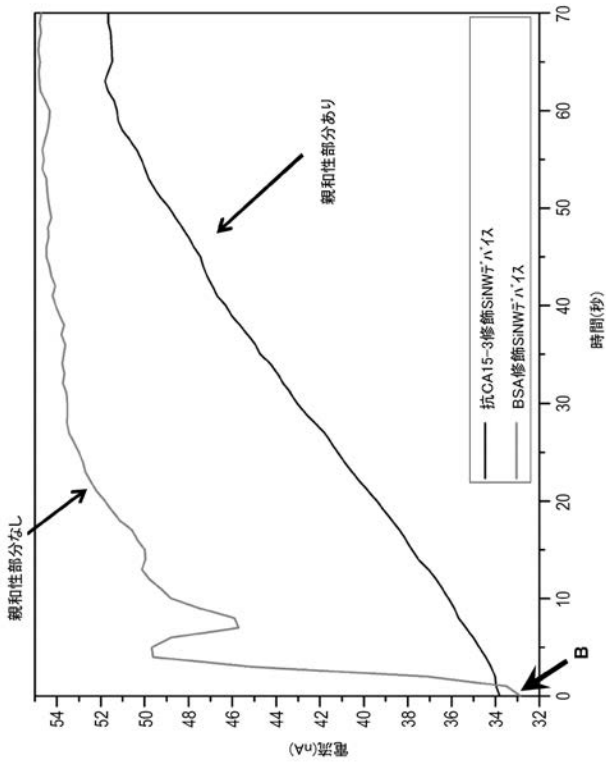
【 図 4 】



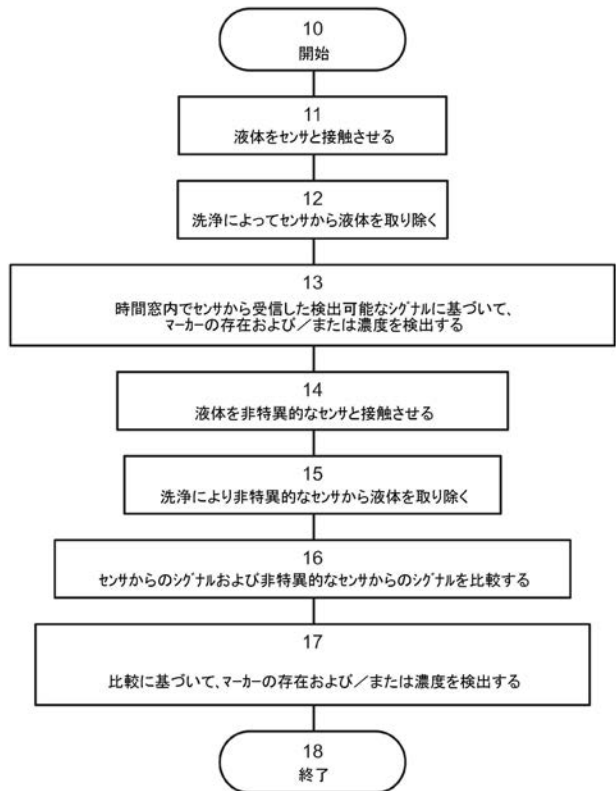
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

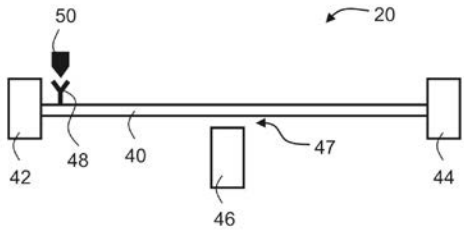


図 8A

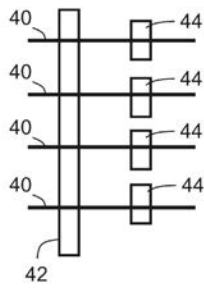
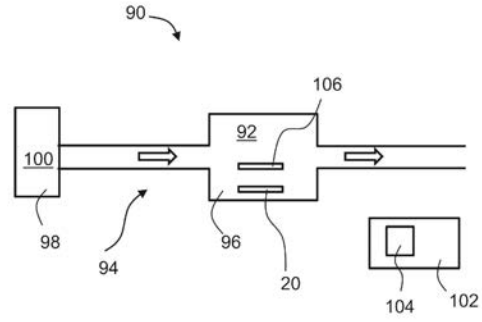
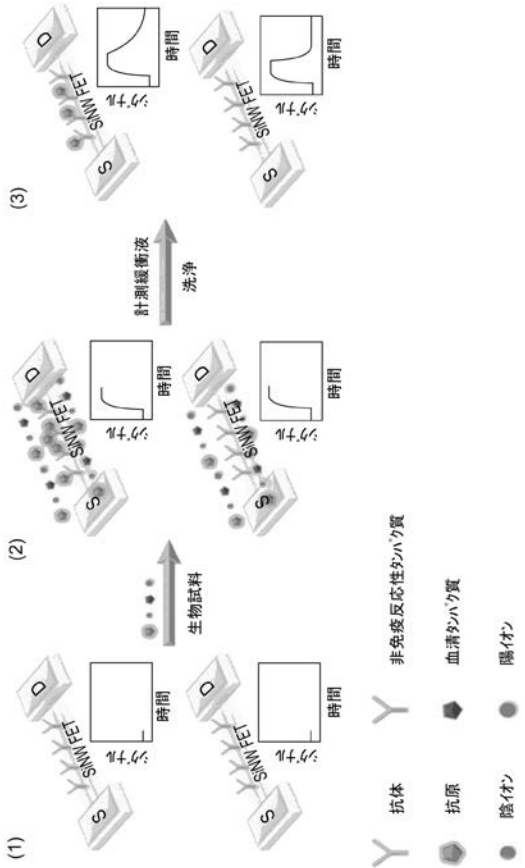


図 8B

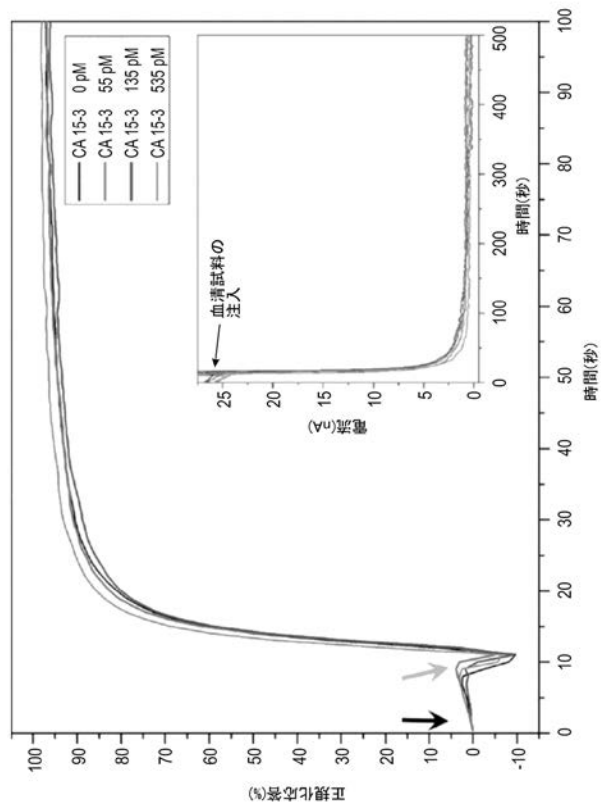
【 図 9 】



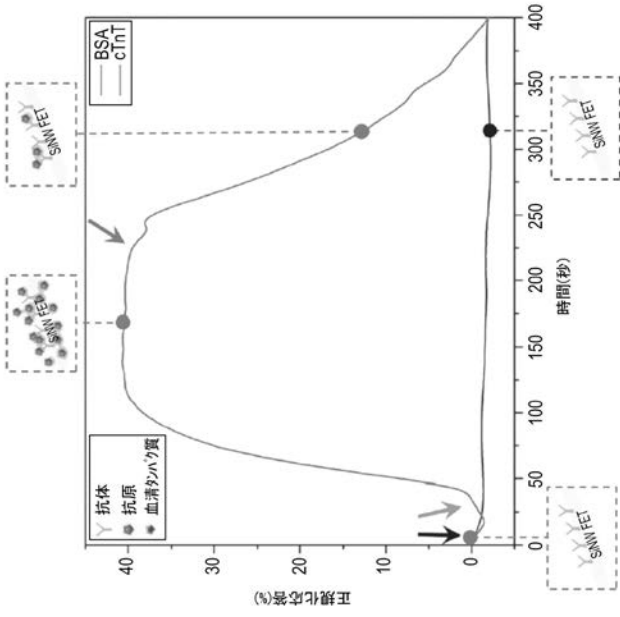
【 図 10 】



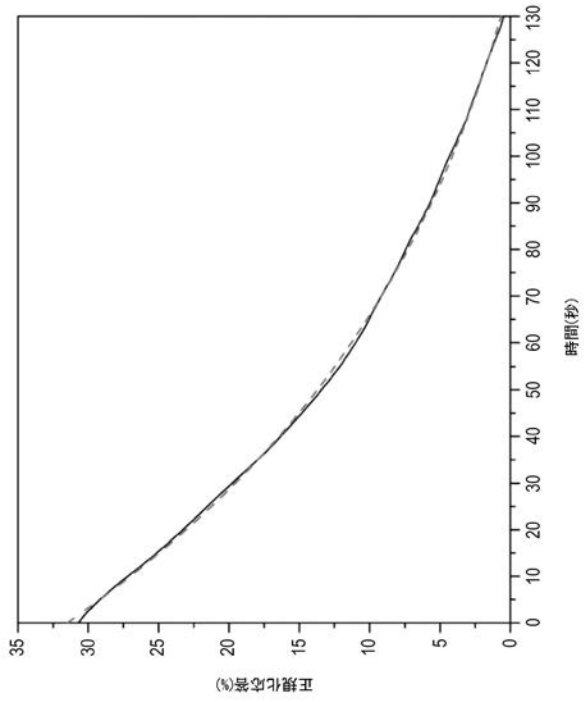
【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

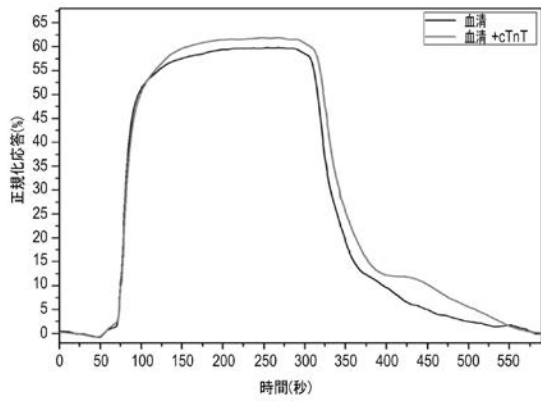


図 14A

【 図 1 5 】

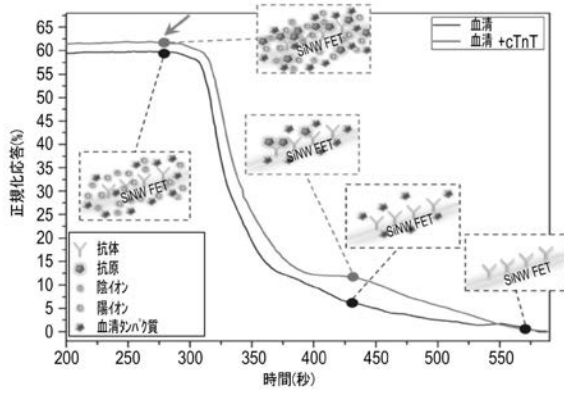
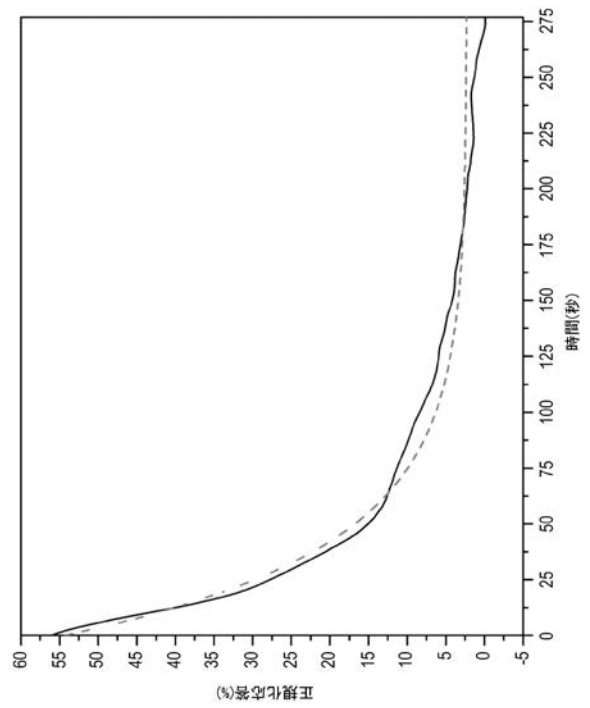
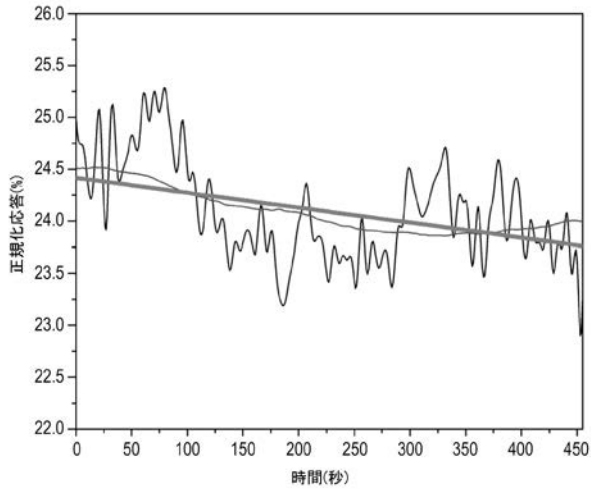
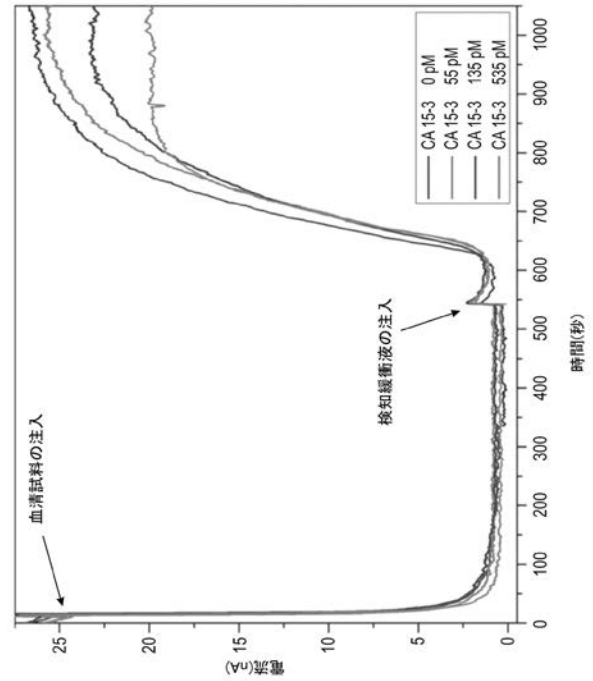


図 14B

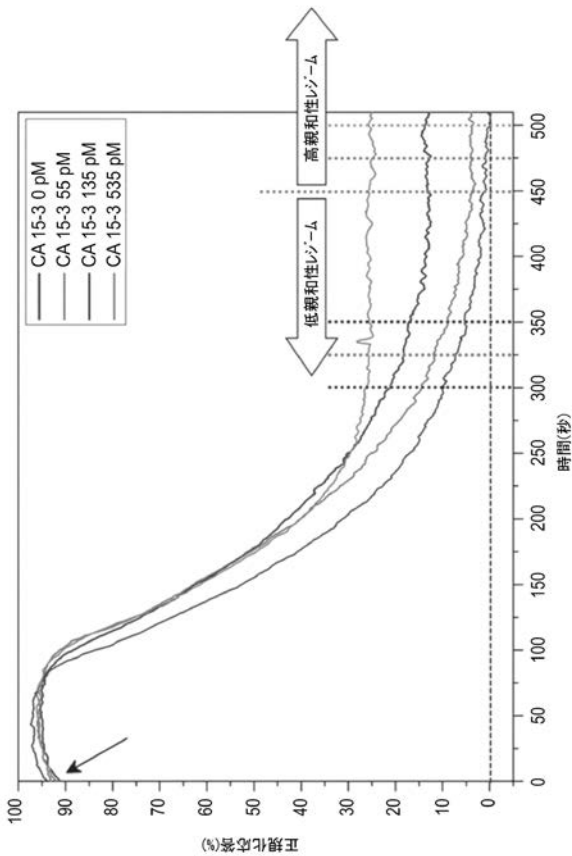
【 図 1 6 】



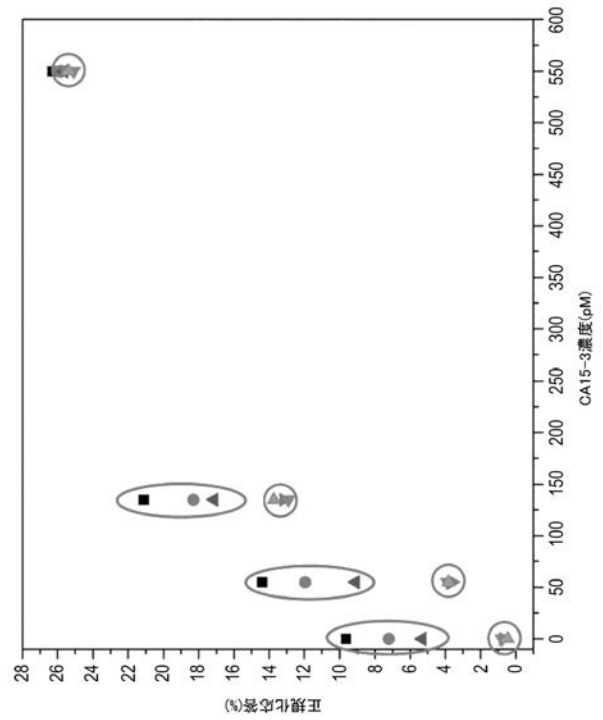
【 図 1 7 A 】



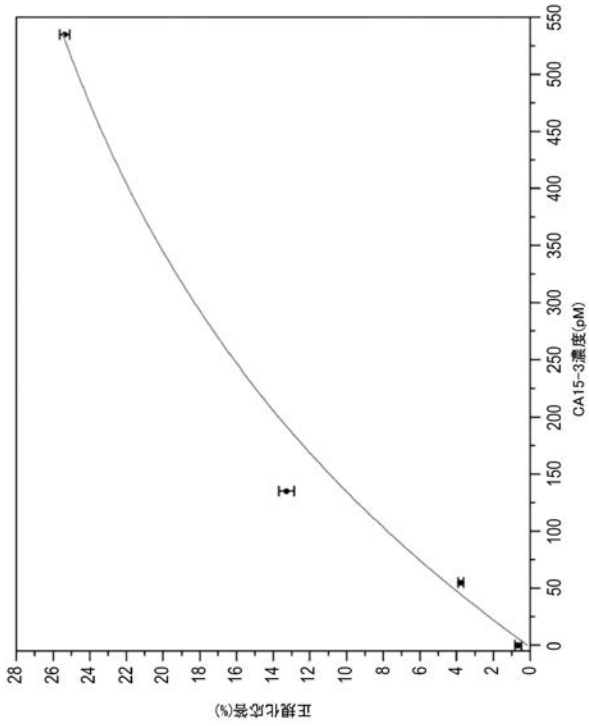
【 図 1 7 B 】



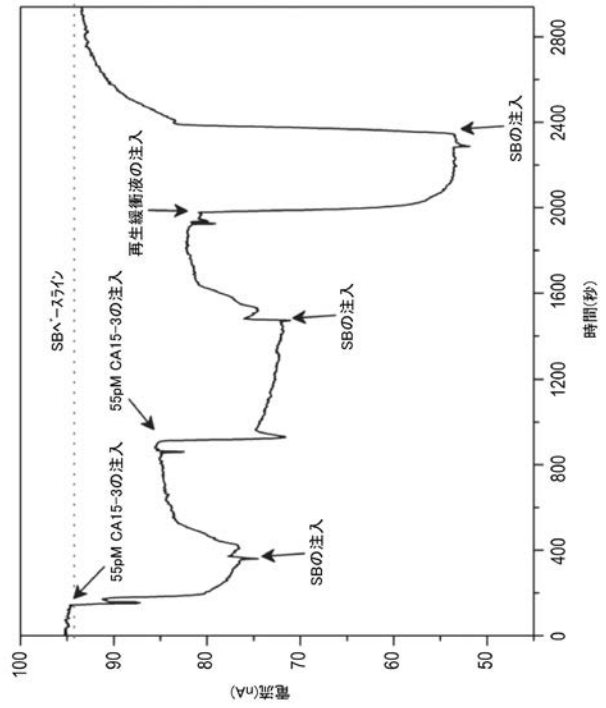
【 図 1 7 C 】



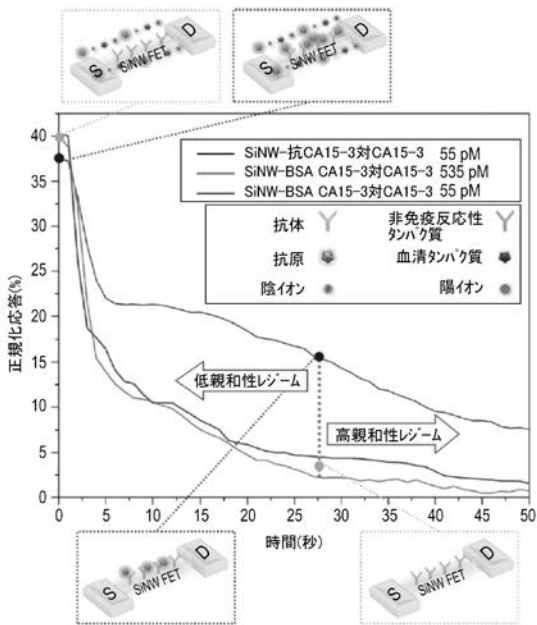
【 図 1 7 D 】



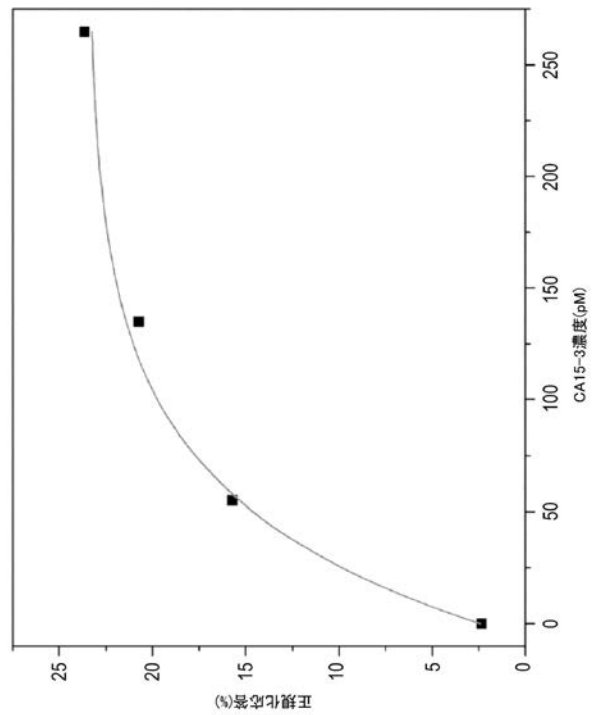
【 図 1 8 】



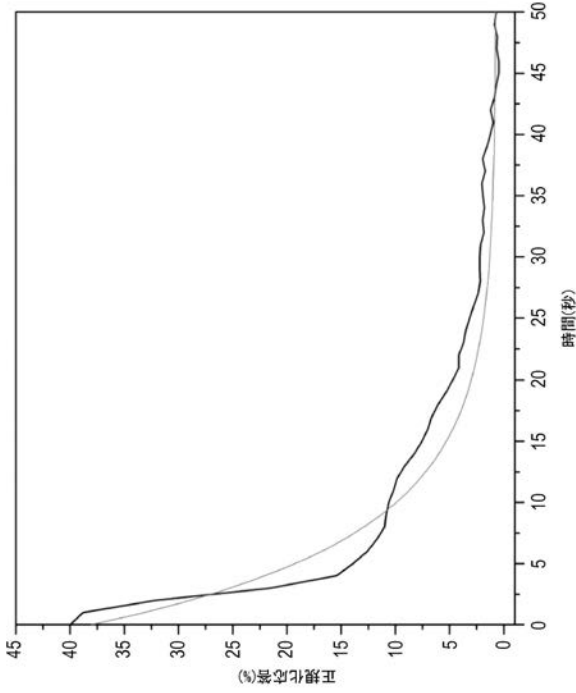
【 図 1 9 A 】



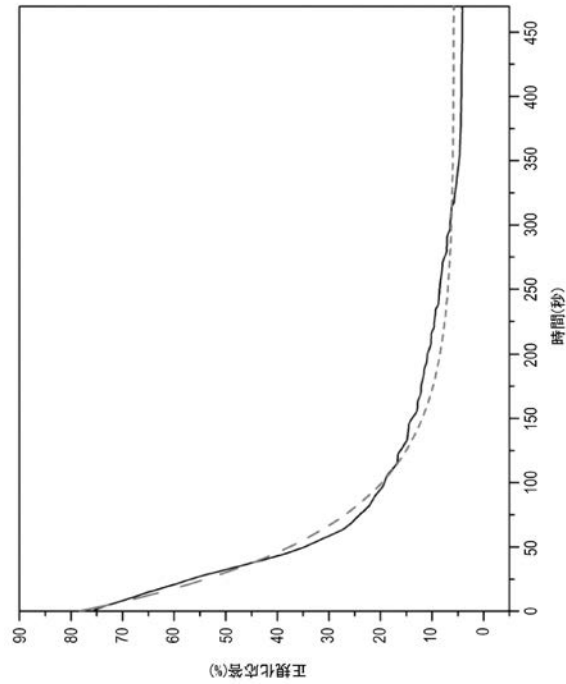
【 図 1 9 B 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】

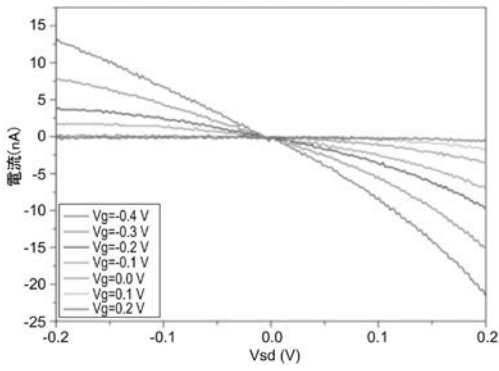


図 22A

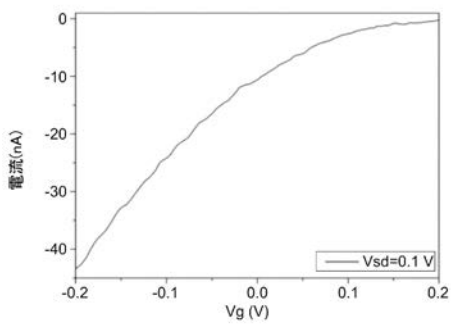
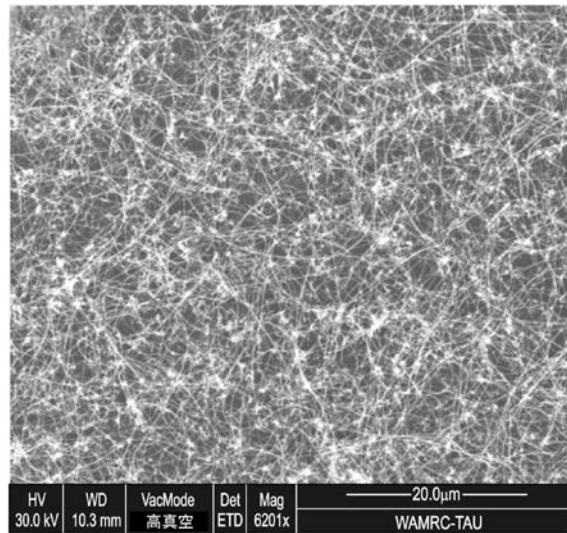
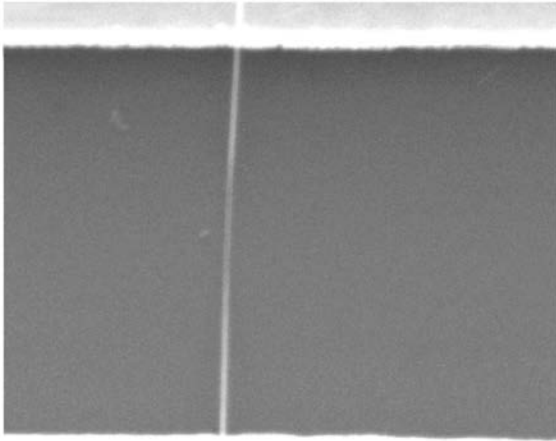


図 22B

【 図 2 3 A 】



【 図 2 3 B 】



HV	WD	Det	Mag	VacMode	1.0μm
20.0 kV	10.5 mm	ETD	84458x	高真空	TAU-WAMRC

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL2016/051319
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC (2017.01) B82Y 10/00, G01N 27/327, G01N 27/414, G01N 33/53, G01N 33/543 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) IPC (2017.01) B82Y, 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) See extra sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lu, Na, et al. "Label-free and rapid electrical detection of hTSH with CMOS-compatible silicon nanowire transistor arrays." ACS applied materials & interfaces 6.22 (published on: 22.10.2014): 20378-20384. Retrieved from the internet: 15.03.17. URL: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am505915y 22 Oct 2014 (2014/10/22) whole document Figs. 4a 4b, 5; Table 1 page 20381 left hand col. last para.;	1-35
X	Mohanty, Pritiraj, et al. "Field effect transistor nanosensor for breast cancer diagnostics." arXiv preprint arXiv:1401.1168 (published on: 06.01.2014). Retrieved from the internet: 19.03.17. URL: https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1401/1401.1168.pdf 06 Jan 2014 (2014/01/06) whole document page 5 section b, page 10 second para., page 14 third para.,	1-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 22 Mar 2017		Date of mailing of the international search report 26 Mar 2017
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HERMAN Karim Telephone No. 972-2-5651749

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2016/051319

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>Huang, Yu-Wen, et al. "Real-time and label-free detection of the prostate-specific antigen in human serum by a polycrystalline silicon nanowire field-effect transistor biosensor." <i>Analytical chemistry</i> 85.16 (published on: 11.07.2013): 7912-7918.</p> <p>Retrieved from the internet: 16.03.17. URL: https://ir.nctu.edu.tw/bitstream/11536/22546/1/000323471800041.pdf</p> <p>11 Jul 2013 (2013/07/11) whole document page 7914 right hand col. 1st para. Figs. 3b, 4b, 6</p>	1-35
Y	<p>Mu, Luye, et al. "Silicon Nanowire Field-Effect Transistors—A Versatile Class of Potentiometric Nanobiosensors." <i>IEEE Access</i> 3 (published on: 22.04.2015): 287-302.</p> <p>Retrieved from the internet: 19.03.17. URL: http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=7089167</p> <p>22 Apr 2015 (2015/04/22) whole document page 293 left hand col. 4th para., page 290 right hand col. 1st para.</p>	1-35
Y	<p>Chen, Pengyu, et al. "Label-free cytokine micro- and nano-biosensing towards personalized medicine of systemic inflammatory disorders." <i>Advanced drug delivery reviews</i> 95 (published on: 25.09.2015): 90-103.</p> <p>Retrieved from the internet: 19.03.17. URL: https://www.researchgate.net/profile/Katsuo_Kurabayashi/publication/282244750_Label-free_cytokine_micro_and_nano-biosensing_towards_personalized_medicine_of_systemic_inflammatory_disorders/links/5612587908ae0fc513f32fe5.pdf</p> <p>25 Sep 2015 (2015/09/25) whole document page 4 right hand col. 1st para., Fig. 3</p>	1-35
P,X	<p>Krivitsky, Vadim, Marina Zverzhinetsky, and Fernando Patolsky. "Antigen-Dissociation from Antibody-Modified Nanotransistor Sensor Arrays as a Direct Biomarker Detection Method in Unprocessed Biosamples." <i>Nano Letters</i> 16.10 (31.08.2016): 6272-6281.</p> <p>Retrieved from the internet on: 15.03.17. URL: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.nanolett.6b02584</p> <p>31 Aug 2016 (2016/08/31) whole document</p>	1-35
A	<p>Fernando Patolsky. <i>Nanotechnology Tools in Biology and Medicine Applications</i>. YouTube [online] [video]. "Summer School on Nanomedicine and Innovation", The Marian Gertner Institute for Medical Nanosystems, Tel Aviv University, June 19, 2014 [retrieved on 22.03.17]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=zdHRh76dtSM></p> <p>19 Jun 2014 (2014/06/19) entire video</p>	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2016/051319

B. FIELDS SEARCHED:

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

Databases consulted: PATENTSCOPE, THOMSON INNOVATION, Esp@cenet, Google Patents, BIOSIS, REGISTRY, PubMed, Google Scholar, PatBase

Search terms used: silicon, nanowire, field effect transistor, SiNW, FET, antibody-antigen, biosample, Label free, real-time, Dissociation constant, Koff, Kd, antibody-modified, antibody-functionalized, sensing device, sensors, dissociation regime, Point of care testing, affinity-based biosensors, flow rate, affinity strength

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, 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, 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, TZ

(72)発明者 ズヴェーージェネツキー マリーナ

イスラエル国 リション - レジオン エルサレム ストリート 45エー/9

Fターム(参考) 2G060 AA07 AA19 AD06 AF06 AF07 AF08 AF09 AF10 DA00 DA12
 JA07 KA09
 5F110 BB09 CC07 DD05 EE02 EE04 EE08 EE14 FF02 GG01 GG02
 GG03 GG22 GG23 GG28 GG42 GG58 HK02 HK32 NN03 NN04
 NN22 NN24 NN35

专利名称(译)	用于通过修饰的纳米结构进行检测的方法和系统		
公开(公告)号	JP2019501383A	公开(公告)日	2019-01-17
申请号	JP2018530021	申请日	2016-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	拉莫特在特拉维夫大学DF有限公司 特拉维夫大学拉莫特有限公司		
申请(专利权)人(译)	拉莫特在特拉维夫, 普遍的DF有限公司		
[标]发明人	パトルスキーフェルナンド クリヴィツキーヴァディム ズヴェージネツキーマリーナ		
发明人	パトルスキー フェルナンド クリヴィツキー ヴァディム ズヴェージネツキー マリーナ		
IPC分类号	G01N27/02 G01N33/53 G01N27/00 H01L29/786		
CPC分类号	B82Y15/00 G01N27/4146 G01N33/5005 H01L51/0049 H01L51/0545 H01L51/0558 H01L23/532 H01L29/06 H01L29/0665 A61B5/1473 A61B5/4866 A61B5/6833 A61B5/6847 H01L29/0673 H01L29/16		
FI分类号	G01N27/02.D G01N33/53.Z G01N27/00.J H01L29/78.622		
F-TERM分类号	2G060/AA07 2G060/AA19 2G060/AD06 2G060/AF06 2G060/AF07 2G060/AF08 2G060/AF09 2G060/AF10 2G060/DA00 2G060/DA12 2G060/JA07 2G060/KA09 5F110/BB09 5F110/CC07 5F110/DD05 5F110/EE02 5F110/EE04 5F110/EE08 5F110/EE14 5F110/FF02 5F110/GG01 5F110/GG02 5F110/GG03 5F110/GG22 5F110/GG23 5F110/GG28 5F110/GG42 5F110/GG58 5F110/HK02 5F110/HK32 5F110/NN03 5F110/NN04 5F110/NN22 5F110/NN24 5F110/NN35		
优先权	62/264913 2015-12-09 US 62/264944 2015-12-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了检测液体 (例如, 液体) 中标记物 (例如, 标记物) 的存在和/或浓度的方法。 该方法是使传感器与液体接触的步骤, 以使传感器具有固定的亲和力部分, 该亲和力部分与标记物相互作用并响应于该相互作用而产生可检测的信号。 包括配置步骤。 该方法包括以下步骤: 通过洗涤从传感器去除液体, 并基于在洗涤开始后预定时间开始的时间窗内, 基于从传感器接收到的可检测信号, 确定标记物的存在和/或其浓度。 并进行检测。 [选择图]图7

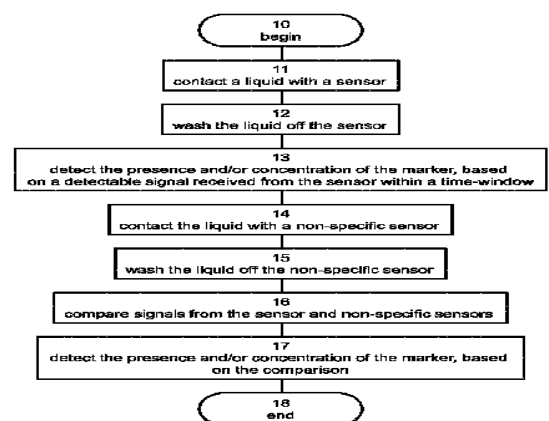


FIG. 7