

(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2014-533832

(P2014-533832A)

(43) 公表日 平成26年12月15日(2014.12.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 9 3	4 B 0 2 9
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	4 B 0 6 3
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	
<b>C 1 2 M 1/34 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/34 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-541801 (P2014-541801)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月16日 (2012.11.16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月11日 (2014.7.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/056473  
 (87) 国際公開番号 W02013/072877  
 (87) 国際公開日 平成25年5月23日 (2013.5.23)  
 (31) 優先権主張番号 61/560,450  
 (32) 優先日 平成23年11月16日 (2011.11.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 11191453.7  
 (32) 優先日 平成23年12月1日 (2011.12.1)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 590000248  
 コーニンクレッカ フィリップス エヌ  
 ヴェ  
 オランダ国 5 6 5 6 アーエー アイン  
 ドーフエン ハイテック キャンパス 5  
 (74) 代理人 100107766  
 弁理士 伊東 忠重  
 (74) 代理人 100070150  
 弁理士 伊東 忠彦  
 (74) 代理人 100091214  
 弁理士 大貫 進介  
 (72) 発明者 エフェルス, トーン ヘンドリック  
 オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アイン  
 ドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビ  
 ルディング 4 4

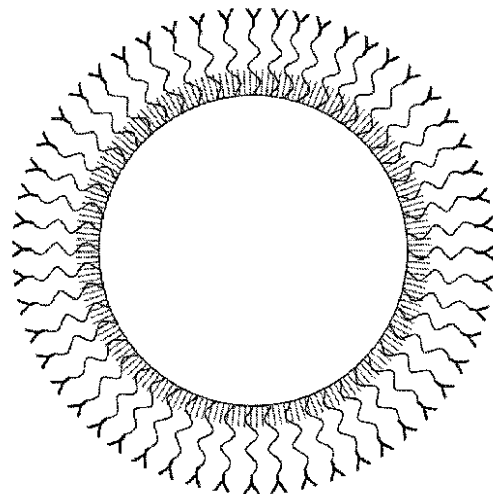
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性粒子免疫アッセイにおける表面接触を高めるための粒子反発力

(57) 【要約】

本発明は、試料中の標的分子を検出するためのデバイスに関するものであり、このデバイスは試料中の標的分子を測定するための試料容器と、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子が付着している磁性粒子と、第2の結合分子を備えるセンサー表面を備える。前記磁性前記磁性粒子は、前記第1の結合分子と、前記磁性粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで結果として磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じさせる反発表面構造によって官能化される。前記磁性粒子はセンサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える。第2の態様では、本発明は、試料中の標的分子を検出するためのデバイスを説明する。当該デバイスは少なくとも2種類の磁性粒子の混合物と、第2の結合分子を備えるセンサー表面とを備える。前記少なくとも2種類の磁性粒子のうちの

FIGURE 8



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の標的分子を検出するためのデバイスであって、

- ( a ) 試料中の前記標的分子を測定するための試料容器と、
- ( b ) 磁性粒子と、

を備え、

前記粒子は、

( i ) 前記標的分子に特異的に結合することができる第 1 の結合分子であって、前記磁性粒子に付着される、第 1 の結合分子と、

( i i ) 前記粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の前記表面を覆うことで結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および / または立体反発を生じる、反発表面構造と

10

、  
によって官能化され、

当該デバイスはさらに、

( c ) 第 2 の結合分子を備えるセンサー表面であって、前記磁性粒子は前記センサー表面の前記第 2 の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる、センサー表面を備え、

結合粒子の個数は、前記試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および / または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える、

20

デバイス。

**【請求項 2】**

試料中の標的分子を検出するためのデバイスであって、

- ( a ) 試料中の前記標的分子を測定するための試料容器と、
- ( b ) 少なくとも 2 種類の磁性粒子の混合物と、

を備え、

( i ) 前記少なくとも 2 種類の磁性粒子の混合物のうちの第 1 の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができる第 1 の結合分子によって官能化され、前記第 1 の結合分子は、前記粒子に付着され、

( i i ) 前記少なくとも 2 種類の磁性粒子の混合物のうちの第 2 の種類は、前記粒子の表面に直接付着するして、前記磁性粒子の前記表面を覆うことで、結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および / または立体反発を生じる、反発表面構造によって官能化され、

30

当該デバイスはさらに、

( c ) 前記磁性粒子が直接的に、または間接的に結合することができる第 2 の結合分子を備えるセンサー表面を備え、

結合粒子の個数は、前記試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および / または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える、

40

デバイス。

**【請求項 3】**

前記第 1 の結合分子は、リンカー分子を介して前記粒子に付着し、好ましくは、前記リンカー分子は、前記反発表面構造より長い請求項 1 または 2 に記載のデバイス。

**【請求項 4】**

前記リンカー分子は、前記反発表面構造であるか、または含む請求項 3 に記載のデバイス。

**【請求項 5】**

前記反発表面構造は、前記標的分子に特異的に結合することができる第 1 の結合分子によってさらに官能化される請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

**【請求項 6】**

50

前記ブッシング効果は、前記表面の相互作用を少なくとも1%増加させることによって決定される請求項1から5のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項7】

前記反発表面構造は、荷電構造または立体コーティングである請求項1から6のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項8】

(i)前記荷電構造は、約25mVのゼータ電位を少なくとも前記磁性粒子に伝え、および/または(ii)前記立体コーティングは、前記磁性粒子の半径の少なくとも約105%の前記磁性粒子の流体力学的半径を伝える請求項7に記載のデバイス。

【請求項9】

前記第1の結合分子は、抗体もしくはその断片、アプタマー、または相補的核酸である請求項1から8のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項10】

前記荷電構造は、dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖などの核酸分子、ヒドロゲル、および重合体からなる群から選択される分子であるか、または含む請求項1から9のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項11】

前記リンカー分子および/または反発表面構造は、デオキシリボヌクレアーゼおよび/または二本鎖核酸分子を切断することができる制限酵素によって開裂可能でない請求項3から9のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項12】

前記核酸分子は、好ましくはdsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖で、

前記核酸分子は、長さが約50から1000ヌクレオチド、好ましくは約100ヌクレオチドである請求項10または11に記載のデバイス。

【請求項13】

試料中の標的分子の存在または量を検出する方法であって、

(a)前記試料と請求項1から12のいずれか1項に記載のデバイス内で粒子に付着している第1の結合分子とを接触させるステップと、

(b)前記試料を、

i)センサー表面に付着することができる第2の結合分子であって、前記第1の結合分子および/または前記第2の結合分子は、前記標的分子に特異的に結合することができる、第2の結合分子、および任意で、

ii)前記センサー表面に付着している標的類似分子であって、前記標的分子は、前記標的類似分子への前記第1の結合分子の前記結合を妨げることができる、標的類似分子と

接触させるステップと、

(c)前記センサー表面に結合された粒子の個数を検出するステップとを含み、

前記粒子を前記センサー表面に近接近させるために磁力が印加され、結合粒子の前記個数は、前記試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例する方法。

【請求項14】

試料中の標的分子を検出するための請求項1から12のいずれか1項に記載の磁性粒子の使用。

【請求項15】

前記標的分子は、心臓トロポニンI(cTnI)、NT-proBNP、または副甲状腺ホルモンである請求項1から12のいずれか1項に記載のデバイス、または請求項13に記載の方法、または請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、試料中の標的分子を検出するためのデバイスに関する。当該デバイスは試料中の標的分子の測定のための試料容器と、磁性粒子と、センサー表面とを備える。前記磁性粒子は、前記標的分子に特異的に結合することができる、前記磁性粒子に付着している第1の結合分子と、前記磁性粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで、結果として磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じる、反発表面構造 (repulsive surface structure) とによって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子は前記センサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果 (electrostatic and/or steric pushing effect) を前記センサー表面の方へ伝える。第2の態様では、本発明は、試料中の標的分子を検出するためのデバイスを説明する。当該デバイスは少なくとも2種類の磁性粒子の混合物と、センサー表面とを備える。前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第1の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができる、この粒子に付着している第1の結合分子によって官能化される。前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第2の種類は、前記粒子の表面に直接付着して、磁性粒子の表面を覆うことで、結果として磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じる、反発表面構造によって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子はセンサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。さらに、本発明では、試料中の標的分子の存在または量を検出する方法、さらには試料中の標的分子を検出するための磁性粒子の使用を説明する。

10

20

#### 【背景技術】

#### 【0002】

広く利用できる効果的なヘルスケアに対する需要の高まりにより、体外診断薬の分野は総合的ランダム・アクセス/ポイントオブケア診断に向かっている。このような診断の達成は困難である。検査は、迅速であること、高感度であること、定量的であること、および正確であることが求められる。さらに、検査を実施する際に用いるプラットフォームの使い易さ、およびコンパクトさも要求される。

#### 【0003】

親和性アッセイは生体分子を利用して、試料から特異的標的分子を捕獲し、その濃度の判定を可能にする。典型的には、親和性捕獲は、捕獲分子でコーティングされたナノまたはマイクロ粒子を試料流体内で分散させることによって達成される (Luchiniら、2008年、Nano Lett.、8(1)、350~361頁)。したがって、典型的な親和性に基づくアッセイは、典型的には特異的生体分子に向かう高結合親和力によって特徴付けられる、例えば、抗体などの、親和性分子を使用することによる、診断アッセイ、研究におけるタンパク質、ペプチド、および核酸などの生体分子の検出、などの膨大な数の用途において使用されている。原理上、官能化された磁性粒子はセンサー表面に付着し、これらの粒子は、間接的に、つまり、捕獲された検体により、または直接的に、表面にプリントされた抗体などの捕獲プローブに結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例する。典型的には、このようなバイオセンサー用途において、粒子は、表面付近にある粒子に対して敏感である技術を使用して検出することができ、多くの場合、このような技術は、例えばBrulsら、Lab Chip、2009年、9、2504~3510頁で説明されているような散乱光の検出または漏れ全反射 (FTIR) などの光学的検出に基づく。米国特許出願公開第2009/0148863A1号では、官能化されたナノ粒子に基づく超低レベルの検出において有用な組成物を開示している。説明されているナノ粒子の表面は、生体部分を結合するように適合された第1の単分子層成分を備えることができる。ナノ粒子表面は、表面上の第1の単分子層成分を露出するのを助けるように適合された、第2の単分子層構成要素をさらに備えることができる。本願では、貴金属ナノ粒子、特にAgナノ粒子に注目する。

30

40

#### 【0004】

50

しかし、従来技術において説明されているような親和性アッセイの重大な課題は、標的分子を表面に結合した官能化された粒子の結合は依然として非常に遅く、律速的で、かつ不効率なことである。この反応が遅いことの原因の1つは、粒子と表面との相互作用が制限されていることにある。本出願の発明者らは、そのようなアッセイにおいて、図2からわかるように磁場がオフにされたときに粒子は典型的には表面から拡散して離れてゆき、それにより結合を実行するために表面の近くで粒子が費やす時間が短くなることを見いだした。また、底部にある粒子を表面に向けてさらに押し下げることができる粒子雲の最上位層を生成するためにより多くの粒子を使用することも、粒子毎の結合確率を下げるという不利点を有する。

#### 【0005】

そこで、粒子の量を増やすことなく粒子と表面との接触を増大させるための手段および方法を提供することが強く求められている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明ではこれらの要求に応え、表面へ粒子が結合する効率を高めるための手段を提供する。上記の目的は、具体的には、試料中の標的分子を検出するためのデバイスによって達成され、このデバイスは試料中の標的分子を測定するための試料容器と、磁性粒子と、センサー表面とを備える。前記磁性粒子は、前記標的分子に特異的に結合することができる、この粒子に付着している第1の結合分子と、前記粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで、結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じる、反発表面構造とによって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子は前記センサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる、結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

特に、本発明では、表面接触、したがって磁性ナノ粒子の結合確率が粒子上に反発表面構造を設けることで如何にして増大するのかを説明する。驚くべきことに、粒子上での高電荷または立体コーティングに由来する反発力は、2つの重要な効果を有することを見いだすことができた。第1に、粒子間の反発力が高まることで、粒子同士の非特異的結合に関して有利である粒子の凝集が減少する。第2の重要な効果は、反発力が全体的な「押す」力の形成をもたらし、その結果粒子濃度を高めずとも粒子を表面の方へ押すという効果が生じることである。図4に示されているような実験において、磁性粒子は、可変長の dsDNA で官能化されており、ゼータ電位による粒子上での電荷が測定された。光磁気アッセイにおいて、発明者らは、粒子の表面接触が粒子の電荷とともに増大することを見いだすことができた。図5を見るとわかるように、表面接触に対応する信号振幅は、粒子に付着する荷電分子の個数に比例する。したがって、理論に束縛されることを望むことなく、表面接触の増大により、反応速度が高くなり、最終的に、アッセイの終わりに信号変化が増大する(例えば、図6を参照)。以下で詳しくさらに説明される、上記及び他の発明に基づき、発明者らは、反発力を発生させるのに適した磁性ナノ粒子の反発表面の設計手法および磁性ナノ粒子の結合確率を有利に高めるプッシング効果の概念を発展させた。この概念は、反発表面構造を備える単一の種類の磁性粒子、またはその代わりに、少なくとも2種類の磁性粒子の混合物を使用して実現される。前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第1の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子で官能化され、前記第1の結合分子は、この粒子に付着し、第2の種類は、反発表面構造で官能化される。

#### 【0008】

したがって、本発明は、第2の態様において、試料中の標的分子を検出するためのデバ

10

20

30

40

50

イスに関する。当該デバイスは試料中の標的分子の測定のための試料容器と、少なくとも2種類の磁性粒子の混合物と、センサー表面とを備える。前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第1の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子で官能化され、前記第1の結合分子は、この粒子に付着し、前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第2の種類は、前記粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで、結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体プッシングを生じる、反発表面構造によって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子は前記センサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える。

10

【0009】

本発明の好ましい一実施形態において、前記第1の結合分子は、リンカー分子を介して粒子に付着する。

【0010】

本発明の別の好ましい実施形態において、前記リンカー分子は、反発表面構造より長い。

【0011】

本発明の別の好ましい実施形態において、前記リンカー分子は、前記反発表面構造であるか、またはこれを含む。

20

【0012】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、前記反発表面構造は、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子によってさらに官能化される。

【0013】

本発明の別の好ましい実施形態において、前記プッシング効果は、表面相互作用を少なくとも1%増加させることによって決定される。

【0014】

本発明のさらに好ましい一実施形態において、上述のような反発表面構造は、荷電構造または立体コーティングである。

【0015】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、前記荷電構造は、好適な条件の下で測定された少なくとも約25mVのゼータ電位を前記磁性粒子に伝え、および/または前記立体コーティングは、前記磁性粒子の半径の少なくとも約105%の前記磁性粒子の流体力学的半径を伝える。

30

【0016】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、前記第1の結合分子は、抗体もしくはその断片、アプタマー、または相補的核酸である。

【0017】

本発明のさらに好ましい一実施形態において、荷電構造は、核酸分子、ヒドロゲル、または重合体であるか、またはこれらを含む。

40

【0018】

本発明のさらに特に好ましい一実施形態において、核酸分子は、dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖からなる群から選択される。

【0019】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、リンカー分子および/または前記反発表面構造は、デオキシリボヌクレアーゼおよび/または二本鎖核酸分子を切断することができる制限酵素によって開裂可能でない。

【0020】

本発明のさらに好ましい一実施形態において、核酸分子 - 好ましくはdsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖 - は、長さが約50~10

50

00ヌクレオチドである。

【0021】

本発明の特に好ましい一実施形態において、核酸分子 - 好ましくは dsDNA、PNA 分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖 - は、長さが約100ヌクレオチドである。

【0022】

他の態様では、本発明は、試料中の標的分子の存在または量を検出する方法に関する。当該方法は本明細書で説明されているように試料とデバイス内で粒子に付着している第1の結合分子とを接触させるステップと、試料をセンサー表面に付着することができる第2の結合分子を接触させるステップであって、第1の結合分子および/または第2の結合分子は、前記標的分子、及び任意で、センサー表面に付着している標的類似分子に特異的に結合することができ、標的分子は、標的類似分子への第1の結合分子の結合を妨げることができる、ステップと、任意で、本明細書で定義されているような反発表面構造を備える磁性粒子を加えるステップと、センサー表面に結合された粒子の個数を検出するステップであって、粒子をセンサー表面に接近させるために磁力が印加され、結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例する、ステップとを含む。

10

【0023】

本発明のさらなる一実施形態において、結合粒子の検出は、漏れ全反射 (FTIR) を介して、または表面の近くの前記結合粒子からの散乱光の測定を介して実行される。

【0024】

別の態様では、本発明は、本願明細書の上述の記載でまたは以降の記載で定義されているような、標的分子を検出するための試料中の磁性粒子の使用に関するものである。

20

【0025】

本発明の特に好ましい一実施形態において、上記のデバイス、方法、または使用の文脈において述べられているような標的分子は、心臓トロポニンI (cTnI)、NT-proBNP、または副甲状腺ホルモンである。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】FTIR検出の原理を示す図である。光源からの光はカートリッジへ入射し、カートリッジ/流体界面から反射され、検出器上で結像される。粒子がこの界面に形成されるエバネセント場内に存在している場合、反射光の強度は減少する。

30

【図2】Magnotech技術を使用するサンドイッチ免疫測定法を示す図である。パネル(1)では、標的に近接するように導かれる一次抗体でコーティングされた磁性粒子は、試料液体中に分散し、標的と結合する。パネル(2)では、上部コイルおよび底部コイルが磁性粒子をパルス状に作動させ、その結果、センサー表面に結合し、センサー表面では二次抗体が結合した標的分子に結合しうる。パネル(3)では、非結合粒子がセンサー表面から取り除かれ、結合粒子がエバネセント場を使用して検出される。

【図3】磁石がスイッチ・オンまたはオフされる磁性粒子を示している。磁石のスイッチがオンになったされた場合(左)、粒子は大きな列を形成する。その結果、十分に検出できる表面に近い粒子が少なくなる(破線で示されている領域)。磁石のスイッチがオフになったされた場合(右)、粒子はセンサー表面へ向かうように拡散し、上部粒子によって部分的に「プッシング」されうる。

40

【図4】ストレプトアビジン分子で官能化され、可変長の異なる量のビオチン官能化 dsDNA に結合された 500 nm Ademtech 粒子に対するゼータ電位の測定値を示す図である。

【図5】Magnotech FTIRアッセイ実行時のバイオセンサー・ソフトウェアのスクリーンショットである。左側に、エバネセント場の画像が示されている。異なる関心領域内で取得される信号は、右のグラフに時間の関数として表示される。矢印は、表面接触の尺度である、信号の振幅を示している。

【図6】ストレプトアビジン・タンパク質で官能化された、500 nm Ademtec

50

h 超常磁性粒子に付着した可変長のバイオチン標識 97bp dsDNA を用いて実行されるアッセイに対する FTIR 信号振幅を示す図である。1 粒子当たりの DNA 分子が多ければ多いほど、表面接触は広がる。

【図 7】FTIR アッセイの終了時の信号変化を示す図である。最初に、分子の一端にバイオチン、DNA の他端にテキサスレッド分子を保持する単一の 97bp dsDNA 断片が、ストレプトアビジン粒子に結合されていた。その後、類似の 97bp DNA 分子 - ただしテキサスレッド分子を欠いていた - が、粒子毎に指示された量まで加えられた。すべての粒子が、抗テキサスレッド抗体のプリントされたスポットを用いて FTIR アッセイで検査された。

【図 8】短 DNA 断片および長 DNA 断片の両方によって官能化されている粒子を示す図である。短 DNA 断片は、大きな電荷を帯びているが、捕捉剤を持つより長い DNA 断片の十分に自由な移動を許容するくらいには短い。

【図 9】ストレプトアビジン分子で官能化され、可変長の異なる量のバイオチン官能化 dsDNA に結合された 500nm Ademtech 粒子に対する流体力学的測定サイズ (nm) およびゼータ電位の測定値 (mV) を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、試料中の標的分子を検出するための手段および方法に関するものである。本発明は、特定の実施形態に関して説明されるけれども、この説明は、制限的な意味で解釈されるべきでない。

【0028】

本発明の例示的な実施形態を詳細に説明する前に、本発明を理解するうえで重要な定義を与える。

【0029】

本明細書および付属の請求項で使用されているように、英語原文中で冠詞「a」および「an」で示される単数形は、文脈上明らかに複数でないことを示していない限りそれぞれの複数形も含む。

【0030】

本発明の文脈において、「約」および「おおよそ」という言い回しは、当業者であれば注目する特徴の技術的效果をそのまま保証すると理解する精度の間隔を表す。この言い回しは、典型的には、 $\pm 20\%$ 、好ましくは  $\pm 15\%$ 、より好ましくは  $\pm 10\%$ 、なおいっそう好ましくは  $\pm 5\%$  の指示された数値からの偏差を示す。

【0031】

「含む、備える (英語原文の comprising)」という言い回しは制限的でないことは理解されるであろう。本発明の目的のために、「からなる (英語原文の consisting of)」という言い回しは、「から構成される (英語原文の comprising of)」の好ましい一実施形態と考えられる。これ以降、群が少なくともいくつかの数の実施形態を含むと定義された場合、これは、好ましくはこれらの実施形態のみからなる、群を包含することも意図される。

【0032】

さらに、説明および請求項中の序数「第 1 の」、「第 2 の」、「第 3 の」、または項目番号「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」など、および同様のものは、類似の要素を区別するために使用され、必ずしも順次的または時間的順序を記述するために使用されない。こうして使用される語は、適切な状況の下で交換可能であること、および本明細書で説明されている本発明の実施形態は、本明細書で説明されているか、または例示されているのとは別の順序での操作が可能であることは理解されるであろう。

【0033】

序数「第 1 の」、「第 2 の」、「第 3 の」、または項目番号「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」、「i」、「ii」などが方法、または使用、またはアッセイのステップに関係する場合、上でまたは下で述べているように出願の中で断りのない限り、

10

20

30

40

50

ステップ間に時間または時間間隔の首尾一貫性はない、つまり、ステップは同時に実行されうるか、または秒、分、もしくは時の時間間隔がステップ間にありうる。

【0034】

本発明は、異なることがあるものとして本明細書で説明されている特定の方法論、プロトコル、試薬などに限定されないことは理解されるであろう。また、本明細書で使用されている用語は、特定の実施形態のみを説明することのみを目的としており、付属の請求項でのみ制限される本発明の範囲を制限することを意図されていないことは理解されるであろう。断りのない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、当業者に通常理解される意味と同じ意味を有する。

【0035】

上で述べたように、本発明は、一態様において、試料中の標的分子を検出するためのデバイスに関するものであり、このデバイスは試料中の標的分子を測定するための試料容器と、磁性粒子と、センサー表面とを備える。前記磁性粒子は、前記標的分子に特異的に結合することができる、この粒子に付着する第1の結合分子と、前記粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで、結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じる、反発表面構造とによって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子はセンサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える。

【0036】

本発明で企図されているのは、好ましくはバイオセンサー・システムを使用して標的分子を検出するための、好適なデバイスである。試験試料または試料体積中の検体の存在および/または量を検出するためのさまざまな分析手順が当技術分野で知られている。典型的には、そのような検出システムは、注目している検体を結合するために好適な結合分子で官能化された、磁性粒子を光学的に検出することができる。検体の存在または量は、磁性粒子に結合された検体の数から結論されうる。本発明の意味の範囲内で、本明細書で説明されているようなデバイスを備えるバイオセンサー・システムは、単一の磁性粒子を検出し、磁場発生器によって発生した磁場により磁性粒子を作動させることができるものとしてよい。

【0037】

本明細書で使用されているような「磁場発生器」は、典型的には、試料室とともに磁場を発生するための本明細書で説明されているような光磁気デバイス内に1つまたは複数の磁石を備え、前記磁場は、接触表面の方へ磁性粒子を誘導するものとする。磁場は、典型的には、磁力を磁性(双極子)粒子にかけることを可能にする非ゼロの勾配を有する。このような磁場発生器、またはそのような磁場発生器を備える好適なシステムの好適な例は、当業者に知られているであろう。本発明の特定の実施形態において、磁場発生器は、Brulsら、Lab Chip、2009年、9、2504~3510頁で説明されているような磁場発生器であるか、またはRanzoniら、2011年、Nano Lett.、11、2017~2022頁で説明されているようなシステムに含まれるか、またはその一部であるものとしてよい。

【0038】

典型的には、磁性粒子は、分析手順が加速されるように磁場を印加することによって作動されうる。本発明の特定の実施形態において、磁場を使用することで非特異的結合粒子が取り除かれ、バックグラウンド信号を低減することも企図される。

【0039】

本発明で使用するのに適している光磁気システム、例えば、試料容器を備えるバイオセンサー・カートリッジ、磁性粒子を感知するためのセンサー・デバイス、検出システム、および磁場発生器を備えることができる。システムは、さらなる実施形態において、読み出しシステム、例えば、画面もしくはプリンタ、データベースもしくはコンピュータ・シ

10

20

30

40

50

ステム用のインターフェース、キャリブレーションユニット、高スループットデバイスとの直接的もしくは間接的接続機能などの1つまたは複数の追加機能ユニットを備えることができる。

#### 【0040】

さらに本発明により企図されているのは、アッセイ・フォーマットを含むカートリッジを挿入できる迅速に、また瞬時に分析するためのハンドヘルド・デバイスである。典型的には、そのようなデバイスは、電源、好ましくは充電式バッテリーの形態の電源、ディスプレイ、データベースに素早くアクセスするためのWLANなどのワイヤレス接続機能、または研究室情報システムへのアクセス機能を備える。典型的なバイオセンサー・システムは、例えば、Brulsら、Lab Chip、2009年、9、2504~3510頁に説明されている。

10

#### 【0041】

特に好ましいのは、磁性粒子の光学的検出に基づく感知デバイスである。これに限定されることなく、光源および光検出システムを備える例示的なデバイスが図1に示されている。

#### 【0042】

本明細書で使用されているような「試料」は、本明細書で定義されているような標的分子を含む、任意の試料を指す。このような試料としては、例えば、排泄物、全血、血清、血漿、涙、唾液、鼻水、痰、耳液、生殖器液、乳汁、乳、初乳、胎盤液、羊水、汗、滑液、腹水、脳脊髄液、胆汁、胃液、房水、硝子体液、胃腸液、浸出液、濾出液、胸膜液、心嚢液、精液、上気道液、腹水、免疫反応部位から回収された液、貯留採取部位から回収された液、気管支洗浄、尿、例えば、すべての好適な臓器、例えば肺、筋肉、脳、肝臓、皮膚、膵臓、胃などからの生検材料、有核細胞試料、粘膜面、髪、または皮膚に付随する液に由来する、または含む試料が挙げられる。それに加えて、環境要因から試料、例えば、水試料、食肉または家禽試料、潜在的汚染源からの試料などが使用されうる。

20

#### 【0043】

本明細書で使用されているような「標的分子」という用語は、結合分子によって結合された任意の分子を指し、例えば、生体分子、好ましくはバイオマーカー、複合体、細胞分画、または細胞などの生物学的物質であってよい。好ましくは、本発明の文脈の範囲内の標的分子は、核酸、例えば、DNA、もしくはRNA分子、またはDNAもしくはRNAオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドである。なおいっそう好ましいのは、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、タンパク質もしくはポリペプチド断片、または機能タンパク質もしくはポリペプチドドメイン、薬物分子、小分子、またはビタミンなどの標的分子である。

30

#### 【0044】

標的分子は、上で説明されているように試料から直接的に得ることができる。他の状況では、試料は、例えば、標的分子を結合パートナーからアクセスしやすくする、つまり本明細書で定義されているような親和性分子にする、部分精製を含む、例えば、標準プロトコルに基づく試料調製技術による処理を受けることができる。例えば、血液試料を遠心分離して血清から全細胞または膜を含む分画を分離することができ、糞便試料を区分けして生理学的に許容可能な緩衝液および洗剤で均質化することができ、痰試料を液化して分画することができる。さらに、存在している生命体の追加成長を防ぐために抗生物質または殺菌剤が試料に加えられうる。全細胞も取り除かれうるか、または溶解されてその内容物を放出することができる。

40

#### 【0045】

本明細書で使用されているような「試料容器」は、ガラス、透明プラスチック、または試料が測定される半導体のような好適な材料から作られた容器を指す。本明細書で説明されているような磁性粒子は、試料が導入されたときに試料容器内にすでに存在しているか、または試料と一緒に導入されるか、または試料が試料容器内に注入された後に導入されうる。試料容器は、第2の結合分子を備えるセンサー表面をさらに備えることができる。

50

好ましくは、センサー表面は、試料容器の底部に配置される。試料容器は、特定の実施形態において、交換可能カートリッジ内に、例えば、センサー・デバイスから分離しているスタンドアロン・コンポーネント内に配置されうる。試料を汚染する可能性があるため、このようなカートリッジは、好ましくは、例えば射出成形によりプラスチックから作られた、使い捨て品であってよい。さらに企図されるのは、洗浄または殺菌されうる、リサイクル可能なカートリッジまたはリサイクル可能なカートリッジ部品、例えば、カートリッジまたはカートリッジ部品である。

【0046】

本明細書で使用されているような「センサー表面」は、実際のセンサー・イベントが発生するか、または検出される領域を画成する。典型的には、センサー表面は、試料容器の底部に配置される。センサー表面は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例する、結合粒子の個数の検出に使用されうる。本発明の文脈の範囲内で使用されうるこのようなセンサー表面および対応するセンサーの例は、Brulsら、2009年、Lab Chip、9、3504～3510頁に与えられている。

10

【0047】

本明細書で使用されているような「磁性粒子」は、体積または質量などの物理的特性を帰すことができる小さな局在物体を意味する。「磁性粒子」という用語は、永久磁性粒子と磁化可能粒子の両方、例えば、超常磁性粒子を含むものとする。

【0048】

本明細書で使用されているような「超常磁性」という用語は、小さな強磁性または強磁性ナノ粒子中に現れる磁気の一形態を記述するものである。十分に小さなナノ粒子において、磁化は、温度の影響の下で方向をランダムに反転することができることが当技術分野で知られている。反転から次の反転までの時間は、ネール緩和時間と称される。外部磁場が存在しない場合、ナノ粒子の磁化を測定するために使用される時間がネール緩和時間に比べてかなり長いときに、磁化は、平均ゼロである、つまり、常磁性状態にあるように見える。このような状態では、外部磁場は、常磁性体と同様にナノ粒子を磁化することができる。しかし、磁化率は、常磁性体と比べてかなり大きい。

20

【0049】

本発明の特に好ましい実施形態では、材料、または粒子、例えば、ナノ粒子は、超常磁性粒子であってよく、これらは典型的には、水溶液中に分散され、小さな電荷、例えば、負もしくは正の電荷を保持するか、または特定のゼータ電位を有してコロイド安定性を確実にし、粒子の分離状態を保ち、非特異的クラスタリングを回避する。

30

【0050】

さらに、粒子は、本質的に、輸送および特性に関して全体として挙動する。磁性粒子は、したがって、対称的な、球形、本質的に球形もしくは球状であるか、または不規則な、非対称的形狀もしくは形態をとりうる。

【0051】

本発明によって企図される磁性粒子のサイズは、典型的には3 nmから50  $\mu$ mの範囲内である。好ましいのは、ナノメートルおよびマイクロメートルから数マイクロメートルまでの範囲内の磁性粒子である。特に好ましい実施形態では、粒子径は、100 nmを超える。本明細書で使用されているような「直径(diameter)」という用語は、粒子の中心を通過し、端点が粒子表面上にある直線分を指す。非球状または半球状粒子の場合、直径は、粒子の中心を通過し、端点が粒子表面上にある最長および最短直線分の平均直径として理解される。本明細書で定義されているような粒子の半径は、上で定義されているような直径の半分であることはさらに理解される。特に好ましいのは、磁性ナノ粒子、例えば約100 nmから10マイクロメートル、より好ましくは100 nmから3  $\mu$ m、なおいっそう好ましくは300 nmから1000 nm、例えば、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 n

40

50

m、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、620 nm、650 nm、670 nm、700 nm、720 nm、750 nm、770 nm、800 nm、820 nm、850 nm、870 nm、900 nm、920 nm、950 nm、970 nm、1000 nm、またはこれらの間の任意の値の直径の粒子である。なおいっそう好ましいのは、約500 nmの直径を有する磁性ナノ粒子である。

#### 【0052】

本発明による磁性粒子は、第1の結合分子で官能化される。本発明によって企図されているのは、本明細書で説明されているような反発表面構造をさらに備える磁性粒子でもある。

10

#### 【0053】

本明細書で使用されているような「結合分子」という用語は、第2の分子、つまり、相互作用の相手に対する高い結合親和力を有する分子を指す。本発明の意味における結合分子は、典型的には、生体分子もしくはバイオマーカーなどの本明細書で定義されているような特異的標的分子を結合することができるか、または例えば、ウイルス、細胞もしくは細胞断片、または組織に由来する材料などの分子含有標的実体を結合することができる結合もしくはキャプチャ部分を備える。

#### 【0054】

特に好ましい一実施形態において、結合分子は、アプタマー、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、特に相補的核酸および分子インプリント重合体、リガンドもしくは受容体、およびレクチンからなる群から選択され、結合分子は、好ましくは、抗体もしくはその断片、または相補的核酸である。

20

#### 【0055】

結合分子の文脈の範囲内で使用されるような「アプタマー」は、短核酸分子、例えば、RNA、DNA、PNA、CNA、HNA、LNA、もしくはANA分子または当業者に知られている他の好適な核酸フォーマットとすることができ、これは本明細書で定義されているような標的分子を、好ましくは本明細書で定義されているような核酸標的分子に結合することができる。さらに、本発明では、特異アミノ酸配列（複数可）を含むペプチド・アプタマー、つまり、タンパク質（複数可）、ポリペプチド（複数可）、またはペプチド（複数可）に特異的に結合することができるアプタマーを企図する。

30

#### 【0056】

「PNA」という用語は、ペプチド核酸、つまり、生物学研究および医療処置で使用され、天然に存在することが知られていないDNAまたはRNAに類似の人工的に合成された重合体に関係する。PNA骨格は、典型的には、ペプチド結合によって結合されたN-(2-アミノエチル)-グリシン単位の繰り返しからなる。さまざまなプリンおよびピリミジン塩基が、メチレン・カルボニル結合によって骨格に結合される。PNAは、一般的に、ペプチドのように示され、第1の（左）位置にN末端があり、右にC末端がある。DNAおよびRNAは、デオキシリボースおよびリボース糖骨格をそれぞれ有するが、PNA骨格は、ペプチド結合によって結合されたN-(2-アミノエチル)-グリシン単位の繰り返しからなる。PNAオリゴマーも、相補的DNAに結合する際により大きな特異性を示すことが当技術分野で知られている。さらなる詳細は、好適な文献ソースまたは教科書から知ることができ、例えば、Nielsen PE、Egholm M (1999年)、「An Introduction to Peptide Nucleic Acid」、Curr. Issues Mol. Biol. 1 (2): 89~104頁を参照されたい。

40

#### 【0057】

「CNA」という用語は、アミノシクロヘキシルエタン酸核酸に関係する。さらに、この用語は、シクロペンタン核酸、つまり、例えば2'-デオキシカルバグアノシンを含む核酸分子に関係する。

#### 【0058】

50

「HNA」という用語は、ヘキシトール核酸、つまり、標準核酸塩基およびリン酸化された1,5-アンヒドロヘキシトール骨格から構成されるDNA類似体に関する。

【0059】

「LNA」という用語は、ロックト核酸に関する。典型的には、ロックト核酸は、修飾された、したがってアクセス不可能なRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'および4'炭素をつなぐ特別な架橋で修飾されうる。このような架橋は、リボースを3'-endo構造立体配座中に固定する。固定されたりボース立体配座は、塩基の積み重ねおよび骨格前組織化を高める。これは、オリゴヌクレオチドの熱安定性、つまり、融解温度を著しく高めることができる。

【0060】

「ANA」という用語は、アラビノン核酸またはその誘導体に関する。本発明の文脈の範囲内の好ましいANA誘導体は、2'-デオキシ-2'-フルオロ-ベータ-D-アラビノヌクレオシド(2'-F-ANA)である。

【0061】

典型的には、ペプチド・アプタマー(複数可)は、例えば、10から20個のアミノ酸を含む、可変ペプチド・ループ(複数可)である。本発明の文脈において、ペプチド・アプタマー(複数可)は、特定の実施形態において、一端または両端で骨格構造に付着されうる。骨格構造は、良好な溶解特性を有する、分子、好ましくはタンパク質、例えば、タンパク質であってよい。当業者であれば、好適な骨格分子を知っている。本発明の文脈の範囲内の使用に適した骨格分子の一例は、細菌タンパク質チオレドキシン-Aである。アプタマー・ペプチド・ループは、好ましくは、骨格分子の還元活性部位内に挿入されうる。あるいは、タンパク質Zまたはリポカリンなどのブドウ球菌タンパク質Aおよびそのドメインおよびこれらのドメインの誘導体は、本発明の文脈の範囲内で骨格構造として使用されうる。核酸またはペプチド・アプタマーは、当業者に知られている好適な方法により、例えば、PCRまたは分子合成法または酵母ツーハイブリッド法を介して生成されうる。

【0062】

結合分子の文脈の範囲内で使用されるような「ペプチド」は、2から35のアミノ酸、アミノ酸誘導体、またはその混合物の伸長を含むか、または代替的にそれらからなるものとしてよい。ペプチドは、直鎖、分岐鎖、環状、またはその混合であってよい。ペプチド親和性分子も、上で定義されているような骨格構造に付着されうる。

【0063】

結合分子の文脈の範囲内で使用されるような「タンパク質」は、約35を超えるアミノ酸、アミノ酸誘導体、またはその混合物の伸長を含むか、または代替的にそれらからなるものとしてよい。タンパク質は、直鎖、分岐鎖、環状形態を有するか、またはこれらの形態の混合からなるものとしてよい。タンパク質結合分子も、上で定義されているような骨格構造に付着されうる。

【0064】

結合分子の文脈の範囲内で使用されているような「オリゴヌクレオチド」は、約5から120のヌクレオチドの伸長、例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100のヌクレオチドの伸長、好ましくは約15から60のヌクレオチドの伸長を含むか、または代替的にそれらからなるものとしてよい。オリゴヌクレオチド結合分子は、好ましくは、RNA分子またはDNA分子または両方の混合物であってよい。

【0065】

企図されるのは、相補的核酸分子である、結合分子である。「相補的核酸分子」という用語は、一本鎖が互いに相補的である定義済み配列の分子を指す。二本鎖核酸分子の相補鎖は、塩基対合の形成により互いに強い親和性を有することが当技術分野で知られている。さらに企図されるのは、一本鎖オリゴヌクレオチド配列であり、これらは本明細書で定義されているようなリンカー分子構造に付着されるか、または組み込まれる。特に好まし

10

20

30

40

50

い実施形態では、このような好適なリンカーも、核酸分子を含むか、またはそれからなる。一本鎖の伸長は、高親和性を有する注目している相補的ヌクレオチド配列を認識し、ハイブリッド形成することができる。このような分析において、標的分子は、結合分子に相補的であるか、またはほとんど相補的であるオリゴヌクレオチドを含む。

【0066】

本明細書で使用されているような用語「分子インプリント重合体」は、後で抽出され、相補的空洞を残す分子の存在下で形成された重合体を指す。典型的には、分子インプリント重合体は、元の分子に対して特定の化学的親和性を示す。分子インプリント重合体は、当業者に知られている好適な重合体単位から構成されうる。これを生成するための技術は、バルク、沈殿、乳化、懸濁、分散、ゲル化、および多段膨潤重合などの重合技術を含む。特に好ましいのは、階層インプリント法 (hierarchical imprinting methods) である。

10

【0067】

結合分子の文脈の範囲内で使用されているような「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、つまり、抗原を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型 (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、またはサブクラスであるものとしてよい。本発明の抗体は、認識または特異的に結合する、標的分子、例えば、本発明のポリペプチドの、エピトープ (複数可) または部分 (複数可) に関して記述されるか、または指定されうる。当業者であれば、特異的エピトープおよびそれと抗体との相互作用を知っている。本明細書で使用されているような「特異的に結合する」という言い回しは、抗原エピトープへの抗体の免疫特異的検出および結合を指す。「特異的に結合する」という言い回しは、非特異的結合を除外するが、必ずしも、他の抗原、特にこの抗体によって検出される同じ抗原エピトープを含む抗原との交差反応を除外しない。

20

【0068】

抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多特異的、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗体、一本鎖抗体でありうるか、またはFab断片、Fab'断片、Fab発現ライブラリによって生成される断片、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ジスルフィド結合Fv、低分子化抗体、二重特異性抗体、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、全免疫グロブリン分子、小モジュラー免疫薬 (SMIP)、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、V<sub>HH</sub>含有抗体、抗イディオタイプ (抗Id) 抗体、上記のどれかのうちのエピトープ結合断片 (複数可) であってよい。最も好ましくは、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体断片であり、Fab、Fab' および F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖Fvs (scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs (sdFv)、およびVLまたはVHドメインのいずれかを備える断片を含む。

30

【0069】

本発明による抗体は、鳥類および哺乳類を含む動物起源に由来するものとしてよい。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ (例えば、マウスおよびラット)、ロバ、サル、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリの抗体である。

40

【0070】

本発明による抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはこれ以上の多特異性を有するものとしてよい。多特異的抗体は、標的分子、例えば、本発明によるポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であるか、または標的分子、例えば、本発明によるポリペプチドとさらには異種ポリペプチドもしくは固相担持物質などの、異種エピトープの両方に対して特異的であるものとしてよい。好ましいのは、単一特異的抗体である。

【0071】

本明細書で使用されているような「リガンド」という用語は、生体分子などの標的分子との複合体を形成し、それにより、結合親和力の高い分子に特異的に結合しうる物質を指

50

す。特に、リガンドは、標的タンパク質上のある部位に結合することができる信号トリガー分子 (signal triggering molecule) であってよい。リガンドは、受容体と称されることが多い結合パートナーに結合することが多い。標的分子の検出で使用するための受容体 - リガンド結合システムが、当技術分野で知られている。典型的には、受容体に結合するリガンドは、化学的立体配座、つまり、受容タンパク質の三次元形状を変える。受容タンパク質の立体配座状態が、受容体の機能状態を決定する。本発明の文脈の範囲内における好適なリガンドは、例えば、酵素基質、酵素阻害薬、受容体作用薬、受容体拮抗薬、DNA結合タンパク質などの活性化因子、または神経伝達物質を含みうる。

#### 【0072】

本明細書で使用されているような「レクチン」という用語は、認識されたグリコシル・リガンドのどれかの共有構造を変えることなく複雑な複合糖質の炭水化物成分を特異的認識し、可逆結合することができるタンパク質または糖タンパク質を指す。本発明の文脈の範囲内において好適なレクチンの例は、細菌性および植物性毒素のような一価レクチンを含み、これらは細胞壁または膜内の糖成分に結合することができる。本発明の意味の範囲内で好適な他のレクチンは、マンノース結合レクチン、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合レクチン、N-アセチルグルコサミン結合レクチン、N-アセチルノイラミン酸結合レクチン、またはフコース結合レクチンである。

#### 【0073】

本明細書で使用されているような「第1の結合分子」という言い回しは、試料中の標的分子に特異的に結合することができる、本明細書で説明されているような結合分子を指す。第1の結合分子は、好適な方法によって、または当業者に知られている好適な様式で、例えば、リンカー分子および/または以下で定義されるような反発表面構造を介して、または磁性粒子表面との直接的接触によって、磁性粒子表面に付着されうる。

#### 【0074】

本明細書で使用されているような「粒子に付着される」という言い回しは、磁性粒子への第1の結合分子の共有または非共有結合またはカップリングを指す。特に、このようなカップリングは、例えば、共有結合、ファンデルワールス結合、または層間の静電結合であるものとしてよい。磁性粒子への付着は、可逆であるか、または、例えば、pH、温度、イオンの濃度を変化させること、光を照射すること、酵素分解もしくは酵素的切断などによって、終端可能であるものとしてよい。第1の結合分子は、いくつかの実施形態では、リンカー構造、例えば、本明細書で定義されているようなリンカー分子を介して粒子に付着されうる。第1の結合分子は、この目的のために、リンカー分子にカップリングされるものとしてよく、次いで、このリンカー分子が直接的にまたは間接的に粒子表面に付着される。また、第1の結合分子は、本明細書で説明されているように反発構造にカップリングされることも企図されうる。また本発明で企図されるのは、第1の結合分子が磁性粒子表面と直接接触しうることである。

#### 【0075】

本発明の特定の実施形態において、磁性粒子、または粒子表面、または平坦なセンサー表面への第1の結合分子のカップリング、結合、または付着は、直接的または間接的結合でありうる。

#### 【0076】

本明細書で使用されているような「直接的結合」という用語は、第1の結合分子が中間体、架橋もしくはコネクタ分子、または官能基が存在することなく磁性粒子への直接的なつながりを有することを意味する。

#### 【0077】

本明細書で使用されているような「間接的結合」という用語は、結合分子が、磁性粒子の表面に直接的に付着されていないが、例えば、他の結合分子、リンカー分子、または荷電構造などの、さらなる中間体、架橋、またはコネクタ分子を介して間接的に連結されることを意味する。例えば、アビジン、ストレプトアビジン誘導体、(ストレプト)アビジン、アビジン関連タンパク質、タマビジン1および2、ブラダビジン、NeutrAv

10

20

30

40

50

i d i n などのアビジン様実体は、磁性粒子とビオチンなどの適合する結合部分を含む相互作用分子との間のコネクタとして使用されうる。特定の実施形態において、磁性粒子は、アビジンまたはストレプトアビジンコネクタでコーティングされるか、または覆われうる。コネクタ分子として有用な相互作用の対のさらなる好ましい例は、ビオチン/アビジン、抗体/抗原の対、例えば、抗FITC、FITC、抗Texas Red/Texas Red、抗ジゴキシゲニン/ジゴキシゲニン、および上で述べたような核酸相補鎖である。本発明によって企図されるのは、特に、ほとんど無制限の特定の組み合わせにより多重化の程度が大きいので、核酸相補鎖の使用である。また、核酸配列からなる、または含むそのようなコネクタ分子がリンカー構造内に容易に組み込まれうることは当業者に理解されるであろう。

10

**【0078】**

本明細書で使用されているような「反発表面構造」という用語は、本明細書で説明されているような磁性粒子の表面に直接的にまたは間接的に付着されうる構造を指す。反発表面構造が磁性粒子の表面に直接的に付着されること、つまり、中間体、架橋もしくはコネクタ分子、または官能基が存在することなく磁性粒子への直接的なつながりを有することが好ましい。

**【0079】**

本発明の意味の範囲内の反発表面構造は、分子、重合体、またはおよび/または反発力を与えることができる分子のメッシュを備える。本明細書で使用されているような「反発力」という用語は、分子または粒子の反発を引き起こす、力を指す。好ましくは本発明によって企図されるのは、磁性粒子の反発である。一般に、粒子間の反発力は、排除体積反発、静電反発、エントロピー力、または重合体被覆表面の間の立体力などの粒子間力の結果とすることができる。「排除体積反発」という用語は、固体粒子間の、または該当する場合には、粒子上に存在する表面構造を備える固体粒子間の重なりを不可能性を意味する。

20

**【0080】**

粒子間の「静電反発」は、粒子が正味電荷を帯びたときに観察される。2つの粒子が同じ正味電荷、つまり、正または負のいずれかの電荷を帯びている場合、これらは反発し合う。「エントロピー的な力」という用語は、エントロピーが最大化される状態へシステムが進む傾向を記述する、熱力学の第二法則に基づく力を指す。この結果、固体球、例えば、磁性粒子間に有効反発力が生じうる。「立体反発力」という用語は、立体効果に基づく。原子レベルでは、立体効果は、分子内のそれぞれの原子が特定の大きさの空間を占有するという事実から生じることが理解されるであろう。原子が互いに近づくと、関連するエネルギーのコストは、電子雲の重なりにより高くなり（パウリまたはボルの反発力）、分子の好ましい形状または立体配位および反作用に影響を及ぼしうる。したがって、立体障害または立体効果は、個別の原子の電子雲同士の反発力と見なすことができ、原理上、原子レベルでの静電反発の結果として定義されうる。

30

**【0081】**

本明細書で使用されているような「前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える」という言い回しは、粒子の集合全体がセンサー表面の方へプッシングされることを意味する。この全体的プッシング効果は、磁性粒子の反発表面構造の静電プッシング効果、例えば、2つもしくはそれ以上の粒子の間の静電プッシング効果、または磁性粒子の反発表面構造の立体プッシング効果、例えば、2つもしくはそれ以上の粒子の間の立体プッシング効果、またはこの両方の組み合わせ、例えば、2つもしくはそれ以上の粒子の間の、磁性粒子の静電プッシング効果および立体プッシング効果に基づくか、またはこれらによって引き起こされる。全体的プッシング効果は、例えば、アッセイにおける粒子の個数、センサー表面の付近の粒子の個数、2つまたはそれ以上の粒子の総電荷、静電気対立体プッシングの割合、当業者に知られているさらなるパラメータに依存しうる。これらのパラメータは、デバイスまたは本明細書で説明されているように実施されるアッセイの実施形態の特定の必要物および要求

40

50

事項に応じて調整され、および/または修正されうる。

【0082】

本発明のさらに好ましい実施形態において、上で定義されているような全体的プッシング効果は、表面相互作用の増大を測定することによって判定される。本明細書で使用されているような「表面相互作用の増大」という言い回しは、本発明による磁性粒子の間の反発力の結果としてセンサー表面に、またはセンサー表面の近くに存在する粒子の量または個数の増大を指す。言い換えると、表面相互作用の増大は、したがって、粒子とセンサー表面との相互作用の増大を意味する。表面相互作用の増大は、粒子がセンサー表面に密接するのに費やす時間の長さを用いて測定することができる。「密接する」という言い回しは、適切な測定方法を使用して、センサー表面に十分に近づいたときに、信号を、例えば光信号を発生するように粒子が表面に近いが、または表面にあることを意味する。センサー表面の近くにある、またはセンサー表面にある磁性粒子の測定のための好適な方法は当業者に知られており、例えば、Brulsら、Lab Chip、2009年、9、2504～3510頁に説明されている。

10

【0083】

本発明の好ましい実施形態において、表面相互作用の増大は、アッセイ中に信号振幅を測定することによって判定される。これに限定されることなく、表面相互作用の増大を判定する企図された一例は、本明細書で説明されているような漏れ全反射(F T I R)を介した信号振幅の測定である。次いで、その結果得られるF T I R信号振幅は、エバネセント場内に存在する粒子の個数に対応する。

20

【0084】

表面相互作用の増大は、非官能化磁性粒子を使用して、つまり、反発表面構造なしで、測定結果から得られる信号振幅に関して本明細書で定義されているような反発表面構造で官能化された磁性粒子を使用して測定結果から得られる信号振幅から計算される。例えば、表面接触の増大が2倍になると、つまり、反発表面構造で官能化された磁性粒子を使用する信号振幅が非官能化磁性粒子の信号振幅の2倍である場合、表面相互作用の増大は100%である。

【0085】

本発明の好ましい実施形態において、粒子とセンサー表面との間の表面相互作用の増大は、少なくとも約1%であるものとしてよい。表面相互作用の増大は、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、160%、180%、200%、220%、240%、260%、280%、300%、320%、340%、360%、380%、400%、420%、440%、460%、480%、500%、または500%超であってよい。

30

【0086】

本発明の特に好ましい実施形態では、反発表面構造は、磁性粒子上に存在する荷電構造または立体コーティングであってよい。

【0087】

本明細書で使用されているような「立体コーティング」は、コーティングの形態で磁性粒子上に存在しうる、また磁性粒子間に反発力をもたらす表面構造を指す。本発明によって企図される重要な一効果は、そのような立体コーティングが存在すると、結果として、磁性粒子の相互反発力が増大し、その反発力が次いでプッシング力の形成に至り、その結果、当技術分野で説明されているような磁性粒子濃度を増大させなくても平坦なセンサーの方への磁性粒子のプッシングが生じるというものである(プッシング効果)。そのような立体コーティングの立体障害は、本明細書で説明されているような立体プッシング効果を生じることには理解されるであろう。したがって、企図される方法は、磁性粒子の表面接触が磁性粒子の反発力とともに増大し、それにより反応速度が上昇し、最終的にアッセイの終わりに信号変化が増大するという効果を有する。立体プッシング効果は、以下で説明されているように磁性粒子の流体力学的半径により測定されうることを当業者であれば理

40

50

解するであろう。

【0088】

本発明では、すなわち無関係の分子の非特異的結合を防ぐために立体コーティングまたは障壁として働きうる、または他の分子もしくは磁性粒子を特定の距離内に保持する、磁性粒子表面上の分子のメッシュを構成することによってそのような立体ブッシング効果がどのように達成されうるかを説明する。そのような立体コーティングを、例えば、分子のメッシュを含むコーティングの形態で有する磁性粒子が、特定の立体反発力を加えることができることを当業者であれば理解するであろう。

【0089】

磁性粒子上のコーティングは、分子のネットワークまたはメッシュを形成するようなコーティングであるものとしてよい。したがって、本発明によるコーティングの層は、小さな単位または実体からなるものとしてよく、これらは同一のもしくは類似の化学的、物理的、および/または生物学的特性を有する。好ましくは、本明細書で説明されているようなコーティングの層は、特定の長さの重合体を形成することができる生物学的または化学的分子を含みうる。好適な重合体は、例えば、炭水化物類、脂質類、ポリエチレン・グリコール、多糖類、デンドリマー、デンドロン、ナノチューブ、またはこれらの混合物である。好ましくは、これらの重合体は、リンカーまたはスペーサー分子内に置かれる。本発明の特定の実施形態において、コーティングは、単一の表面層または多層シェル構造からなるものとしてよい。

10

【0090】

本明細書で使用されているような「スペーサー分子」という用語は、もっぱらスペーサーの機能を有する、分子を指す。この目的のために、これらの重合体分子は、特定の長さおよび強度を有し、これにより、重合体繊維のように働くことができる。

20

【0091】

本発明の特定の実施形態において、スペーサー分子は、約500nmまでの長さ、例えば約450、400、350、300、250nm、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10nmまでの長さを有することができる。

【0092】

本発明のさらなる特定の実施形態において、スペーサー分子は、直鎖、環状、または分岐鎖様分子、またはその混合物であってよい。分岐鎖である場合、これらは、異なる程度で分岐しているものとしてよく、例えば、2、3、4、4以上の階層レベルを示す。本発明では、さらに、ネットワーク、層、またはシェル構造内のスペーサー分子の異なる種類、例えば、直鎖と分岐鎖、異なる分岐度、異なるスペーサー長などの組み合わせを企図している。本発明の代替的实施形態において、スペーサー分子またはスペーサー分子の混合物は、均一なメッシュまたはネットワーク、つまり、本質的に同じサイズの開口部を持つ等間隔のメッシュまたはネットワークを形成する。また、メッシュは開口部を備えることも企図される。これは、メッシュがそのように均一である場合に特に好ましく、したがって、分子の接近性および分子の運動自由度に関するメッシュの機能特性は均一である。これらのパラメータは、スペーサー分子の長さ、分岐度などによって調整されうる。

30

40

【0093】

本発明のさらなる特定の実施形態において、スペーサー分子は、分子の三次元メッシュを形成するように直接的にまたは間接的に相互連結されうる。そのような相互連結は、分子の末端の官能基に基づくか、または例えば、分岐が企図されている場合に、分子の中心に配置されうる。相互連結、その程度などの制御は、例えば、「Bioconjugate techniques」、Hermanson、2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press、Elsevierまたは「Dendrimers and other dendritic polymers」Frechet and Tomalia、J. Wileyなどの公認教科書からの、当業者に知られている原理および方法に従って実装されうる。

50

## 【 0 0 9 4 】

本発明の文脈の範囲内の好適なスペーサー分子は、例えば、炭水化物類、脂質類、ポリエチレン・グリコール（PEG）、多糖類、 dendrimer、 dendron、もしくは本明細書で定義されているようなナノチューブ、またはこれらの好適な誘導体もしくは組み合わせとすることができる。スペーサー分子の群は、炭化水素ベースの界面活性剤、コレステロール、糖脂質類、胆汁酸、サポニン、脂肪酸、合成両親媒性ブロック共重合体、卵黄リン脂質のような天然産物をさらに含む。

## 【 0 0 9 5 】

立体コーティングに適したスペーサー分子の好ましい一例は、ポリエチレン・グリコール（PEG）分子である。ポリエチレン・グリコール分子は、表面上に分子の高密度大面積のメッシュを形成することができる。また、PEG分子は相互連結されて、上で説明されているように好適な立体コーティングを形成することができることも当業者であれば理解するであろう。PEG分子の相互連結に適した分子は、本明細書で説明されているようなコネクタ分子である。長さは、結果として得られるコーティング層の企図された全体的な厚さ、リンカー分子の企図された長さ、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性、および/または磁性粒子1個当たりの構造分子の企図された個数に依存するようになされう。

10

## 【 0 0 9 6 】

また本発明によって企図されるのは、磁性粒子上に付着したポリエチレン・グリコール分子の個数である。磁性粒子に付着する分子が多ければ多いほどコーティング層の密度が高く、厚さが大きくなり、立体効果を通じて粒子間の反発を引き起こすことは理解される。したがって、磁性粒子の立体反発力は、コーティング層の厚さに依存し、これは磁性粒子上のPEG分子の個数、PEG分子の長さ、およびPEG分子間の結合数に依存する。粒子1個当たりの分子の個数は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは少なくとも約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは少なくとも約300、350、400、または450、最も好ましくは少なくとも約500、または1000であってよい。

20

## 【 0 0 9 7 】

本発明のさらなる実施形態において、磁性粒子に付着された上で定義されているようなポリエチレン・グリコール分子の個数は可変であるものとしてよい。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりのポリエチレン・グリコール分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは約300、350、400、または450、最も好ましくは約500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000に設定されう。さらなる実施形態において、磁性粒子1個当たりのポリエチレン・グリコール分子の個数は、約1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、150000、またはそれ以上に設定されう。磁性粒子1個当たりのポリエチレン・グリコール分子の個数は、磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、ポリエチレン・グリコール分子の分子的同一性、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようになされう。

30

40

## 【 0 0 9 8 】

50

さらなる実施形態において、ポリエチレン・グリコール分子による磁性粒子の表面被覆率は、磁性粒子の表面全体の約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%またはこれらの値の間の任意の値とすることができる。

#### 【0099】

さらなる好ましい実施形態では、本明細書で定義されているような立体コーティングは、本明細書で定義されているような磁性粒子の半径の少なくとも約105%の本発明による磁性粒子の流体力学的半径を伝える。本明細書で使用されているような「磁性粒子の流体力学的半径」という言い回しは、溶液中に立体コーティングを含む水和粒子の有効半径、または溶液中に立体コーティングを含む粒子の見かけのサイズを指す。好ましくは、立体コーティングは、本明細書で説明されているような立体効果に寄与する多数の、例えばすべての、分子を指す。本明細書で定義されているような立体コーティングを含む粒子の流体力学的半径は、本明細書で定義されているような磁性粒子の半径、特にそのような立体コーティングを含まない磁性粒子の半径の少なくとも約105%であってよい。本明細書で定義されているような立体コーティングを含む粒子の流体力学的半径は、例えば、本明細書で定義されているような磁性粒子の半径、特にそのような立体コーティングを含まない磁性粒子の半径の約105%、110%、120%、125%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、またはこれらの値の間の任意の値、またはそれ以上であってよい。

10

20

#### 【0100】

本発明の他の特に好ましい実施形態において、磁性粒子は荷電構造を備え、これにより、粒子間に反発力を発生させることができる。本明細書で使用されているような「荷電構造」という用語は、本発明による磁性粒子の正味電荷に寄与する、実体を指す。本発明による荷電構造は、正または負のいずれかである正味電荷を有することができる。荷電構造は、特定の種類または形態の分子に限定されないことは理解される。荷電構造は、例えば、1種類の分子の重合体もしくは異なる2種類以上の分子、異なる分子もしくは実体の複合体、または異なる電荷、例えば、異なる正電荷、異なる負電荷、もしくは(異なる)正と負の電荷を有し、その結果総正味電荷が正もしくは負になるいくつかの分子を含む化合物を含みうる。電荷計算のためのツールおよび方法は、例えば、Dewar, M. J. S., 「The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry」、McGraw-Hill, and Inc., 1969年、またはStewart, R., 「The Proton: Application to Organic Chemistry」、Academic Press, Inc., 1985年、72頁から、業者に知られている。

30

#### 【0101】

本発明の特定の実施形態において、荷電構造は磁性粒子に直接的または間接的に付着され、その結果、磁性粒子に特異的正味電荷が生じうる。特異的正味電荷は正または負のいずれかであってよい。また、異なる荷電構造が同じ磁性粒子上に付着され、その結果、荷電構造の混合が生じることも企図されうる。本発明の文脈の範囲内において、荷電構造は磁性粒子の表面を覆い、これにより、特異的正味電荷を有する全体的な荷電分子を形成することができる。ナノ粒子の正味電荷は、例えば、ゼータ電位の測定を介して判定できることは当業者に知られている。

40

#### 【0102】

企図される一利点は、磁性粒子上に高められた電荷が存在することにより反発力が増大し、それにより静電反発力が増大し、磁性粒子の非特異的凝集が最小限度に抑えられる点である。非特異的凝集が減少することで、界面活性剤を使わずにバックグラウンドレベルを下げやすくなり、したがって、本明細書で説明されているような光磁気検出アッセイにおけるブランクレベルが改善され、これにより検出の制限が改善される。本発明によって企図される別の重要な効果は、負または正のいずれかの電荷である、磁性粒子上の増大し

50

た電荷が存在すると、結果として、磁性粒子の相互静電反発力が増大し、その反発力が次いで静電気「プッシング」力の形成に至り、その結果、当技術分野で説明されているような磁性粒子濃度を増大させなくても平坦なセンサーの方への磁性粒子のプッシングが生じるというものである。企図される方法は、磁性粒子の表面接触が磁性粒子の電荷とともに増大し、それにより反応速度が上昇し、最終的にアッセイの終わりに信号変化が増大するという効果を有する。

【0103】

さらなる好ましい実施形態において、磁性粒子上の電荷の存在が増えることは、荷電構造を備えるか、もしくは荷電構造からなる本明細書で説明されているようなリンカー分子を供給するか、またはリンカー分子に加えて磁性粒子に付着されている荷電構造を供給することによって達成されうる。

10

【0104】

本発明の特定の実施形態において、荷電構造は磁性粒子の表面全体を覆い、これにより、特異的正味電荷を有する全体的な荷電分子を形成することができる。代替的实施形態では、荷電構造は、磁性粒子の一部のみ、領域、またはセクタ、例えば磁性粒子の表面全体の10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%以下またはこれらの値の間の任意の割合の部分被覆することができる。

20

【0105】

本発明のさらなる実施形態において、磁性粒子に付着された荷電構造分子の個数は、例えば、磁性粒子の企図された総正味電荷に応じて可変である。磁性粒子の総正味電荷は変化し、例えば、磁性粒子に付着される荷電分子の個数に応じて増減することは理解される。ゼータ電位(mV)は、分子の長さの増加とともにしかるべく増大しうる(負に)。

【0106】

したがって、磁性粒子上に存在する電荷の総和は総正味電荷に寄与することも企図されうる。磁性粒子の総正味電荷は、就中、磁性粒子上に存在する分子の個数および分子の長さ、その正または負の電荷などの関数であることもさらに理解される。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、150000、またはそれ以上に設定されうる。磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の個数は、異なるか、または磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、荷電構造分子の分子学的もしくは化学的同一性、企図された使用、例えば、アッセイ、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようになされうる。

30

40

【0107】

本明細書で説明されているようなこの静電プッシング効果を得るために適している荷電構造は、核酸、リボ核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質、炭水化物、脂質、または多糖、またはこれらの好適な誘導体もしくは組み合わせなどの特異的正味電荷に寄与することができる生物学的または化学的構造または化合物を備えることができる。さらに企図されるのは、ヒドロゲル、および重合体荷電構造である。好ましいのは、核酸ベ

50

ースの荷電構造分子の使用である。

【0108】

「核酸ベースの荷電構造分子」は、核酸分子、またはその誘導体もしくは類似体であってよい。このような荷電構造分子は、例えば、一本鎖および/または二本鎖DNAもしくはRNA分子、または任意の種類のものを含む。このような荷電構造分子は、上で定義されているようなPNA、CNA、HNA、LNA、もしくはANA分子、またはこれらの混合物もしくは組み合わせ、例えば、DNA、RNA、PNA、CNA、HNA、LNA、およびANAのうちのどれか1つまたはLNAヌクレオチドとDNAもしくはRNA塩基との混合物の組み合わせ、または本明細書で定義されているような他の荷電構造分子との混合物または組み合わせをさらに含むか、またはこれらからなるものとしてよい。核酸ベースの荷電構造の文脈の範囲内で、核酸またはその類似体はそれに加えて電荷を帯びた化学基または単位を備えることができる。例えば、リン酸基、荷電した窒素誘導体または荷電した硫黄誘導体が含まれるか、または加えられる。さらに、電荷は、少なくとも1つの分子が電荷を備える二本鎖分子、例えば、二本鎖を備えるDNAを供給することによって蓄積されうる。

10

【0109】

本発明の特に好ましい実施形態では、磁性粒子は、荷電構造、変化する長さを有することができる、例えば、一本鎖または二本鎖核酸、特にdsDNAで官能化されうる。磁性粒子上の電荷は、ゼータ電位を使ってしかるべく測定されうる。本発明によって企図されるのは、磁性粒子の表面接触が磁性粒子の電荷とともに増大し、それにより反応速度が上昇し、最終的にアッセイの終わりに信号変化が増大することである。本発明のいくつかの実施形態において、核酸などの荷電構造は、二本鎖形態または二本鎖体で存在しうる、つまり、1つの鎖と、鎖の間の塩基対合によって関連付けられる核酸分子の相補的もしくは逆平行逆鎖、または核酸分子のセンスもしくはアンチセンス鎖を備えるものとしてよい。あるいは、荷電構造は、一本鎖核酸または一本鎖リボ核酸分子を含む。

20

【0110】

本発明の特に好ましい一実施形態において、荷電構造は、二本鎖またはdsDNA、二本鎖またはdsRNA、PNA、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖からなる群から選択された分子を含む。本発明のさらなる好ましい実施形態によってさらに企図される、有利な一態様は、PNAおよびPNA/DNAまたはPNA/DNA二本鎖が酵素分解に対する耐性を付けるヌクレアーゼまたはプロテアーゼのいずれかによって容易に認識されないことである。

30

【0111】

本発明のさらなる実施形態において、好適な核酸ベースの荷電構造分子は、異なる塩基組成および/または長さの一本鎖DNA分子も備えるか、またはそれらの分子からなるものとしてよい。一本鎖分子は、例えば、塩基配列の繰り返しを包含するか、または完全にランダムであるか、または天然に由来するか、または1つの塩基のみであるものとしてよい。

【0112】

上で定義されているような核酸ベースの荷電構造分子またはそれらの組み合わせは、異なる塩基組成および/または長さの分子でありうる。分子の長さは、約5ヌクレオチドから約5000ヌクレオチドまでの範囲内、好ましくは約50ヌクレオチドから約3000ヌクレオチドまでの範囲内、なおいっそう好ましくは約100ヌクレオチドから約2000ヌクレオチドまでの範囲内、最も好ましくは約400ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドまでの範囲内とすることができる。さらに企図されるのは、他の長さまたは指示された範囲内の任意の長さの値である。分子は、例えば、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000ヌクレオチド以上の長さ、または述べた値の

40

50

間に含まれるヌクレオチドの数の長さを有することができる。

【0113】

核酸ベースの荷電構造分子の長さは、企図された全体的な特異的正味電荷、リンカー分子の企図された長さ、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、または安定性、および/または磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の企図された個数に依存するようになされうる。正味電荷の計算に適した方法は、当業者に知られるものであるか、または好適な文献ソースから得られる。

【0114】

本発明のさらなる実施形態において、磁性粒子に付着された上で定義されているような核酸ベースの荷電構造分子の個数は、例えば、磁性粒子の企図された総正味電荷に応じて可変である。磁性粒子の総正味電荷は変化し、例えば、磁性粒子に付着される核酸ベースの荷電構造分子の個数に応じて増減することは理解される。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりの核酸ベースの荷電構造分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは約300、350、400、または450、最も好ましくは約500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000に設定されうる。さらなる実施形態において、磁性粒子1個当たりの核酸ベースの荷電構造分子の個数は、約1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、または150000に設定されうる。磁性粒子1個当たりの核酸ベースの荷電構造分子の個数は、磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、核酸ベースの荷電構造分子の分子的同一性、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようにさらになされうる。さらなる実施形態において、核酸ベースの荷電構造分子による磁性粒子の表面被覆率は、磁性粒子の表面全体の約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%またはこれらの値の間の任意の値とすることができる。

【0115】

ペプチド分子、ポリペプチド分子、またはタンパク質分子、例えば、上で定義されているようなものも、アミノ酸内の荷電実体の存在により好適な荷電構造であるか、または含みうる。アミノ酸に見られるアミンおよびカルボン酸官能基は、これらの分子に両親媒性を付与することができることは当技術分野において説明されている。カルボン酸基(-CO<sub>2</sub>H)は脱プロトン化されて、負電荷を持つカルボキシラート(-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>)になり、アミノ基(NH<sub>2</sub>-)はプロトン化されて、正電荷を持つアンモニウム基(+NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)となるものとしてよい。当業者は、カルボン酸基のpK<sub>a</sub>より大きいpH値では、負電荷を持つカルボキシラート・イオンが優勢であることも知っている。アンモニウム基のpK<sub>a</sub>より低いpH値では、窒素は正電荷を持つアンモニウム基として優勢にプロトン化される。当業者は、アミノ酸の正味電荷がpHおよびpK<sub>a</sub>値に依存するという事実さらに気づいている。アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の正味電荷を計算するためのツールおよび方法は、当業者に知られているか、またはUniProt Knowledgebase (Swiss-ProtまたはTrEMBL) エントリのリストについて、またはユーザー入力配列について理論的pI (等電点) とMw (分子

10

20

30

40

50

量)を計算することを可能にするCompute pI/Mwツールなどの公認された参考文献から導かれうる(Gasteiger E.ら、Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server、(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005年))。

【0116】

このようなペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質荷電構造は、異なるアミノ酸組成および/または長さのものであってよい。長さは、企図された全体的な特異的正味電荷、リンカー分子の企図された長さ、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、または安定性、および/または磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の企図された個数に依存するようになされうる。磁性粒子の総正味電荷は、磁性粒子上のタンパク質またはペプチド分子の個数および分子の長さの関数であることは理解される。

10

【0117】

本発明のさらなる実施形態において、磁性粒子に付着された上で定義されているような荷電ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子の個数は、例えば、磁性粒子の企図された総正味電荷に応じて可変である。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは約300、350、400、または450、最も好ましくは約500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000に設定されうる。さらなる実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子の個数は、約1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、150000、またはそれ以上に設定されうる。磁性粒子1個当たりの荷電ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子の個数は、磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、荷電ポリペプチドもしくはタンパク質分子の分子的同一性、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようになされうる。さらなる実施形態において、荷電ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子による磁性粒子の表面被覆率は、磁性粒子の表面全体の約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%またはこれらの値の間の任意の値とすることができる。

20

30

40

【0118】

荷電構造は、さらなる実施形態において、磁性粒子上の総正味電荷に寄与することができる荷電実体を含む、炭水化物分子、例えば、上で定義されているようなものであるか、または備えることもできる。このような炭水化物類は、異なる組成および/または長さのものであってよい。長さは、企図された全体的な特異的正味電荷、リンカー分子の企図された長さ、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、または安定性、および/または磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の企図された個数に依存するようになされうる。

【0119】

本発明のさらなる実施形態において、粒子に付着された上で定義されているような荷電

50

炭水化物分子の個数は、例えば、磁性粒子の企図された総正味電荷に応じて可変である。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電炭水化物分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは約300、350、400、または450、最も好ましくは約500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000に設定されうる。さらなる実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電炭水化物分子の個数は、約1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、150000、またはそれ以上に設定されうる。磁性粒子1個当たりの荷電炭水化物分子の個数は、磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、荷電炭水化物分子の分子的同一性、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようにさらになされうる。さらなる実施形態において、荷電炭水化物分子による磁性粒子の表面被覆率は、磁性粒子の表面全体の約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%またはこれらの値の間の任意の値とすることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0120】

好適な荷電構造は、さらに、磁性粒子上の総正味電荷に寄与することができる荷電実体を含む、脂質分子、例えば、上で定義されているようなものであってもよい。脂質類、特にリン脂質類の電荷は、典型的には、頭部基の電荷によって決定される。脂質分子の正味電荷を付与することができる好適な頭部基の好ましい例は、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジル・エタノールアミン(PE)、およびホスファチジルグリセロール(PG)、またはこれらの組み合わせからなる群から選択された頭部基である。

#### 【0121】

このような脂質類は、異なる組成および/または長さのものであってもよい。長さは、企図された全体的な特異的正味電荷、リンカー分子の企図された長さ、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、または安定性、および/または磁性粒子1個当たりの荷電構造分子の企図された個数に依存するようになされうる。

#### 【0122】

本発明のさらなる実施形態において、磁性粒子に付着された上で定義されているような荷電脂質分子の個数は、例えば、磁性粒子の企図された総正味電荷に応じて可変である。特定の実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電脂質分子の個数は、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90、より好ましくは約100、150、200、250、なおいっそう好ましくは約300、350、400、または450、最も好ましくは約500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000に設定されうる。さらなる実施形態において、磁性粒子1個当たりの荷電脂質分子の個数は、約1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700

0、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000、100000、110000、120000、150000、またはそれ以上に設定されうる。磁性粒子1個当たりの荷電脂質分子の個数は、磁性粒子のサイズもしくは直径、付着が可能であるか、もしくは適している面積、磁性粒子のサイズもしくは直径と磁性粒子の長さとの比、荷電脂質分子の分子的同一性、または当業者に知られている他の好適なパラメータに依存するようにさらになされうる。さらなる実施形態において、荷電脂質分子による磁性粒子の表面被覆率は、磁性粒子の表面全体の約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%またはこれらの値の間の任意の値とすることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0123】

荷電構造を備える「ヒドロゲル」は、水が分散媒であるコロイド状ゲルとしてときには見つかる親水性の重合体鎖の三次元のネットワークを指す。典型的には、ヒドロゲルは、高吸収性を有する、つまり、99.9%を超える水、天然または合成重合体を含有することができ、またネットワーク構造の保存性により多量の水を保持することができる。ヒドロゲルは、著しい水分があるため、自然組織に非常によく似た柔軟度も持つことができる。水分含有量が高い結果、ヒドロゲルは、一般的に、生体適合性材料と考えられ、生物医学的応用および医薬品応用に関して特に関心を持たれている。ヒドロゲルの共通の構成要素は、例えば、ポリビニル・アルコール、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリレート重合体、および親水基を豊富に有するアクリレート共重合体を含みうる。さらに企図されるのは、アガロース、メチルセルロース、ヒアルロン、および他の天然由来の重合体を含む材料などの天然ヒドロゲル材料である。ヒドロゲルは、それに加えて、磁性粒子表面の荷電コーティングとして使用されうる、荷電重合体または他の荷電分子または部分などの荷電要素を備えるか、含むか、またはそれらの要素からなることがさらに好ましい。均質なヒドロゲル構造は、有利には、磁性粒子の静電反発をもたらず磁性粒子の総正味電荷に寄与しうる。特定の実施形態において、リンカー分子およびコーティングまたは表面構造の他の構成要素は、水溶性ヒドロゲル骨格系内に埋め込むことができ、これは分子の確実な安定性をさらにもたらしうる。当業者であれば、総正味電荷を持つヒドロゲルを得るために好適な荷電重合体を選択する仕方を知っている。それに加えて、好適なヒドロゲルを生成し、これらを磁性粒子表面に付着させるための手段および方法も当技術分野で知られている。上で説明されているようなヒドロゲルは、本明細書で説明されているような荷電高分子も含みうる。

#### 【0124】

荷電構造は、さらなる実施形態において、「荷電高分子」であってもよい。本明細書で使用されているような「荷電高分子」または「荷電重合体」という用語は、負電荷または正電荷を持つ繰り返し単位から選択された複数の繰り返し単位を含む重合体または共重合体を指す。このような重合体または共重合体は、したがって、高分子電解質として働く。電荷は、繰り返し単位内の負電荷または正電荷を持つ基に由来しうることは理解される。特に好ましいのは、第四級アンモニウム基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基、第四級ホスホニウム基、第三級ホスホニウム基、アミド基、ヘテロ芳香族窒素基、およびスルホニウム基からなる群から選択された正電荷を持つ基である。

#### 【0125】

その結果得られる正電荷を持つ重合体は、カチオン性重合体とも称される。荷電高分子の正電荷は、有利には、コイル状重合体の形成を妨げることができる。これにより、伸長状態における粘度への寄与が高まりうるが、それは伸長重合体により多くの空間を占めるからである。

#### 【0126】

好ましい負電荷を持つ重合体として、限定はしないが、硫酸エステル基、カルボン酸エステル基、リン酸エステル基、スルホン基、スルフィド基、ジスルフィド基、オルト・エステル基、無水物基、および ケトスルホン基、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0127】

高分子電解質は、高分子電解質多層（PEM）として知られている新しい種類の材料の形成で利用されている。これらの薄膜は、逐次（LbL）蒸着法を使用して製作される。LbL蒸着を行うときに、好適な増殖基質（通常は荷電している）は、正電荷および負電荷を持つ高分子電解質溶液の希釈槽の間で行きつ戻りつして浸漬される。それぞれの浸漬において、少量の高分子電解質が吸着され、表面電荷が反転され、これにより、多価陽イオン・多価陰イオン層の静電気架橋膜を徐々に、制御しながら形成することができる。このような高分子電解質多層は、正または負の総正味電荷を本発明の磁性粒子に与えるのに適していることが理解される。

10

#### 【0128】

さらなる好ましい一実施形態では、本明細書で定義されているような荷電構造は、ゼータ電位を好適な条件の下で測定された少なくとも約25 mVの本発明による磁性粒子に伝える。当業者は、粒子の絶対正味電荷が、ゼータ電位の測定を介して判定されうることを知っている。本明細書で使用されているような「絶対正味電荷」という用語は、正符号または負符号を示すことなく粒子の正味または総電荷を指す。本明細書で使用されているように、「ゼータ電位」または「電位」は、コロイド系における運動電位の尺度である。ゼータ電位は、滑り面の位置と界面から離れるバルク流体における一地点とにおける界面二重層（DL）内の電位として表すことができる。言い換えると、ゼータ電位は、分散媒と分散粒子に付着された流体の静止層との間の電位差である。ゼータ電位は、分散液中の隣接する類似する電荷を持つ粒子の間の反発の程度を示す。ナノ粒子、例えば、磁性ナノ粒子のゼータ電位を判定するのに適した手段および方法は、当業者に知られるものであるか、または好適な文献ソースから得られる。ゼータ電位は、直接的に測定可能なものではないが、理論モデルと実験により決定された電気泳動移動度または動的電気泳動移動度を使用して計算されうる。「好適な条件の下で測定」という言い回しは、ゼータ電位が分散媒に関して測定されることを意味する。測定は、分散媒の特定の条件の下で実施されることは理解されるであろう。本発明の特定の実施形態において、ゼータ電位は、特定の緩衝液濃度で判定される。当業者は、磁性粒子の分散およびゼータ電位の測定に適した緩衝液を知っている。本発明の特定の好ましい実施形態では、ゼータ電位は、1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、もしくは50 mM、またはこれらの間の任意の値の濃度を有するリン酸緩衝液を使用して測定される。ゼータ電位は、好ましくは、10 mMのリン酸緩衝液の濃度で判定されうる。さらなる特定の実施形態において、ゼータ電位は、特定のpHを有する媒体中で判定される。好ましくは、媒体のpH値は、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、または8.5である。ゼータ電位は、pH 7.4で判定されることが特に好ましい。特定の好ましい一実施形態において、データ電位は、好ましくは、特定の条件で、例えば、特定の緩衝液濃度および特定のpHで判定されうる。ゼータ電位は、10 mMのリン酸緩衝液の濃度、およびpH 7.4で判定されることが最も好ましい。

20

30

40

#### 【0129】

したがって、荷電構造は、約+25 mVまたは-25 mVのゼータ電位を伝えることができる。この文脈における「荷電構造」という用語は、本明細書で定義されているように、1つの粒子上の、1つの荷電構造、または好ましくは多数の荷電構造、例えば、すべての荷電構造を指す。

#### 【0130】

特定の実施形態において、本明細書で定義されているような荷電構造を備える粒子のゼータ電位は、約25 mV、30 mV、35 mV、40 mV、45 mV、50 mV、60 m

50

V、70 mV、80 mV、90 mV、100 mV、またはこれらの間の値、または100 mVを超える値とすることができる。

【0131】

本発明のさらなる実施形態において、1つの粒子上の、本明細書で定義されているような荷電構造、特に多数の荷電構造、例えば、すべての荷電構造は、前記荷電構造なしの粒子のゼータ電位と比較して少なくとも1 mVの前記粒子のゼータ電位の増大を伝えることができる。前記荷電構造なしの粒子のゼータ電位と比較した前記粒子のゼータ電位の増大は、例えば、約1 mV、2 mV、3 mV、4 mV、5 mV、6 mV、7 mV、8 mV、9 mV、10 mV、15 mV、20 mV、25 mV、30 mV、35 mV、40 mV、50 mV、またはこれらの値の間の値、または50 mVを超える値とすることができる。

10

【0132】

本発明のさらに別の実施形態において、1つの粒子上の、本明細書で定義されているような荷電構造、特に多数の荷電構造、例えば、すべての荷電構造は、前記荷電構造なしの粒子のゼータ電位と比較して少なくとも5%の粒子のゼータ電位の増大を伝えることができる。前記荷電構造なしの粒子のゼータ電位と比較した前記粒子のゼータ電位の増大は、例えば、約5%、7%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、70%、80%、100%、もしくはこれらの値の間の値、または100%を超える値とすることができる。

【0133】

本明細書で使用されているような「第2の結合分子」という言い回しは、本明細書で説明されているようなセンサー表面に直接的にまたは間接的に付着されている結合分子を指す。第2の結合分子は、第1の結合分子と同じ種類の分子であるか、または異なる分子であってもよい。本発明の好ましい実施形態において、第1および第2の結合分子は同じ分子である。本発明の特定の実施形態において、第2の結合分子は、抗体もしくはその断片、好ましくは上で定義されているような抗体である。本発明の特定の好ましい実施形態では、第2の結合タンパク質は試料中の標的分子を特異的に認識して結合することができるが、ただし、第1の結合分子によって認識されるのと異なる、標的分子の結合部位またはエピトープのところで結合することができる。さらなる好ましい一実施形態では、第2の結合分子は、第2の抗体、例えば、上で定義されているような抗体であってもよく、これは第1の結合分子、例えば、上で定義されているような抗体であってもよい第1の抗体を認識する。

20

30

【0134】

本発明の好ましい一実施形態において、第1の結合分子は、リンカー分子を介して磁性粒子に付着する。

【0135】

さらなる好ましい実施形態において、第2の結合分子は、本明細書で説明されているようなリンカー分子を介してセンサー表面に付着されうる。

【0136】

本明細書で説明されているような「リンカー分子」という用語は、表面への第1の結合分子の付着をもたらすのに適した任意の構造を指すものとしてよい。当業者であれば、リンカー分子を磁性粒子表面にカップリングするための手段および方法に気づくことであろう。この目的のために、磁性粒子および/またはリンカー分子の表面は、リンカーを表面にカップリングすることができる固定部分を備えることができる。

40

【0137】

この目的のために、表面および/またはリンカー分子は、リンカーを表面にカップリングすることができる固定部分を備えることができる。本明細書で使用されているような「固定部分」は、リンカー分子または1つまたは複数の反発構造表面分子と表面との間のコネクタとして理解されるべきである。したがって、特に関連するのは、上で説明されているような架橋またはコネクタ分子である。例えば、アビジン、ストレプトアビジン誘導体、(ストレプト)アビジン、アビジン関連タンパク質、タマビジン1および2、ブラダビ

50

ジン、NeutrAvidinなどのアビジン様実体は、リンカー分子と本明細書で説明されているような表面または表面構造とを固定するために使用されうる。例えば、固定部分は、ビオチンを含むことができ、表面は、ストレプトアビジンでコーティングされるか、または官能化される。表面をストレプトアビジンでコーティングするための手段および方法は、当業者に知られているか、または公認された教科書または文献ソースから得られる。

【0138】

固定するためのコネクタ分子として適している相互作用の対のさらなる好ましい例は、ビオチン/アビジン、抗体/抗原の対、例えば、抗FITC、FITC、抗Texas Red/Texas Red、抗ジゴキシゲニン/ジゴキシゲニン、上で述べたような核酸相補鎖である。固定部分は、ほとんど無制限の特定の組み合わせにより多重化の程度が大きいので、核酸相補鎖も含むことができる。また、核酸配列からなるそのようなコネクタ分子がリンカー構造内に容易に組み込まれうることは当業者に理解されるであろう。

10

【0139】

また、本発明によって企図されるのは、表面または表面に結合された分子へのカップリングの化学的作用によって共有結合（架橋）されうる、化学基を含むか、またはそれからなる固定部分である。架橋は、バイオ共役と称されることの多いに共有結合により2つまたはそれ以上の分子を化学的に結び付けるプロセスである。典型的には、架橋試薬（または架橋剤）は、タンパク質官能基、例えば、第一級アミン（ $-NH_2$ ）、カルボキシル（ $-COOH$ ）、スルフヒドリル、もしくはカルボニル（ $-CHO$ ）などの、タンパク質もしくは他の分子上の特異的官能基、またはカルボジイミド（例えば、EDC）、NHSエステル、イミドエステル、PFPEエステル、ヒドロキシメチル・ホスフィン、マレイミド、ハロアセチル（臭素またはヨウ素）、ピリジルジスルフィド、ビニル・スルホン、ヒドラジド、ジアザリン、アリール・アジド、またはイソシアネートなどの架橋剤反応基に付着することができるか、または化学的に付着する2つまたはそれ以上の反応性末端を含む分子である。

20

【0140】

また本発明で企図されているのは、リンカー分子がスペーサー分子として働くために、つまり、結合分子と磁性粒子表面との特定の距離を与えるために特定の長さを有することである。このような距離を定めることで、以下のいくつかの他の利点が得られることは理解される。

30

【0141】

最初に、特定の距離をとることで、結果として、磁性粒子と他の分子との非特異的結合および磁性粒子同士の非特異的結合を減らすことができる。さらに、通常出現する磁性粒子の非特異的クラスタリングが最小限度に抑えられうる。

【0142】

結合分子と磁性粒子表面との間の末端間距離が大きいという第2の技術的利点は、本明細書で説明されているように大きな磁性粒子をセンサー表面などの表面に結合する確率が、標的を特定の長さを有する磁性粒子リンカー分子に付着させることによって著しく高まりうることである。

40

【0143】

本発明の好ましい実施形態において、より効果的な結合を実現するために長い剛性のあるリンカー分子を使用して結合の問題を解決する。効果的な結合は、付着点が磁性粒子からより離れた位置にある場合に磁性粒子が表面に強く結合できる可能な配向の数が増大するという観察結果に基づく。長いだけでなく剛性のあるリンカー分子を使用して磁性粒子表面から離れた位置に結合分子を置くことにより、表面に磁性粒子を結合する反応速度が著しく高まる。こうして、結果として得られる、分子の輪郭長および剛性の関数である末端間距離は、結合反応速度の向上に寄与する。

【0144】

したがって、本発明によるリンカー分子は、コネクタ分子の機能および/またはスペー

50

サーの機能を有することができる。この目的のために、これらの重合体分子は、好ましくは、特定の長さ、強度、および/または剛性を有し、これにより、重合体繊維のように働くことができる。

【0145】

また本発明によって企図されるのは、例えば、二量化またはより高次の多量体化によって、集まって繊維になる重合体の使用である。また企図されるのは、より高次の構造を確立するのを助ける「補助分子」の使用である。企図される一例は、一本鎖核酸分子であり、これは集まって二量体ヘリックス構造を構成し、次いで、補助分子と一緒に集まりうる。補助分子に対する他の企図される例は、ssDNA、dsDNA、もしくは両方（例えば、DNA結合タンパク質）またはssRNA、dsRNA、もしくは両方（例えば、RNA結合タンパク質）などに核酸を結合することができるタンパク質である。このような因子またはタンパク質の結合は、好ましくは、核酸分子、例えば、dsDNAまたはssDNAまたはssRNA中に存在しうる、結合タンパク質によって認識された特異的結合モチーフによって誘導されうる。このような結合因子が、核酸分子上で結合された後リンカーの剛性は増強され、大きな平均伸展長を持つリンカーが得られうる。このようなリンカー修飾は、アッセイの前またはアッセイ中に実施されうる。本発明のさらなる特定の実施形態において、RNAまたはDNA結合タンパク質などの補助分子は、タンパク質-タンパク質間ドメイン、例えば、SH3、PDZ、14-3-3、SH2ドメインまたは当業者に知られている他の好適なドメインを含みうる。親和性のある認識ドメインまたは相互作用ドメインを含む、二次結合因子は、しかるべく備えられ、補助分子による核酸結合を含む複合体を組み立てることが可能になり、次いで、二次相互作用分子によって結合されうる。さらなる実施形態において、剛性のあるリンカー構造は、重合ポリペプチドの形態で、例えば、コラーゲン、またはSc11、Sc12、Sc1A、もしくはSc1Cなどのコラーゲン様タンパク質の形態および/または分子的同一性に基づいて、実現される。これらの分子は、本明細書で定義されているような他のリンカー分子または官能基とさらに組み合わせることができる。

10

20

【0146】

本発明のさらなる特定の実施形態において、重合リンカー分子は、好適な条件の下で自己集合することができる重合体分子であってよい。したがって、重合体分子は、磁性粒子と併せて用意され、磁性粒子の表面上に重合体の集合を形成することができる。自己集合は、好適なパラメータ、例えば、重合に必要な単量体または重合単位の濃度、単量体または重合単位に対する架橋因子の濃度、反応環境のpH、温度、イオンの存在、タンパク質などの補助因子の存在などによって制御されうる。自己集合重合体は、さらなる実施形態において、そのような好適な条件の変化に基づき、例えば、pHの変化、因子または単量体の濃度の減少または増大、温度の変化などによって、分解しうる。

30

【0147】

また、リンカー分子は、本明細書で定義されているような荷電構造を備えるか、またはそれからなるか、または本明細書で説明されているような立体表面構造に組み込まれうることも企図されうる。

【0148】

本発明のさらなる特定の実施形態において、リンカー分子は、直鎖、環状、または分岐鎖様分子、またはその混合であってよい。

40

【0149】

本発明の文脈の範囲内の好適なリンカー分子は、例えば、核酸、リボ核酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物類、脂質類、ポリエチレン・グリコール、多糖類、 dendrimer、 dendron、 ナノチューブ、もしくは金ナノ粒子、またはこれらの好適な誘導體もしくは組み合わせとすることができる。

【0150】

上で定義されているような核酸分子は、有利には、「核酸リンカー分子」として使用することもできる。リンカー分子は、一本鎖および/または二本鎖DNA分子、または上で

50

定義されているような任意の種類その誘導体を含みうる。DNAは、例えば、A-DNA、B-DNA、もしくはZ-DNA、またはこれらの形態の混合物の形態を、例えばとりうる。リンカー分子は、PNA、CNA、HNA、LNA、もしくはANA分子、またはこれらの混合もしくは組み合わせ、または本明細書で定義されているような他のリンカー分子と、例えばDNAまたはRNAなどの任意の種類核酸との混合もしくは組み合わせとすることもできる。特定の実施形態において、リンカー分子は、リボ核酸分子、またはリボ核酸と他の述べた核酸分子のどれか、もしくは本明細書で定義されているような他のスペーサー分子との混合である。核酸またはリボ核酸分子は、上で定義されているような異なる塩基組成および/または長さの分子であってよい。リンカー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような反発表面構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特に核酸分子はリンカーとして使用された場合に磁性粒子に特異的正味電荷を付与しうるので、磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、核酸リンカー分子は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電核酸リンカー分子」という用語は、約0の分子の正味電荷に関する。

10

**【0151】**

本発明の特に好ましい一実施形態において、リンカー分子は、二本鎖またはdsDNA、二本鎖またはdsRNA、PNA、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖からなる群から選択された分子であるか、またはこれらを含む。

20

**【0152】**

本発明のさらなる好ましい実施形態によってさらに企図される、有利な一態様は、PNAおよびPNA/DNAまたはPNA/DNA二本鎖が酵素分解に対する耐性を付けるヌクレアーゼまたはプロテアーゼのいずれかによって容易に認識されないことである。

**【0153】**

上で定義されているようなペプチド分子は、有利には、本発明の文脈の範囲内で「ペプチド・リンカー分子」として使用することもできる。このようなペプチドは、上で定義されているような異なるアミノ酸組成および/または長さのものであってよい。ペプチド分子のリンカー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような荷電構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特にペプチド分子はリンカーとして使用された場合に磁性粒子に特異的正味電荷および/または立体反発力を与えうるので、磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、ペプチド・リンカー分子は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電ペプチド・リンカー分子」という用語は、約0の分子の正味電荷に関する。

30

**【0154】**

上で定義されているようなタンパク質またはポリペプチド分子は、有利には、本発明の文脈の範囲内で「タンパク質分子リンカー分子」または「ポリペプチド・リンカー分子」として使用することもできる。このようなタンパク質は、上で定義されているような異なるアミノ酸組成および/または長さのものであってよい。タンパク質またはポリペプチド・リンカー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような荷電構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特にタンパク質またはポリペプチド分子はリンカーとして使用された場合に磁性粒子に特異的正味電荷および/または立体反発力を与えうるので、磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、ポリペプチドまたはタンパク質リンカー分子は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電ポリペプチドまたはタンパク質分子」と

40

50

いう用語は、約 0 の分子の正味電荷に関係する。

【0155】

上で定義されているような炭水化物分子は、有利には、本発明の文脈の範囲内で「炭水化物リンカー分子」として使用することもできる。上で説明されているようなこのような炭水化物類は、上で定義されているような異なる組成および/または長さのものであってよい。炭水化物リンカー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような荷電構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特に炭水化物分子はリンカーとして使用された場合に磁性粒子に特異的正味電荷および/または立体反発力を与えうるので、磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、炭水化物リンカー分子は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電炭水化物分子」という用語は、約 0 の分子の正味電荷に関係する。

10

【0156】

上で定義されているような脂質分子は、有利には、本発明の文脈の範囲内で「脂質非アフィン・スペーサー分子」として使用することもできる。このような脂質類は、上で定義されているような異なる組成および/または長さのものであってよい。脂質非アフィン・スペーサー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような荷電構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特に脂質分子はリンカーとして使用された場合に磁性粒子に特異的正味電荷および/または立体反発力を与えうるので、磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、脂質スペーサー分子は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電脂質分子」という用語は、約 0 の分子の正味電荷に関係する。

20

【0157】

上で定義されているようなポリエチレン・グリコール分子は、有利には、本発明の文脈の範囲内で「ポリエチレン・グリコール・リンカー分子」として使用することもできる。このようなポリエチレン・グリコールは、上で定義されているような異なる組成および/または長さのものであってよい。ポリエチレン・グリコール・リンカー分子の長さは、磁性粒子のサイズもしくは直径、上で定義されているような荷電構造分子の存在、サイズ、もしくは長さ、特に電荷を帯びたポリエチレン・グリコール分子誘導体を使用された場合の磁性粒子の企図された総特異的正味電荷および/または立体反発、または結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、またはリンカー分子の企図された柔軟性、剛性、もしくは安定性に依存するようになされう。本発明のいくつかの実施形態において、ポリエチレン・グリコール・リンカー分子、特にその誘導体もしくはその修飾された誘導体は、荷電または非荷電分子とすることができる。本明細書で使用されているような「非荷電ポリエチレン・グリコール分子」という用語は、約 0 の分子の正味電荷に関係する。

30

【0158】

「 dendriマー」または「 dendriマー・リンカー分子」は、繰り返し分岐された、おおよそ球状の大分子とすることができる。このような dendriマーは、異なる組成および/または長さ、および/または分岐度を有するものとしてよい。長さは、企図された全体的な特異的正味電荷および/または立体反発、結合分子と粒子表面との間の企図された末端間距離、リンカー分子の企図された柔軟性、剛性、または安定性、および/または磁性粒子 1 個当たりの荷電分子の企図された個数に依存するようになされう。本発明によって企図されているような dendriマーは、低分子量または高分子量の化学種を含むものとしてよい。本発明による dendriマーは、好ましくは、電荷を有しない、つまり、分子は 0 の正味電荷を示す。

40

【0159】

また本発明によって企図されるのは、リンカーの一部として本発明による dendriマー

50

を使用することである。この目的のために、デンドリマーは、いくつかの実施形態において、分子表面上に官能基、例えば、親水基を備え、あるいは、内部的な機能性を有することができる。本発明の目的のため企図されているようなデンドリマーは、第1、第2、第3、第4、またはそれ以上の世代のデンドリマーとすることができる。好ましいデンドリマーは、例えば、ニューコム・デンドリマー (newkome dendrimer) またはアルボロール (arbolol)、およびポリアミドアミン (P A M A M) を含む。当業者であれば、デンドリマーは、上で説明されているようなリンカー分子がそのような構造の一部であるか、または中に埋め込まれている粒子表面または平坦な表面上に大体積の立体表面構造を構成するために有利に使用されうる構造をもたらすことを理解するであろう。本発明の文脈の範囲内で使用されるべきさらなる変更形態、さらには合成方法なども、当業者に知られているか、または「Dendrimers and other dendritic polymers」、Frechet and Tomalia、J. Wileyなどの好適な文献から得られる。

10

## 【0160】

「デンドロン」または「デンドロン・リンカー分子」は、デンドリマーの単一の化学的に取り扱い可能な群、つまり、上で定義されているようなデンドリマーの焦点を含むものとして理解される。本発明によるデンドロンは、好ましくは、電荷を有しない、つまり、分子は0の正味電荷を示す。本発明の特定の実施形態において、デンドロンは、本明細書で定義されているようなリンカーの一部として使用されうる。

20

## 【0161】

本明細書で使用されているような「ナノチューブ」という用語は、炭素ナノチューブ、つまり円筒形ナノ構造を持つ炭素の同素体を指す。そのようなナノチューブは、単層ナノチューブまたは多層ナノチューブであってよい。本発明では、異なる種類、形態、および複雑度のフラレン構造ファミリー、例えば、球状、または楕円形のバッキーボール形態、バッキーボール・フラレン、またはナノチューブとバッキーボールとの組み合わせなどのリンカー分子も企図している。本発明によるナノチューブまたは当業者に知られている他のリンカーの好適なリンカー分子は、好ましくは、電荷を有しない、つまり、これらの分子は0の正味電荷を示す。

## 【0162】

本発明の別の好ましい実施形態において、リンカー分子は、反発表面構造、例えば、本明細書で定義されているような荷電核酸分子、ペプチド分子、脂質分子などよりも長いものとしてよい。本明細書で使用されているような「より長い」という言い回しは、リンカー分子の平均伸展長が、表面構造の平均伸展長より大きいことを意味する。平均伸展長の差は、5%、10%、15%、20%、30%、50%、75%、100%、200%、300%、500%、1000%以上であるものとしてよい。

30

## 【0163】

本明細書で使用されているような「平均伸展長」という用語は、リンカー分子の末端間距離の二乗平均平方根  $\langle R^2 \rangle$  であり、これは次のようにミミズ鎖モデルに従って記述することができる。

$$\langle R^2 \rangle = 2 P I [ 1 - ( P / I ) ( 1 - e^{-I / P} ) ] ,$$

ただし、Pは、重合体の持続長であり、Iは、リンカーの輪郭長である。

40

## 【0164】

本明細書で使用されているような「輪郭長」という用語は、最大の物理的に可能な伸展における長さとしての重合体鎖の輪郭長を指す。

## 【0165】

いくつかの生物学的に重要な重合体は、二本鎖DNAおよびRNA、非構造RNAおよび非構造ポリペプチドを含む、ミミズ鎖として有効にモデル化されうる。Kratky-Porodのミミズ鎖モデルは、末端間距離および持続長を近似するために半柔軟性重合体のモデリングに適している。しかし、当業者は、末端間距離および持続長を近似するために、例えば、以下で説明されているような、多数の他の理論モデルに気づいている。

50

## 【0166】

本明細書で使用されているような「持続長、P」という言い回しは、重合体または鎖の堅さまたは剛性を定量化する基本的な機械的特性を指し、接線の方向の相関が失われている長さとして定義される。化学では、これは、無限に長い鎖内の結合*i*に関するすべての結合*j* *i*の射影の平均総和として定義することもできる (Flory, Paul J. (1969年), *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, New York: Interscience Publishers)。位置0 (ゼロ)における重合体に対する接線となるベクトルと位置0から距離*L*だけ離れている接線ベクトルとの成す角度  $\theta$  について、この角度のコサインの期待値は距離とともに指数関数的に減少する。

$$\langle \cos \theta \rangle = e^{-L/P}$$

ただし、Pは、持続長であり、角括弧はすべての開始位置にわたってとった平均を表す。PEGなどの柔軟性重合体は、フローリー・モデル (ランダム・ウォーク) を使用して記述することができる。

## 【0167】

持続長は、曲げ剛性  $B_s$ 、ヤング率  $E$ 、および  $M$  of  $rad$ 、M. R. K.、「*Cytoskeletal mechanics: models and measurements*」、Cambridge Univ Press、2006年において説明されているような重合体鎖の切断面を使用しても定義されうる。

## 【0168】

$$P_l = B_s / k_B T$$

$$B_s = EI$$

## 【0169】

剛性のある均一な棒の場合には、 $I$ は以下のように表すことができる。

## 【0170】

$$I = a^4 / 4$$

ここで  $a$  は半径である。

## 【0171】

高分子科学では、持続長は、クーン長の  $1/2$ 、つまり、鎖が自由に接合されていると考えられる仮説的線分の長さとして定義することもできる。持続長は、無限鎖長の制限範囲内の鎖末端のところで鎖輪郭の接線への末端間ベクトルの平均射影に等しい。

## 【0172】

本明細書で使用されているように、「堅さ」とも称される「剛性」または「剛性のある」は、変形に抵抗する固形物の特性を定義する。リンカー分子の剛性は、平均伸展長に本質的に寄与することが理解される。本明細書で使用されているような「柔軟な」は、容易に変形できる、固形物の特性を指す。本発明の文脈において、柔軟な分子、重合体、またはリンカーは、したがって、本明細書で定義されているような低い剛性を有し、その結果、分子の曲がりおよび折り畳みが生じうる。

## 【0173】

本発明の特定の実施形態において、リンカー分子の剛性は、上で定義されているようなリンカーの末端間距離の二乗平均平方根  $\langle R^2 \rangle$  を用いて決定される。いくつかの実施形態において、剛性は、本明細書で定義されているような輪郭長と比較してリンカーの末端間距離の二乗平均平方根または平均伸展長に関してしかるべく測定されうる。したがって、例えば、リンカー分子の平均伸展長に本質的に等しいリンカー分子の輪郭長は、リンカー分子の剛性が高いことを示す。その一方で、前記リンカーの平均伸展長より著しく大きいリンカー分子の輪郭長は、リンカー分子の剛性が低いことを示す。

## 【0174】

本発明では、リンカー分子が、第1の結合分子と磁性粒子表面との間の平均伸展長を長くするためにしかるべく特定の長さを有することが企図される。付随して存在する反発構

10

20

30

40

50

造によってもたらされる効果、つまり、反発力の増大は、例えば、多数の比較的短い反発構造、例えば、立体コーティングまたは荷電分子が本明細書で定義されているように磁性粒子上に存在することによっても達成されうることを企図することができる。本発明は、したがって、好ましい実施形態において、本明細書で説明されているような有利な特徴を組み合わせることでセンサー表面への結合を高めるために、長いリンカー分子および短い反発表面構造分子、例えば、立体コーティングまたは荷電分子を有する磁性粒子を企図している。本発明のさらなる特定の実施形態において、長いリンカー分子は、短い荷電分子と組み合わせられる。さらなる特定の実施形態において、リンカー分子は、反発表面構造分子の機能を同時に有することはありえない。例えば、リンカー分子は、本明細書で定義されているような電荷を持たないリンカー分子であってもよい。

10

## 【0175】

本発明のいくつかの実施形態において、リンカー分子が有する平均伸展長は、少なくとも約60nm、好ましくは最大約500nmまで、好ましくは少なくとも約65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、または100nm、なおいっそう好ましくは少なくとも約110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、160nm、170nm、180nm、190nm、または200nm、なおいっそう好ましくは少なくとも約220nm、250nm、270nm、または300nm、最も好ましくは少なくとも約320nm、350nm、370nm、または400nmであるものとしてよい。さらなる実施形態において、リンカー分子の平均伸展長は、400nmを超えてもよい。リンカー分子は、指示された値の間の他の好適な平均伸展長を有することもできる。

20

## 【0176】

本発明の別の好ましい実施形態において、リンカー分子は、本明細書で定義されているような反発表面構造であるか、または含む。結合力を高めるために、磁性粒子に、長いリンカー分子に由来する、また反発表面構造の存在に由来する有利な特徴を、例えば、荷電構造を含むリンカー分子を使用することによって組み込むことができる。このアプローチは、したがって、長いリンカーおよび反発表面構造の要件を満たす、1つの種類の分子のみが生成されなければならないという利点を有し、これにより、より均質な、生成しやすい粒子が得られる。本発明では、異なる種類または形態のリンカー分子および/または反発表面構造の組み合わせも企図している。

30

## 【0177】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、反発表面構造は、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子でさらに官能化される。本発明の特定の実施形態において、第1の結合分子でさらに官能化される、反発表面構造は、磁性粒子上の第1の結合分子の量を増大するか、またはさらに増大させる。第1の結合分子は、好ましくは、上で定義されているような抗体もしくはその断片、上で定義されているようなアプタマー、または上で定義されているような相補的核酸である。

## 【0178】

リンカー分子および/または反発表面構造が、デオキシリボヌクレアーゼおよび/または二本鎖核酸分子を切断することができる制限酵素によって開裂可能でないことは特に好ましい。このようなデオキシリボヌクレアーゼによる非開裂性は、デオキシリボヌクレアーゼ酵素に対する基質または認識モチーフを表さないリンカー分子または反発表面構造を構成することによって達成されうる。典型的には、この効果の達成は、上で定義されているようなPNA、CNA、HNA、LNA、またはANA分子などのDNA類似体を使用すると可能である。

40

## 【0179】

二本鎖の核酸分子を切断することができる制限酵素による非開裂性は、二本鎖の核酸分子を切断することができる制限酵素に対する基質または認識モチーフを表さないリンカー分子または反発表面構造を構成することによって達成されうる。典型的には、この効果の達成は、上で定義されているようなPNA、CNA、HNA、LNA、またはANA分子

50

などのDNA類似体を使用するか、または一本鎖であるDNA分子を使用するか、または制限酵素の結合および/または活性に必要な特異的配列モチーフを含まないDNA分子を使用すると可能である。さらなる詳細は、当業者に知られるものであるか、または好適な文献ソースから得られる。

【0180】

本発明のさらなる特定の実施形態において、本明細書で定義されているようなリンカー分子および/または本明細書で定義されているような反発表面構造は、リボヌクレアーゼによって開裂可能でない。このようなりボヌクレアーゼによる非開裂性は、リボヌクレアーゼ酵素に対する基質または認識モチーフを表さないリンカー分子または反発表面構造を構成することによって達成されうる。

10

【0181】

本発明のさらに好ましい一実施形態において、dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖などの核酸分子は、長さが約50から1000ヌクレオチドである。dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖などの核酸分子は、例えば長さが約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、250、270、300、320、350、370、400、420、450、470、500、520、550、570、600、620、650、670、700、720、750、770、800、820、850、870、900、920、950、970、もしくは1000ヌクレオチド、または指示された値の間の長さであるものとしてよい。さらなる特定の実施形態において、dsDNA、PNA、PNA-DNA二本鎖、またはRNA-DNA二本鎖などの核酸分子は、指示された値より短い場合も、長い場合もある。

20

【0182】

本発明の特に好ましい一実施形態において、dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖などの核酸分子は、長さが約100ヌクレオチドである。

【0183】

本発明の特に好ましい一実施形態において、核酸分子は、dsDNA、PNA分子、PNA-DNA二本鎖、およびRNA-DNA二本鎖からなる群から選択される。

30

【0184】

上で述べた目的は、試料中の標的分子を検出するためのデバイスを説明する本発明の第2の態様によっても解決される。当該デバイスは、少なくとも2種類の磁性粒子の混合物と、センサー表面とを備える。前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの一方の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子によって官能化され、前記第1の結合分子は、この粒子に付着し、前記少なくとも2種類の磁性粒子の混合物のうちの第2の種類は、前記粒子の表面に直接付着して、前記磁性粒子の表面を覆うことで、結果として前記磁性粒子の特異的正味電荷および/または立体反発を生じる、反発表面構造によって官能化される。前記センサー表面は第2の結合分子を備える。前記磁性粒子は前記センサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例し、前記反発表面構造は、前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果を前記センサー表面の方へ伝える。

40

【0185】

本発明の第1の態様について上で述べた定義および実施形態は、本発明の第2の態様にも適用される。本発明の第2の態様は、同じ原理、つまり、前記センサー表面の方へ向かう前記磁性粒子上の静電および/または立体プッシング効果の発生に基づく。しかし、この効果は、少なくとも2種類の磁性粒子の混合物を供給することによって達成される。

【0186】

本明細書で使用されているような「少なくとも2種類の磁性粒子の混合物」という言い

50

回しは、第1の結合分子で官能化された磁性粒子に加えて、本明細書で定義されているような反発表面構造によって主に官能化される第2のまたはさらなる種類の磁性粒子（反発磁性粒子）が上で説明されているようなデバイスで使用されうることを意味する。特定の実施形態において、この第2の、またはさらなる種類の反発磁性粒子は、第1の結合分子によって官能化されない。このような磁性粒子は、特に官能化された磁性粒子と組み合わせて使用される場合に、官能化されることなく反発表面構造をしかるべく備えるのみであってよい。

**【0187】**

本発明では、特定の実施形態において、第1の結合分子で官能化されたただ1つの第1の種類の磁性粒子と一緒にただ1つの第2の種類の反発磁性粒子を使用することを企図している。さらに企図されるのは、第1の結合分子で官能化されたただ1つの第1の種類の磁性粒子と一緒に複数の種類の反発磁性粒子を使用することである。例えば、異なる反発表面構造を有するか、または上で定義されているような異なる荷電分子もしくは立体コーティングなどの異なる分子を含む反発磁性粒子が使用されうる。さらに、反発磁性粒子は、例えば、サイズまたは直径、磁気特性などが異なりうる。さらに企図されるのは、第1の結合分子で官能化されたただ1つまたは複数の種類の磁性粒子と一緒に1つまたは複数の種類の反発磁性粒子を使用することである。第1の結合分子で官能化されたこれらの1つまたは複数の種類の磁性粒子は、例えば、第1の結合分子、サイズまたは直径、磁気特性などが異なりうる。

10

**【0188】**

このような方法は、反発磁性粒子が粒子を捕獲する機能から明確に分離される大きな利点を有するものとしてよい。言い換えると、結合特性の改善をもたらす機能は、これにより分離され、2つまたはそれ以上の種類の粒子に分散される。そのため、一利点は、反発表面構造の分子が標的分子に関して非特異的であり、さまざまな用途に使用できることにあると思われる。反発磁性粒子は、例えば、注目する標的分子に対して特異的である非反発磁性粒子に加えられうる。したがって、本発明では、結果として得られる磁性粒子の混合物の反発磁性粒子が、結合分子で官能化された磁性粒子がセンサー表面の方へプッシングされるように静電プッシング効果を形成する働きをしうることが企図される。

20

**【0189】**

本発明の特定の実施形態において、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子で官能化された第1の種類の磁性粒子は、それに加えて、荷電分子または上で定義されているような立体コーティングなどの反発表面構造を備えることができる。

30

**【0190】**

本発明のさらなる特定の実施形態において、前記標的分子に特異的に結合することができる第1の結合分子で官能化された第1の種類の磁性粒子は、それに加えて、上で定義されているような荷電分子を備えることができる。

**【0191】**

第1の種類の磁性粒子と第2の種類の磁性粒子との比、例えば、少なくとも2種類の磁性粒子の混合物内の荷電磁性粒子と非荷電磁性粒子との比は、10:90から90:10までの範囲内とすることができる。例えば、第1の種類の磁性粒子：第2の種類の磁性粒子の比、例えば、荷電磁性粒子と非荷電磁性粒子との比は、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、または90:10の比であってよい。さらに企図されるのは、指示された値の間の任意の他の比である。

40

**【0192】**

本発明の別の好ましい実施形態において、本明細書で定義されているようなリンカー分子は、少なくとも1つの短い柔軟なスペーサーをさらに備える。本明細書で定義されているようなリンカー構造、好ましくは本明細書で定義されているような長い、剛性のあるリンカーは、一端または両端に短い柔軟なスペーサーを持つことが、本発明によりしかるべく企図される。そのような柔軟なスペーサーの存在による一定の柔軟性が剛性のあるリン

50

カー分子に加えられることは理解される。柔軟なスペーサー構造は、したがって、全体的な剛性を保持しながらリンカー分子の可動性に寄与する柔軟な接合部として働きうる。リンカー分子の可能な配向の数は、そのような柔軟なスペーサーによって増やせる。柔軟なスペーサーは、好適な柔軟な分子、例えば、高分子、ペプチド、化学基などとすることができる。

#### 【0193】

特に好ましい一実施形態において、短い柔軟なスペーサーは、一本鎖核酸、例えば、本明細書で定義されているような一本鎖DNAまたはRNA分子、または本明細書で定義されているような、または当業者に知られているような他の一本鎖核酸形態を含む。

#### 【0194】

さらなる一態様では、本発明は、試料中の標的分子の存在または量を検出する方法に関するものであり、この方法は本明細書で説明されているように試料とデバイス内で磁性粒子に付着している第1の結合分子とを接触させるステップと、試料をセンサー表面に付着することができる第2の結合分子を接触させるステップであって、第1の結合分子および/または第2の結合分子は、前記標的分子および、任意で、センサー表面に付着している標的類似分子に特異的に結合することができ、標的分子は、標的類似分子への第1の結合分子の結合を妨げることができる、ステップと、任意で、本明細書で定義されているような反発表面構造を備える磁性粒子を加えるステップと、センサー表面に結合された粒子の個数を検出するステップであって、粒子をセンサー表面に近接近させるために磁力が印加され、結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の量に正比例または反比例する、ステップとを含む。本発明によって企図されるのは、アッセイ形式であり、これは標的分子の存在および/または量の検出のための典型的な競合または非競合アッセイのいずれかとすることができる。当業者であれば、上で説明されているようなデバイス、さらには本発明による方法は、そのような分析を実施するのに適していることを理解するであろう。

#### 【0195】

「センサー表面に付着することができる」という言い回しは、第2の結合分子が、所定の仕方では付着されているセンサー表面に必ずしも常に結合されていない、つまり、アッセイの開始時にすでに表面に必ずしも付着していないことを意味する。直接的なまたは上で定義されているようにリンカー分子を介した表面への第2の結合分子の付着は、アッセイ中の任意の時点において生じると理解される。当業者であれば、付着の選択的な時点によりアッセイを実施する広範な可能性が開くことは理解するであろう。本発明により企図されるのは、したがって、表面への結合とは無関係な別の分子として働きうる第2の結合分子-リンカー複合体である。当業者であれば、センサー表面に常に固定または付着されていない第2の結合分子-リンカー複合体はいくつかの利点を有する可能性のあることをさらに理解するであろう。企図される一利点は、付着していない第2の結合分子-リンカー複合体は、自由に、かつ高速に拡散し、それにより、標的分子への結合を介して捕獲複合体(capture complex)への結合を高められることである。「捕獲複合体」という用語は、第1の磁性粒子に直接的にまたは間接的に付着している第1の結合分子または捕獲分子が標的分子を捕獲している状態を記述するものである。この例では、第1の結合分子によって捕獲された標的分子への第2の結合分子/リンカー分子の結合は適時に独立して生じる、つまり表面への付着の前に生じる。

#### 【0196】

特定の好ましい実施形態では、センサー表面への前記第2の結合分子の付着は、標的分子への第2の結合分子の結合の前または後に生じる。本発明の特定の実施形態において、第2の結合分子は、好ましくは本明細書で定義されているようなリンカー分子を介して、アッセイの第1のステップにおいて、または上で定義されているような試料が追加されたときの時点である、アッセイの開始前に、表面に付着することが許される。このような場合、キャプチャ複合体が最初に形成され、その後のステップで、表面に付着した第2の結合分子を含む事前形成された表面構造に結合する。

#### 【0197】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる好ましい実施形態において、第2の結合分子・リンカー・モジュールは、最初に標的分子への特異的結合によりキャプチャ複合体に結合し、全体的キャプチャ・第2の結合分子・リンカー複合体が、その後、センサー表面に誘導され、これにより、キャプチャ複合体が表面に連結される。第2の抗体に付着している長いリンカーによって距離が生じうるが、第1の結合分子は第1の粒子の表面に直接的に付着する。言い換えると、リンカーを付着させている第2の結合分子は、結合反応速度を高める効果をもたらす。

#### 【0198】

企図されている非競合アッセイ形式において、第1の結合分子および第2の結合分子は両方とも、標的分子に特異的に結合することができる。第1のステップにおいて、第1の磁性粒子上に存在する第1の結合分子は、標的を認識して結合することができることが企図されうる。第2のステップで、標的分子を結合している第1の磁性粒子は、拡散または磁氣的作動によって、センサー表面上に存在する第2の結合分子へ向けられるものとしてよい。センサー表面への結合には、標的への第2の結合分子の結合が介在する。また企図されるのは、1つまたは複数の洗浄ステップであり、そのステップで、非特異的結合磁性粒子が表面から取り除かれる。本発明の特定の実施形態において、そのような洗浄ステップは、パルスを用いた磁気作動を介して行われる。センサー表面にその後結合される粒子の個数が、その後判定される。結合粒子の個数は、試料中に存在する標的分子の個数に直接対応する。

10

#### 【0199】

また企図されているのは、競合アッセイに基づくアッセイ形式であり、これは典型的には競合因子または標的類似体の存在を必要とする。本明細書で使用されているような「標的類似分子」という用語は、本明細書で定義されているような第1の結合分子への結合のため標的分子と競合する任意の分子を指す。そのような場合、標的分子は、標的類似分子への第1の結合分子の結合を妨げうる。本発明によって企図されているのは、競合または阻害アッセイ形式であり、そこでは、第1の結合タンパク質は平坦な表面または上で定義されているような磁性粒子の表面に付着する標的類似分子を結合することができる。この結合は、本明細書で説明されているような標的分子が試料中に存在する場合、およびこの標的分子が最初に抗体に結合する場合に、妨げられうる。例えば、小さな薬物分子は、薬物分子の類似体が、例えば、平坦なセンサー表面に固定化される場合に企図された方法を使用して検出されうる。薬物分子が試料中に存在しない場合、結合分子が標的分子を認識するすべての粒子が、表面上の標的類似分子に結合しうる。しかし、この結合を妨げる、薬物（標的）分子の存在下で、抗薬物結合分子は、表面上の標的類似体に結合しえないか、またはあまり結合できない。そのような場合、表面上の粒子の量は、標的分子の量に反比例する。

20

30

#### 【0200】

本発明によって企図されているのは、磁性粒子が、分析手順が加速されるように磁場を印加することによって作動されうることである。磁場を使用することで非特異的結合粒子が取り除かれバックグラウンド信号を低減することも本発明によって企図される。本発明による検出の方法に適した例示的な光磁気システムが図1に示されている。

40

#### 【0201】

特に好ましいのは、磁性粒子の光学的検出に基づく感知デバイスである。対応する詳細は、光源と光検出システムとを備える図1に示されている例示的なデバイスから得られる。検出に使用される光学的方法では、典型的には、光信号の変化を測定するが、この光信号の変化は磁性粒子から反射された、光学的手段によって検出されうる、光の差を意味する。例えば、このような方法は、散乱光の検出または全反射（TIR）もしくは漏れ全反射（FTIR）に基づく検出などの技術を含みうる。好ましくは、光信号の変化は、センサー表面への第2の結合分子の結合によって結合されている磁性粒子のみを指す。詳細は、当業者に知られているか、またはBrulsら、Lab Chip、2009年、9、2504～3510頁などの好適な参考文献から得られる。

50

## 【0202】

本明細書で使用されているように、「全反射」という用語は、光が一方の物質の中に特定の角度より大きい入射角でより高い屈折率を持つ別の材料から入るときにいくつかの物質中に存在する条件を記述するものである。これが生じる特定の角度は、臨界角とも称される、両方の物質の屈折率に依存し、数学的に計算することができる（スネルの法則、屈折の法則）。磁性粒子が存在しない場合、屈折は生じず、光源からの光線は全反射される。磁性粒子が表面に近い位置にあるか、または表面と接触している場合、光線は、粒子によって漏れると言われ、その地点の反射はもはや全反射ではない。

## 【0203】

全反射信号の減少として定義されうる信号は、計算して求めることができる。信号は、表面上の粒子の濃度（表面密度 $n$ （チルダ））に程度の差はあるが直線的に依存する。信号は、次のように表すことができる。

10

## 【0204】

$$S = \cdot n (\text{チルダ})$$

ここで $S$ は%で表される測定信号の変化であり、 $n$ は表面密度から信号変化への変換係数である。

## 【0205】

本発明の好ましい一実施形態において、結合粒子の検出は、漏れ全反射（FTIR）を介して、または表面の近くの前記結合粒子からの散乱光の測定を介して実行される。

20

## 【0206】

別の態様では、本発明は、本明細書で定義されているような磁性粒子を使用して試料、例えば、上で定義されているような試料中の標的分子を検出するステップに関するものである。

## 【0207】

本発明の特に好ましい一実施形態において、上記のデバイス、方法、または使用の文脈において述べられているような標的分子は、心臓トロポニンI（cTnI）、NT-proBNP、または副甲状腺ホルモンである。本発明は、さらなる標的分子またはクラスを検出または標的分子も対象とする。特に好ましいのは、心臓トロポニンI（cTnI）である。

30

## 【実施例】

## 【0208】

実施例1 - ゼータ電位に対する負電荷を持つDNA分子の効果

負電荷を持つDNA分子の効果が分析された。このために、大きな負電荷を持つDNA分子が粒子に結合された。粒子の電荷がゼータ電位として測定された。電荷は、粒子に結合された大きな負電荷を持つDNA分子の量が増えると増大する。さらに、より長いDNA分子を持つ（より多くの電荷がある）粒子に対してより高い電荷が測定される。

## 【0209】

ストレプトアビジン分子で官能化され、可変長の異なる量のビオチン官能化dsDNAに結合された500nm Ademtech粒子に対するゼータ電位値が、pH7.4の10mMリン酸緩衝液中で測定された（図4を参照）。

40

## 【0210】

実施例2 - 97bp dsDNAの数を増やした場合の効果

97bp dsDNAの数を増やした場合の効果調べるために、ストレプトアビジン・タンパク質で官能化された、500nm Ademtech超常磁性粒子に付着した可変長のビオチン標識97bp dsDNAを用いて実行されるアッセイに対するFTIR信号振幅を判定した。図6からわかるように、1粒子当たりのDNA分子が多ければ多いほど、表面接触は広くなった。

## 【0211】

実施例3 - FTIRアッセイの終了時の信号変化

さらなる実験で、FTIRアッセイの終了時の信号変化を調べた。最初に、分子の一端

50

にビオチン、DNAの他端にテキサスレッド分子を保持する単一の97bp dsDNA断片を、ストレプトアビジン粒子に結合した。その後、類似の97bp DNA分子、ただし、テキサスレッド分子を欠いたものを、粒子毎に指示された量まで加えた。すべての粒子が、抗テキサスレッド抗体のプリントされたスポットを用いてFTIRアッセイで検査された(図7を参照)。

【0212】

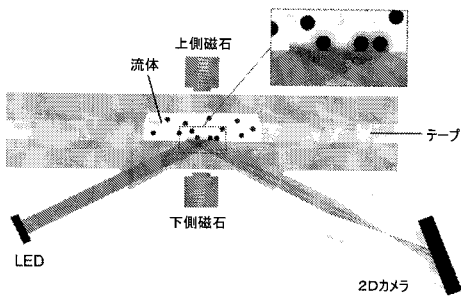
実施例4 - 流体力学的サイズに対する負電荷を持つDNA分子の効果

粒子の流体力学的サイズに対する負電荷を持つDNA分子の効果进行分析した。このために、大きな負電荷を持つDNA分子を粒子に結合した。粒子の流体力学的サイズまたは流体力学的半径を測定した。流体力学サイズまたは流体力学的半径は、粒子に結合されたDNA分子の量が増えると増大する。

【0213】

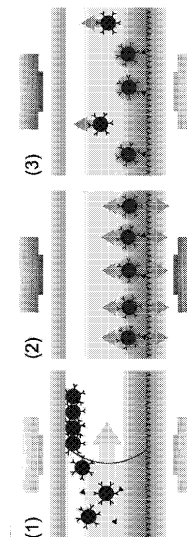
ストレプトアビジン分子で官能化され、可変長の異なる量のビオチン官能化dsDNAに結合された500nm Ademtech粒子に対する流体力学的サイズおよび対応するゼータ電位値を、pH7.4の10mMリン酸緩衝液中で測定した(図9を参照)。

【図1】

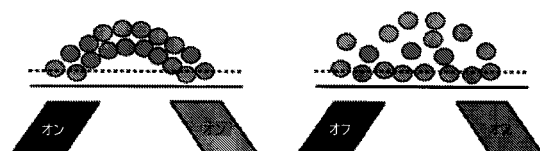


【図2】

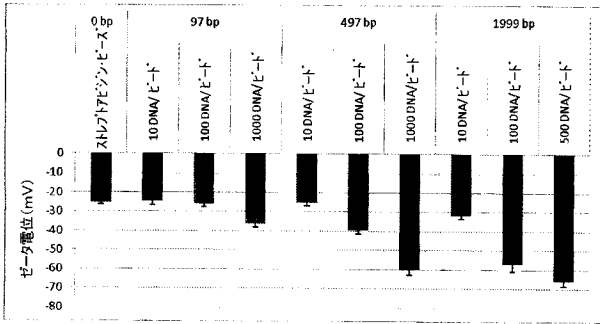
FIGURE 2



【図3】

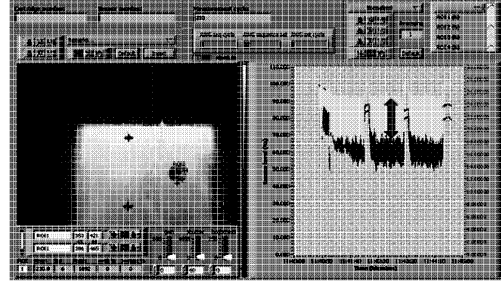


【 図 4 】

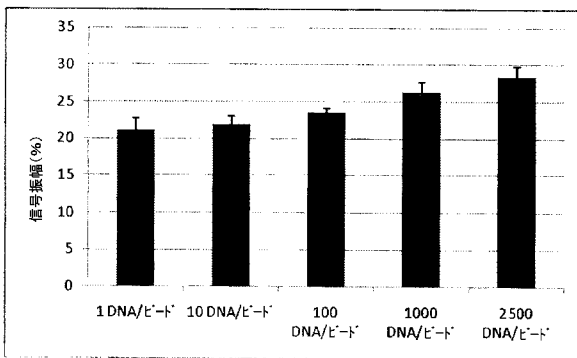


【 図 5 】

FIGURE 5

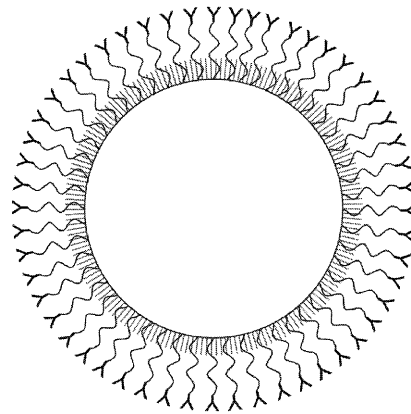


【 図 6 】

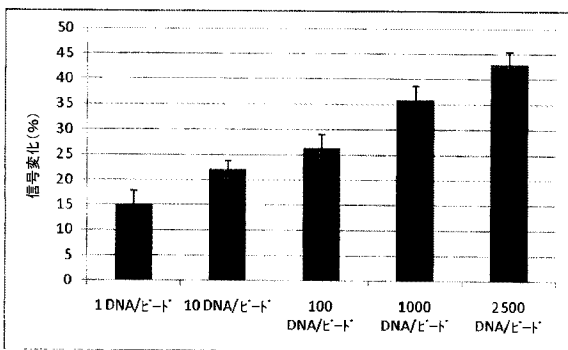


【 図 8 】

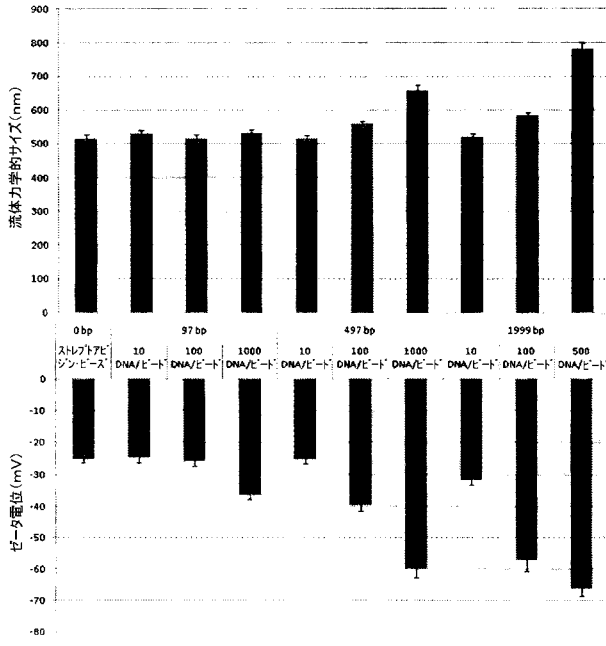
FIGURE 8



【 図 7 】



【 図 9 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2012/056473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
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) EP0-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2009/148863 A1 (XU XIAOHONG NANCY [US] ET AL) 11 June 2009 (2009-06-11) claims paragraph [0011] - paragraph [0012] paragraphs [0041], [0144]; figure 1 paragraph [0178] - paragraph [0179]; figure 10 ----- -/--	14  1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 27 February 2013		Date of mailing of the international search report 06/03/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Routledge, Brian

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/056473

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JEROEN NIEUWENHUIS: "Magnotech: Reliable and Fast Magnetic Point-of-Care Biosensor Technology", INTERNET CITATION, 16 April 2009 (2009-04-16), pages 1-10, XP002610327, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.aacc.org/events/meeting_proceeding/2009/Documents/NieuwenhuisOakRidge.pdf">http://www.aacc.org/events/meeting_proceeding/2009/Documents/NieuwenhuisOakRidge.pdf</a> [retrieved on 2010-11-18] the whole document -----</p>	1-15
Y	<p>BRULS D M ET AL: "Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles", LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, vol. 9, no. 24, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 3504-3510, XP002583698, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/B913960E [retrieved on 2009-10-15] cited in the application page 3505; figure 1 page 3509, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 3 -----</p>	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/056473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009148863 A1	11-06-2009	US 2009148863 A1	11-06-2009
		US 2012164073 A1	28-06-2012
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
C 1 2 M 1/34 F

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

(72) 発明者 ファウルニール, マティアス  
オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング  
4 4

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB15 BB17 BB20 CC13 FA12 FA15 GB09 GB10  
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QQ79 QQ89 QR32 QR35 QR48 QR50  
QS33 QS34 QS39 QX01 QX04

## 【要約の続き】

第1の種類は、前記標的分子に特異的に結合することができて、前記第1の種類粒子に付着されている第1の結合分子で官能化される。前記少なくとも2種類の磁性粒子のうちの第2の種類は、前記第2の種類磁性粒子の表面に直接付着して、前記第2の種類磁性粒子の表面を覆うことで結果として磁性粒子の特異的正味電荷を生じさせる反発表面構造で官能化される。前記磁性粒子はセンサー表面の前記第2の結合分子を直接的に、または間接的に結合することができる、センサー表面とを備える。さらに、本発明では、試料中の標的分子の存在または量を検出する方法、さらには試料中の標的分子を検出するための磁性粒子の使用について説明している。

专利名称(译)	用于增强磁性粒子免疫测定中的表面接触的粒子排斥		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014533832A</a>	公开(公告)日	2014-12-15
申请号	JP2014541801	申请日	2012-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦NV哥德堡		
[标]发明人	エフェルストーンヘンドリク ファウルニールマティアス		
发明人	エフェルス, トーン ヘンドリク ファウルニール, マティアス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/53 C12Q1/68 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/54373 C12Q1/68 C12Q1/6825 G01N33/54326 G01N33/54346		
FI分类号	G01N33/543.593 G01N33/553 G01N33/53.M C12Q1/68.A C12M1/34.Z C12M1/34.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC13 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GB09 4B029/GB10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX04		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	61/560450 2011-11-16 US 2011191453 2011-12-01 EP		
其他公开文献	JP6148245B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于检测样品内的靶分子的装置，其包括用于测量样品内的靶分子的样品容器，磁性颗粒，其中所述颗粒用能够特异性结合所述所述样品的第一结合分子功能化其中所述第一结合分子附着于所述颗粒的靶分子和直接附着于所述颗粒表面的排斥性表面结构，其中所述排斥性表面结构覆盖所述磁性颗粒的表面以便产生特异性所述磁性颗粒的净电荷和/或空间排斥以及包含第二结合分子的传感器表面，其中所述磁性颗粒能够直接或间接结合所述传感器表面的所述第二结合分子；其中结合的颗粒的数目与样品中存在的靶分子的量直接或相反地相关；并且其中所述排斥表面结构向所述传感器表面传递对所述磁性粒子的静电和/或空间推动作用。

