

(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2005-512021

(P2005-512021A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/27	GO 1 N 21/27	2 G O 5 9
A 6 1 B 10/00	A 6 1 B 10/00	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/00	C 1 2 Q 1/00	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-511703 (P2003-511703)	(71) 出願人	504012376
(86) (22) 出願日	平成14年7月9日(2002.7.9)		アリゾナ ボード オブ リージェンツ
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月9日(2004.1.9)		アメリカ合衆国 85282 アリゾナ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/023300		テンペ スイート 201 イースト ユ
(87) 国際公開番号	W02003/005890		ニバーシティ 20 バンク ワン ビル
(87) 国際公開日	平成15年1月23日(2003.1.23)		ディング
(31) 優先権主張番号	60/303,956	(74) 代理人	100070002
(32) 優先日	平成13年7月9日(2001.7.9)		弁理士 川崎 隆夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076439
			弁理士 飯田 敏三
		(72) 発明者	ビュードイン, スティーブン ビー.
			アメリカ合衆国 85226 アリゾナ
			チャンドラー ウェスト デル リオ ス
			トリート 3281
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的プロセスをモニターするための親和性バイオセンサー

(57) 【要約】

光学的バイオセンサーは、モニター中のマーカーに特異的に結合する1つ以上の親和性リガンドまたは結合性メンバーを有する。光ファイバーに沿って導かれる光は、結合性メンバーが固定化されている表面プラズモン共鳴(「SPRN」)プローブ表面を照らす。分光光度計が、光ファイバー経路に沿って戻る反射光を受け取り、結合したマーカーを既知のSPR様式で示す表面プラズモン共鳴の非存在または存在を示す波長情報を提供する。プローブはインビトロまたはインビボで使用される。インビボで使用されるとき、光ファイバー光路は、プローブを埋め込み部位に誘導するカテーテルを含む。インビボ埋め込みの場合、ハウジングが、埋め込み部位においてプローブを収容し、そして分光分析に悪影響を及ぼすと考えられるより大きな粒子をろ過して除くために適合化される。1つの実施態様において、プローブは2つの領域をその表面に有する。第1の領域には、結合性メンバーが固定化されてない。第2の領域には、結合性メンバーがその表面に固定化されている。第1の領域および第2の領域から戻ってくる光を比較することができる。第2

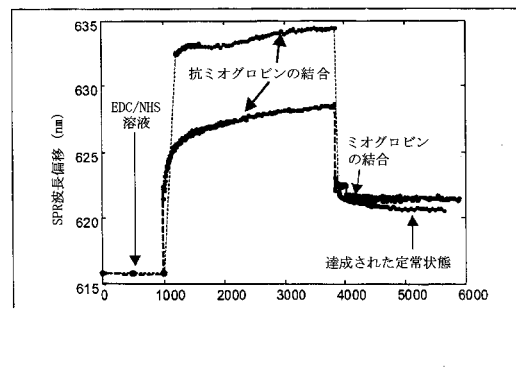


図 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的流体中の生物学的マーカーで、結合対の第 1 のメンバーである生物学的マーカーを観測するための光ファイバー SPR バイオセンサーであって、前記バイオセンサーは、

a . 前記結合対の第 2 のメンバーがその表面に固定化されている SPR プローブ表面；

b . 前記プロブ表面からの第 1 のシグナルおよび前記埋め込まれたプロブ表面からの第 2 のシグナルを受け取るための分光光学的手段で、前記結合対の前記第 1 および第 2 のメンバーが前記プロブ表面で結合した後の一定期間において、前記第 2 のシグナルが受け取られる、分光光学的手段；および

c . 前記第 1 の受け取られたシグナルおよび前記第 2 の受け取られたシグナルの特性を比較して、前記生物学的マーカーの存在を明らかにするための手段を含むバイオセンサー。 10

【請求項 2】

前記光ファイバープロブ表面はデキストランを前記結合対メンバーに対する固定化剤として含む、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 3】

前記プロブ表面はポリエチレングリコールを汚れ防止剤として含む、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 4】

個体内の組織における生物学的マーカーをインビボで観察するための請求項 1 のバイオセンサーで、前記 SPR プロブ表面は前記個体内に埋め込むことができ、かつ前記バイオセンサーは前記プロブ表面に対するハウジングをさらに含み、この場合、前記ハウジングにより、前記流体の粒子状成分を排除することができ、それによって、汚れ、炎症性応答、および前記プロブ表面に対する前記成分の非特異的な結合を防止することができる、請求項 1 のバイオセンサー。 20

【請求項 5】

個体内の埋め込まれた医療デバイスを収容するための生体適合性遮蔽体であって、リソグラフィ法によって形成され、直径が 1 ミクロン ~ 50 ミクロンの間である貫通孔を有するエラストマー遮蔽体を含む生体適合性遮蔽体。

【請求項 6】

前記医療デバイスが光ファイバーバイオセンサーまたはカテーテルである、請求項 5 の遮蔽体。 30

【請求項 7】

前記 SPR プロブ表面がカテーテルを介して前記個体内に埋め込まれる、請求項 2 のバイオセンサー。

【請求項 8】

前記光ファイバーは幅が 1 ミクロン未満 ~ 約 200 ミクロンの幅である、請求項 2 のバイオセンサー。

【請求項 9】

前記光ファイバーの幅が約 10 ミクロン ~ 100 ミクロンである、請求項 8 のバイオセンサー。 40

【請求項 10】

前記結合対が、抗原と抗体との結合対、ヌクレオチドと抗ヌクレオチドとの結合対、酵素と受容体との結合対、炭水化物とレクチンとの結合対、または薬理学的分析物とポリマーとの結合対である、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 11】

前記抗原が、タンパク質、ペプチド、炭水化物、薬物または他の化学化合物であり、前記抗体は前記抗原に特異的かつ大きい親和性で結合することができる、請求項 10 のバイオセンサー。

【請求項 12】

前記生物学的マーカーが、タンパク質、ペプチド、RNA、DNAまたは炭水化物である、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 1 3】

前記結合対の第 1 のメンバーが、CtNT、CtnI、CRP、CK-MBまたはミオグロビンであり、そして前記結合対の前記第 2 のメンバーが、前記第 1 のメンバーに特異的に結合することができる抗体である、個体における心筋梗塞を検出するための請求項 4 のバイオセンサー。

【請求項 1 4】

前記受け取られたシグナルが最小反射率の波長である、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 1 5】

前記光学プローブはマルチモード光ファイバーを含む、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 1 6】

前記光学プローブは自己参照光学センサーを含む、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 1 7】

前記受け取られたシグナルが最小反射率の波長である、請求項 2 のバイオセンサー。

【請求項 1 8】

前記光学プローブはマルチモード光ファイバーを含む、請求項 2 のバイオセンサー。

【請求項 1 9】

前記光学プローブは自己参照光学センサーを含む、請求項 2 のバイオセンサー。

【請求項 2 0】

前記自己参照光学センサーは、傾斜した先端を含む、請求項 1 9 のバイオセンサー。

【請求項 2 1】

前記自己参照光学センサーは、空間的に隔てられた感知領域を含む、請求項 1 9 のバイオセンサー。

【請求項 2 2】

前記流体が、血液、脳脊髄液、粘膜、創傷組織、移植臓器、神経組織および関連する流体、または尿である、請求項 1 のバイオセンサー。

【請求項 2 3】

流体中の生物学的分子を検出するためのシステムであって、請求項 1 のバイオセンサーを含み、そしてそれぞれの前記プローブ表面からの最小反射率の波長を検出するための分光光学計と、前記波長間の差を計算するための手段とをさらに含むシステム。

【請求項 2 4】

個体から得られた組織マトリックスおよび関連する流体における生物学的分子を検出するためのインビトロ方法であって、

a . 請求項 1 のバイオセンサーを前記組織または関連する流体と接触させる工程；

b . 前記第 1 のシグナルを分光光学的に受け取る工程；

c . 前記第 2 のシグナルを分光光学的に受け取る工程；

d . 前記受け取られたシグナルの間における差を計算する工程；および

e . 前記計算された差を、前記生物学的分子を含有する基準組織から受け取られたシグナルと比較して、前記生物学的分子の存在を明らかにする工程を含むインビトロ方法。

【請求項 2 5】

組織マトリックスおよび関連する流体における生物学的分子を個体内において検出するためのインビボ方法であって、

a . 請求項 2 のバイオセンサーを前記組織内の選択された部位において埋め込む工程；

b . 前記第 1 のシグナルを分光光学的に受け取る工程；

c . 前記第 2 のシグナルを分光光学的に受け取る工程；

d . 前記受け取られたシグナルの間における差を計算する工程；および

e . 前記計算された差を、前記生物学的分子を含有する基準組織から受け取られたシグナルと比較して、前記生物学的分子の存在を明らかにする工程

10

20

30

40

50

を含むインビボ方法。

【請求項 26】

前記受け取られたシグナルが最小反射率の波長である、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

前記組織マトリックスおよび関連する流体が、血液、尿、脳脊髄液、粘膜、創傷組織、または移植臓器および関連する流体である、請求項 25 の方法。

【請求項 28】

前記バイオセンサーが、心臓トロポニン T (cTnT)、心臓トロポニン I (cTnI)、C - 反応性タンパク質 (CRP)、クレアチニンキナーゼ、心筋バンド (CK-MB) および心臓ミオグロビン (ミオグロビン) を含む群のメンバーに特異的に結合することができる抗体がその表面に固定化されているプローブ表面を含む、個体における心筋梗塞を検出するための請求項 25 の方法。

10

【請求項 29】

前記プローブ表面が前記個体の静脈に挿入され、測定が一定の期間にわたって繰り返される、前記個体の連続したインビボでのモニタリングを行うための請求項 25 の方法。

【請求項 30】

前記バイオセンサーが、CA15-3およびCA27-29を含む群のメンバーに特異的に結合することができる抗体がその表面に固定化されているプローブ表面を含む、乳ガンの存在について個体をスクリーニングするための請求項 25 の方法。

【請求項 31】

個体における生物学的分子の量をインビボで定量するための方法であって、請求項 25 の方法を含み、そして前記シグナルの観測された特性を、既知濃度の前記生物学的分子を有する生物学的溶液または組織および関連する流体から受け取られるシグナルと比較する工程をさらに含む方法。

20

【請求項 32】

前記生物学的マーカーを所定の期間にわたってその場で連続して観測するための請求項 25 に記載の方法で、前記バイオセンサーはその場に留めることができ、そして前記シグナルが前記期間にわたって繰り返し受け取られる、請求項 25 の方法。

【請求項 33】

医学的状態の治療をモニターするための請求項 32 の方法で、前記生物学的マーカーの存在が前記治療に応答して時間とともに変化する、請求項 32 の方法。

30

【請求項 34】

化学的薬剤を前記バイオセンサーからのシグナルに応答して前記その場に送達するための手段をさらに含む、請求項 33 の方法。

【請求項 35】

医学的状態の存在または非存在を示すマーカーの存在または非存在についてヒト被験体または動物被験体をモニターする方法であって、

a. マーカーに結合するために効果的である結合性メンバーが接着されている第 1 の表面を有する SPR プローブを提供すること；

b. 光路を第 1 の表面に提供すること；

40

c. プローブを被験体の体内または体表面の目的位置に設置すること；

d. 光を光路に沿って第 1 の表面に導くこと；

e. マーカーの存在または非存在の分光的表示のために、プローブから回収された光を観測すること

を含む方法。

【請求項 36】

工程 a) が、粒子をろ過により除き、マーカーの存在または非存在の分光的表示における当該粒子による妨害を避けるために適合したろ過用のハウジング表面を提供することが含まれる、プローブに対するハウジングを提供することを含む、請求項 35 のモニタリング方法。

50

【請求項 37】

工程 b) が、光ファイバー経路を含むカテーテルを提供することを含み、そして、工程 c) が、該カテーテルを用いてプローブを静脈内において所定位置に移動させることを含む、請求項 35 のモニタリング方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、医学的状态を検出する際に臨床的に有用であるタンパク質および他の生物学的関連マーカーをインビボおよびインビトロでモニターするための、光ファイバーに基づく埋め込み可能なバイオセンサーに関する。本発明のバイオセンサーは、観測中のマーカーに特異的に結合する親和性リガンドを 1 つ以上含む。インビボまたはインビトロでの連続したアッセイのために本発明のバイオセンサーを使用するための方法が提供される。バイオセンサーに対するハウジングが、細胞、そして体液の他の粒子状成分をスクリーニングするために提供される。本発明の重要な態様において、虚血および心筋梗塞の発症をインビボで直ちに検出およびモニターするための方法が提供される。創傷治癒をモニターするための方法もまた開示される。

10

【発明の背景】

【0002】

医学的診断のために有用な生物学的関連マーカーに対するインビボでのリアルタイムの連続した分析；臓器不全、臓器傷害または臓器拒絶の差し迫った危険性の評価；疾患の検出／経過；治療のモニタリング、および生物学的システムの重要な構成成分の発見をもたらす埋め込み可能なバイオセンサーが求められている。インビボおよびインビトロの両方で感知することが望まれる。

20

【0003】

心筋梗塞をインビボで検出および防止するためのバイオセンサーが求められていることは特に重要である。心臓疾患は合衆国における主要な死因の 1 つである。梗塞または虚血の迅速な確定診断を可能にする方法があれば、患者の管理が改善される。現在、患者は、胸の痛みを感じた後に病院に行き、様々な検査が、心臓の筋肉損傷を検出するために行われる。そのような検査には、心臓リズムを電氣的にモニターすること、そして、心臓損傷に対するマーカー（クレアチニンキナーゼおよび cTnT など）を検出するための血液サンプルの分析が伴う。心臓損傷が見出された場合、抗血栓溶解剤が、心臓遮断を除くために投与されるか、またはカテーテルによる処置が、遮断された血管を開通させるために行われる。心臓に対する著しい損傷を伴わない虚血事象を体験している患者の場合、カテーテルによる処置が、患部血管における開通を増大させるために使用されることがあるか、または使用されないことがある。この方法には、基本的な制限がいくつかある。第 1 に、無症状の梗塞事象および虚血事象を経験する大きな患者集団がいくつか存在している（これには、透析患者および糖尿病患者が含まれる）。心臓疾患に対する危険性が一般には高いこれらの個体の場合、心臓の事象を検出して処置することはほぼ不可能である。心臓疾患がそのような個体の主な死因である。これらの患者を連続的にモニターし、そして虚血または梗塞が発症した後できる限り早く警告を発することができる埋め込み可能なバイオセンサーは非常に有用であると考えられる。第 2 に、多くの患者が、不安定狭心症または虚血もしくは軽い梗塞の他の症状で入院するが、確定診断を可能にするために十分なマーカーを示していない。これらの患者は、一般に、最初の不安定狭心症を発症した後、まもなく重度の梗塞にかかる。これらの患者をモニターする方法により、梗塞が生じないようにするための介入治療が可能になる。仮説では、動脈斑における亀裂により、C 反応性タンパク質の放出を含む炎症応答が誘導されるということが唱えられている。通常的には最初の亀裂が形成された後 40 日以内～60 日以内ではあるが、生じた凝塊が虚血または梗塞の引き金を引くことがある。危険性のある患者におけるこれらの成分の存在を検出するための埋め込み可能なバイオセンサーは、著しい心臓損傷が生じる前に予防的措置を行うことを可能にすると考えられる。

30

40

50

【0004】

生物学的プロセスを高感度かつその場で (in situ) モニターするという目標を達成するために、バイオセンサーは、標的マーカー (研究発見のためのタンパク質またはタンパク質群、あるいは、糖、インテグリン、核酸またはペプチドなどの他の生物学的マーカー) に対して選択的で、かつ数 ng/ml の分析物がインビボまたはインビトロで感知可能で、かつ血流内でのインビボ感知のために血管に収まるために十分に小さいサイズでなければならない。光ファイバ - 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーは、これらの条件のすべてを満たす潜在的な可能性を有している。

【0005】

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分光法が、分析化学での適用 [1、2、3]、生化学での適用 [4、4、6、7]、物理学での適用 [8、9] および工学での適用 [10、11、12、13] における定量分析および定性分析のために用いられている。SPR センサー技術は、生体分子相互作用を直接的かつリアルタイムで観察する分野では主要な技術の 1 つになっている。

【0006】

SPR は、金属 - 誘電体表面での極めて小さい屈折率の変化を感知することができる。SPR 分光法は、SPR センサー / サンプル境界の約 200 nm 以内における $10^{-5} \sim 10^{-6}$ の屈折率 (RI) 単位の変化を感知することができる表面技術であるので、感知層に置かれた薄い有機薄膜の成長をモニターするためにますます一般的になりつつある [14、15、16、17]。0.01 nm ものわずかな平均的な薄膜堆積を、薄膜とバルク溶液との RI 差が 0.1 RI 単位であるときに検出することができる [14]。従って、水溶液 (RI=1.3) からの吸着したタンパク質様物質の亜単層 (RI=1.4) を容易に観測することができる。

【0007】

しかし、その最も単純な形態において、SPR は分析物特異的ではなく、その結果、表面に結合した分析物はどれも、SPR シグナルを誘導する。この特徴のために、生物学的プロセスをインビボで連続的にモニターするための SPR 技術の有用性が制限されている。特異性を SPR 方法に付与するために、直接的な結合バイオアッセイおよび競合的な結合バイオアッセイの両方がいくつかの結合対のために開発されている。これらのバイオアッセイにおいて、金属表面に固定化された特異的なリガンドに標的分析物が結合することにより、導波路技術を用いて読み取られる SPR シグナルが誘発される [14、18、19、20、21]。そのようなインビトロバイオアッセイのアッセイ感度は受容体 - リガンド系の結合定数に依存する。心筋梗塞の生物学的マーカー (すなわち、cTnT、CRP、CK-MB またはミオグロビン) を検出する場合、アッセイ感度は、梗塞が誘導される典型的な体内濃度を検出するために十分でなければならない。これは、cTnT では 0.15 ng/ml $\sim$ 0.5 ng/ml の程度であり、CRP では 0.1 mg/L $\sim$ 3.0 mg/L の程度であり、CK-MB では 0 $\sim$ 4.3 ng/ml の程度であり、ミオグロビンでは 15 ng/ml $\sim$ 30 ng/ml の程度である。しかし、生物学的流体におけるマーカーをインビボで連続的にリアルタイムでモニターする場合、結合対に基づくアッセイの感度は、生物学的流体における天然成分の非特異的な結合によって影響を受ける。

【0008】

マルチモード光ファイバーでの SPR 感知を用いることにより、薬理学的分析物、タンパク質および他のマーカーをその場で分析することに関して明かな様々な利点がもたらされる。SPR 分析の感度を抗体または他の特異的な受容体の選択性と組み合わせることにより、強力なセンサーシステムが得られる。SPR は表面技術であり、従って、血液マトリックスまたは生物学的流体が不透明であることは、センサーの検出限界に対する影響は最小限である。応答時間は早い。例えば、血中の鎮痛剤レベルを 1 分以内に測定することができる。SPR に関する検出限界は電力に依存しないので、低電力の光源および検出器を、センサーシステムのサイズおよび電力の要件を最小限にするために用いることができる。ファイバーセンサーは、カテーテル、センサーまたは静脈の性能を損なうことなくセンサーをカテーテル内に組み込むことができるようになり小さく (200 μ m 未満の直径に) することができる。センサー自体は再使用可能であり、オートクレーブまたは UV 照射の滅菌環境

10

20

30

40

50

に耐えることができる。分析物特異的な層は、標的適用のために市販の製造物で更新することができる。市販の抗体結合キットの範囲は、代替りの生物特異的な感知層としてのmRNAアプトマーおよび分子的インプリントポリマーの利用可能性がそうであるように、近い将来を通して拡大することが予想される。

【0009】

大きい特異性および感度で生体マーカーをインビボにおいてモニターするためにSPR表面技術を取り込むバイオセンサーが探し求められている。

【発明の要約】

【0010】

個体内の組織における生物学的マーカーをインビボで観測するための埋め込み可能なバイオセンサーが発見された。本発明のバイオセンサーは、観測中の生物学的マーカーに特異的に結合することができる結合性メンバーがその表面に固定化されている表面プラズモン共鳴（以下、「SPR」と呼ばれる）プローブ表面を含む。本発明のバイオセンサーはまた、埋め込まれたプローブ表面からのシグナルを受け取るための手段を含む。好ましくは、分光光度計が、プローブから受け取られた最小光強度の波長を測定するために提供される。バイオセンサーが埋め込まれた後（インビボ試験）において、またはバイオセンサーが、取り出された血液または生体液に浸けられた後（インビトロ試験）において、プローブ表面からの第1のシグナルを受け取るための手段が提供され、そして生物学的マーカーのその場でのプローブ表面への結合の存在下および非存在下におけるプローブ表面からの第2のシグナルを受け取るための手段が提供される。本発明の好ましい実施態様において、受け取り手段は2つの領域を感知ファイバー上に含む。これらの実施態様において、第1の領域は、表面に固定化された結合性メンバーを有さず、第1のシグナルを受け取り、そして第2の領域が、表面に固定化された結合性メンバーを有する。第1の受け取られたシグナルおよび第2の受け取られたシグナルの特性を比較して、生物学的分子の存在を明らかにするための手段もまた提供される。一般に、モニターされる流体は、血液、尿、脳脊髄液、粘膜、創傷組織およびその関連する流体、ならびに移植臓器を含む群から選択される。

【0011】

本発明のいくつかの好ましい実施態様において、バイオセンサーはマルチモード光ファイバーを含む。他の好ましい実施態様において、バイオセンサーは自己参照光学センサー（self-referencing optical sensor）を含む。自己参照センサーは、空間的に隔てられた感知領域を含むことができる。自己参照センサーは、傾斜した先端を含むことができる。

【0012】

本発明の重要な態様において、バイオセンサーは、プローブ表面に対するハウジングを含む。ハウジングは、組織の粒子状成分をプローブ表面との接触から排除することができる。このような排除により、粒子状成分の非特異的な結合が妨げられ、従って、これまでに知られていないSPRインビボ結合アッセイの感度が達成される。

【0013】

本発明において、観測中の生体分子は結合対の一方のメンバーであり、バイオセンサーは、結合対のもう一方のメンバーが固定化されているプローブ表面を含む。好ましくは、結合対は、抗原と抗体との結合対（この場合、抗原は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、薬物または他の化学化合物である）、ヌクレオチドと抗ヌクレオチドとの結合対、酵素と受容体との結合対、炭水化物とレクチンとの結合対、および薬理学的分析物とポリマーとの結合対を含む群のメンバーである。最も好ましくは、結合対は抗原と抗体との結合対であり、抗原は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、薬物または他の化学化合物を含む群から選択され、抗体は、抗原に特異的かつ大きい親和性で結合することができる。

【0014】

本発明の好ましい実施態様において、測定される生物学的マーカーは、タンパク質、ペプチド、RNA、DNAおよび炭水化物を含む群から選択される。本発明の好ましい実施態様に

において、バイオセンサーは、個体における心筋梗塞を検出することができる。これらの実施態様において、結合対の第1のメンバーは、心臓トロポニンT (cTnT)、心臓トロポニンI (cTnI)、C反応性タンパク質 (CRP)、クレアチニンキナーゼ心筋バンド (CK-MB) および心臓ミオグロビン (ミオグロビン) を含む群から選択され、前記結合対の前記第2のメンバーは、前記第1のメンバーに特異的に結合することができる抗体である。

【0015】

本発明の他の好ましい実施態様において、バイオセンサーは、治癒中の創傷と非治癒性創傷とを識別するために、組織における創傷治癒の進行をモニターすることができる。これらの実施態様において、生物学的マーカーは、非治癒性創傷部のインターロイキンおよびマトリックスプロテオラーゼおよび他の成分を含む群から選択され、抗体は、そのような生物学的マーカーに特異的かつ大きい親和性で結合することができる。

10

【0016】

本発明の重要な態様において、個体内の組織/流体マトリックスにおける生物学的分子を検出するための方法が提供される。この方法において、本発明のSPRバイオセンサーは組織マトリックス内の選択された部位に埋め込まれる。インビトロ適用の場合、プローブは、モニターされる流体サンプルの中に置かれる。第1のシグナルが、SPRプローブが組織または流体と接触した後、SPRプローブ表面から受け取られる。第2のシグナルが、プローブ表面に固定化された結合性メンバーと、観測される分子 (すなわち、目的とする生物学的マーカー) との間で結合が生じた後、一定期間においてプローブ表面から受け取られる。好ましくは、これらのシグナルは、最小反射率でのスペクトルグラフ的に受け取られた波長値である。いくつかの実施態様において、2つ以上のプローブを、モニターされるサンプルと接触させることができる。これらの実施態様において、各プローブは、目的とする特定の生物学的マーカーに対する結合性メンバーを含むことができる。好ましい実施態様において、感知用ファイバープローブにおける2つの領域が提供される。第1の領域は、目的とする分析物と結合する化学種が表面に固定化されていない。第2の領域は、目的とする分析物と結合する化学種が表面に固定化されている。シグナルは、サンプルから受け取られた最小屈折率の波長を記録する分光光度計によって受け取られる。生物学的分子の存在を明らかにするために、シグナル間の差が計算され、生物学的マーカーを含有する比較基準の組織/マトリックスから受け取られたシグナルと比較される。この方法は、シグナルの観測された特性を、既知濃度での当該分子の生物学的溶液から受け取られたシグナルと比較することによって、個体におけるインビトロまたはインビボでの生物学的分子の量を定量するために使用することができる。

20

30

【0017】

本発明の方法は、血液、脊髄液、粘膜、創傷組織、移植臓器および尿を含む群から選択される組織/マトリックスにおける生物学的分子を検出するために使用することができる。様々な方法が、所定の期間にわたって生物学的分子を連続的にその場で観測するために提供され、この場合、バイオセンサーは、前記期間にわたってその場に留めることができる。これらの方法は、医学的状態の治療をモニターするために特に重要であり、この場合、生物学的分子は、当該治療にตอบสนองして時間とともに濃度が変化するマーカーである。

【0018】

本発明のこれらの態様および他の態様は、下記の詳細な説明および添付された図面を参照したときに明らかになる。

40

【発明の詳細】

【0019】

本発明は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定によって個体の流体マトリックスにおける生物学的マーカーを検出するための光ファイバーバイオセンサーに関する。SPRは、一般には、薄い薄膜を特徴づけるために、そして金属界面における過程をモニターするために使用されている。SPRは、非常に様々な光学的方法とともに利用され得る光学センサー技術である。本発明では、SPR感知技術が、親和性に基づく薄い薄膜に由来する屈折率 (RI) 、および目的とする分析物とのその場での反応の後におけるRIの変化を測定するために

50

使用される。この技術はHomola et al.[22]によって記載されている（その詳細は参考として本明細書中に組み込まれる）。

【0020】

SPR効果が図1に概略的に例示される。表面プラズモン波を励起させる光子が光ファイバーに完全に含まれる。光子が光ファイバーの境界で完全内部反射を受けるとき、光子のエバネッセント場が50nm厚の金属の中に広がる。このエバネッセント場により、その後、電子の定常電荷密度波（表面プラズモン波）が金-サンプルの境界におけるセンサー表面に沿って励起される。整合化条件がちょうど正しい場合、表面プラズモン波はサンプルとカップリングし、光子が溶液内に伝搬する。その結果、カップリングしている表面プラズモン波を励起させるためのまさに適正な波長における光子は、ファイバーに沿って継続せず、反射して検出器に戻る。従って、金-サンプルの境界における屈折率は、センサーからの最小帰還光の波長に相関し得る。

10

【0021】

埋め込み可能なバイオセンサーにおいてSPR技術を用いることに関して得られる利点は3つある。第1に、SPR分光法は、低い光レベルを用いて正確に行うことができる。量的情報は、反射の強度ではなく、最小反射の波長に存在するので、光の強度はセンサーのダイナミックレンジに影響を与えない。さらに、低い光レベルを使用することによって、レーザーを用いた場合などのファイバー先端における加熱が問題にならない。第2に、SPR分光法は、組織および血液で遭遇する場合などの非常に複雑で不透明な溶液において行うことができる。光子はファイバーから決して離れず、そしてカップリング波長はサンプルの吸収に影響されない。第3に、血栓形成を妨げるためのセンサーのコーティングはその有用性を損なわない。光子は光ファイバーから決して離れないので、感知領域が不透明な抗血栓形成防止物質でコーティングされたとき、光学的透過性が弱くならない。

20

【0022】

図2は、埋め込み可能なSPRプローブ先端、およびSPRシグナルがプローブ先端から受け取る手段を示す、本発明のマルチモード光ファイバーSPRセンサーの概略図である。センサーのデータを集め、処理するための好適な手段である分光光度計が例示される。SPRシグナルは、光波長を関数とする、センサーから戻る光強度の形態である。表面共鳴に対応する光の波長により、戻った光スペクトルにおける最小値が示される。SPRスペクトルの校正が、センサーからの最少光帰還の波長を溶液中の分析物の屈折率（または濃度）に関連づけることによって行われる。これには、正規化されたスペクトルの最小値の正確かつ信頼できる評価が必要である。マルチモードSPRセンサーは、多変量校正方法が用いられたとき、平面プリズムセンサーと同等に性能を発揮し得ることが明らかにされている[23]。より近年には、別の多変量校正モデルが、モデルの正確性と校正の容易さとの間における最良のバランスを決定するために調べられている[24]。マルチモードファイバーセンサーを用いて集められるようなSPRスペクトルの幅は、多変量校正方法が用いられたときには、センサーを正確かつ確実に校正する能力を損なわないことが発見されている。本発明の好ましい実施態様において、マルチモードファイバーセンサーが用いられる。

30

40

【0023】

本発明の好ましい実施態様において、光ファイバープローブの遠位側端部は、SPRバイオセンサーのダイナミックレンジを変化させ、そしてSPRバイオセンサーの感度を増大させるために改変されている。マルチモード光ファイバーセンサーの場合、センサー表面に衝突する光の角度分布がファイバーのコアおよびクラッドの屈折率によって決定される。所望する光角度が、ファイバーの先端を改変することによって選択される。ファイバープローブの遠位側端部を選択的に傾斜させることによって、共鳴波長が100nm以上赤方偏移し、そして30nm以上青方偏移する。これは、利用可能な屈折率のダイナミックレンジを増大させることによって、そして共鳴を検出器の最も高感度な領域に偏移させることによ

50

て、白色光SPRセンサーの柔軟性の増大をもたらす。改変された先端の場合、感度は、1単位の屈折率(RI)変化あたりの波長変化で測定されたとき、6倍増大している。

【0024】

本発明のバイオセンサーは、SPR活性の多数の波長を同じプローブで同時に検出し、従って、SPRスペクトルの情報含有量を増大させる。本発明の光ファイバーSPRセンサーでは、従来のSPRセンサーとともに用いられる平面プリズム幾何構造の従来の制限が都合良く除かれる。本発明の光ファイバーバイオセンサーでは、分析物に依存しないサンプル変化(すなわち、サンプルの温度および密度)がSPRセンサーの定量能に対して有する影響を軽減するためにファイバーをコーティングすることによる「二重共鳴」という特徴が利用されている。

10

【0025】

本発明の目的の1つは、現場使用のためのような、取り出された流体におけるインピボまたはインピトロでのその場での分析のために、小さい安価な光ファイバー型SPRバイオセンサーを提供することである。従来のSPRセンサーとともに用いられる平面プリズム幾何構造にとって代わるマルチモード光ファイバーを用いる小さい携帯型SPRセンサーシステムのバイオセンサーが提供される。光ファイバーの感知プローブにより、他の幾何構造では利用できない小さいシステムでの信頼できる分析、例えば、静脈内での分析が可能になる。ファイバーはサファイアまたはシリカであり得るが、好ましくはシリカである。全体的なフットプリントおよび出力の要件は、装置の現場使用を可能にするために十分に小さい。いくつかの実施態様において、医師/患者は装置をそのベルトに携帯することができる。図3には、装置(センサーおよびシグナル処理)が例示される。この装置の大きさはおよそ9"X6"X3"(すなわち、タバコ箱のほぼ内寸)である。

20

【0026】

静脈内目的のためのバイオセンサーは、循環系または他の選ばれた組織部位の中に挿入するためのカテーテルに取り付けられるために十分に小さくしなければならない。これらの適用において、バイオセンサーは、体外からシグナルを受け取り、伝えるためにカテーテルに沿ってなぞられる1本の光ファイバーケーブルを含む。この光ファイバーケーブルの直径は、好ましくは、約200 μ m~50 μ mの間である。

【0027】

小型かつ低電力の分光光度計がセンサーに付随する。小型化のために、分光光度計は、埋め込まれた光源およびシリコンフォトダイオード検出器アレイとともにシリコンチップ上に微細加工され得る。市販の卓上型分光光度計を使用することができる。サイズ、重量および電力消費について最適化されている「最小」の光度計が提供される。

30

【0028】

SPRは、小さいフットプリントの低重量システムであるように構築される。白色発光ダイオード(LED)により、SPR測定を容易に行うために十分な強度を有する安定した低電力の光源が提供される。いくつかの実施態様において、LEDは電池を電源とすることができる。白色LEDは、9Vの家庭用電池による100時間を超える連続使用について安定している。二又シリカ-シリカファイバーの一方の脚により、光がSPRプローブ先端に搬送される。二又ファイバーの端部は、SPR分光計に対するプローブ/シリンジサンプリングシステムの容易な取り付けを可能にするSMA型コネクタの中にある。センサー先端からの反射光が、二又ファイバーの第2の脚の終端における分光計によって分析される。高分解能のデータが、インピボまたはインピトロにおけるそれぞれのアッセイを正確かつ確実にモニターするための分光的および時間的なデータの最少要件を突き止めるために用いられる。

40

【0029】

検出器は、市販のカメラに由来する画像化素子であり、例えば、630nmにおいて1mmあたり1800本の溝を伴うホログラフィック回折格子を有する、Andor technologyから得られるCCD(電荷結合デバイス)などである。回折格子に対する波長範囲は、ハンドスキャンデバイス(YJ inc.)とともに選択され、これらの部品に対するハウジングがSPEX 270Mである。波長分解能が、12cmのパス長のスペクトルグラフを用いて達成される。スペクトルの収

50

集および解釈は、コンピューターに導入されたソフトウェアで行うことができる。現場使用において、コンピューターは携帯型ラップトップであり得る。サイズおよび電力の要件をさらに最小限にするために、光学縦列を、CMOS型センサーをデータ収集のために用い、そして単純化されたデータ制御ルーチンおよびデータ分析ルーチンをセンサー電子素子に埋め込むことによって単純化することができる。SPRプローブの感知領域における光ファイバーをシリカまたはサファイアのいずれかから構築することができる。そのようなファイバーの幅は、好ましくは、サブミクロンの大きさから約200ミクロンである。シリカおよびサファイアのファイバーはともに生体適合性材料であり、シリカの方が柔軟性があり、サファイアの方が耐久性がある。SPRセンサーのために利用可能なRI範囲はファイバー先端の材料および幾何構造の関数である。感知領域は、クラッドをファイバーから除き、50nm厚の金層を蒸着することによって規定される。その後、約50nm~100nmの間の厚さのデキストラン層が金上に被覆される。目的とする抗原に対する抗体がデキストラン上に固定化され、これにより、抗体/抗原の結合を感知することができる領域が得られる。この感知域により、抗体の結合、およびプローブが浸けられている生物学的流体の屈折率によって影響を受けるSPRスペクトルがもたらされる。金被覆およびデキストランを有するが、抗体を有しない感知域は、プローブが浸けられている生物学的流体の屈折率によってのみ影響を受けるSPRスペクトルをもたらす。抗体が結合したことによるシグナルを、その後、これらの2つにスペクトルの間における差として取り出すことができる。

10

【0030】

サファイアのファイバーは、シリカのファイバーが担持し得るよりもはるかに厚いデキストラン/抗体/抗原層を担持することができる。より厚い層の利点は、プローブの検出容積内における抗体結合部位の増大した数であり、これは、センサーのより良好な検出限界およびより大きいダイナミックレンジをもたらすはずである。また、厚いデキストランヒドロゲルは、汚れ、ヒドロゲル表面における非特異的な結合、および血液マトリックスの光学密度の変化によるRI変化から検出容積を部分的に保護するはずである。

20

【0031】

プローブ表面を作製するために、クラッドがファイバーの先端から1cmの部分で除かれる。2nmのクロム層が、露出したファイバー先端にスパッターコーティングされる。クロム層はSPRスペクトルに対してほとんど影響を及ぼさないが、その後の50nmの金層を接着を確実にするためには必須である。金層により、共鳴している表面プラズモンが維持される。表面プラズモンの光学的特性はセンサーの200nm以内の溶液のRIとともに変化する。RI変化の必要な感度および選択性を達成するために、抗体が固定されたデキストランの層が、金表面にチオール結合により結合させられる。

30

【0032】

プローブ表面を調製するために、光ファイバーのクラッドおよびバッファーが、約5mmの感知領域を露出させるためにファイバーから除かれる。バッファーの一部が、使用時のファイバーの先端を保護するために戻される。多数の感知領域をこの様式で組み込むことができる。従って、1つの感知領域を参照として用い、そしてそれ以外の感知領域をサンプリング表面として用いることが可能である。サンプリング表面は、研究される分析物に対して特異的な、親和性に基づく反応性薄膜でコーティングされる。心筋梗塞センサーの場合、親和性に基づく薄膜は、ミオグロビン、CRP、CK-MBまたはcTbTもしくはcTnIに対して特異的な固定化抗体から構成される。両方の表面からのシグナルを、リアルタイムのその場での分析のために同時に受け取り、分析することができる。

40

【0033】

短い光ファイバーSPRプローブのデジタル写真が図3bに示される。この実施態様において、プローブの末端は、センサーシステムに対する容易な取り付けおよび取り外しのためのSMT型の光ファイバーコネクタに接続される。

【0034】

自己参照SPRセンサー

2つの感知域を伴う光ファイバーSPRセンサーは、非特異的な結合または塊状サンプル

50

の屈折率変化がセンサーの性能に対して有する影響を最小限に抑える潜在的能力を有している。参照プローブが溶液にない場合、RIの観測された変化が、実際に、標的抗体 - 抗体の相互作用、センサー表面の汚れ、または温度変動に由来するバルクマトリックス作用の結果であるかどうかを決定することは不可能である。参照センサーが用いられるとき、何らの非特異的結合またはバルク作用が両方のセンサーに同一の影響を及ぼすことが仮定される。従って、2つのセンサーにおけるシグナルの差は、直接、標的分析物のためであると考えられる。しかしながら、2つの離れた光ファイバーセンサーが用いられる場合、プローブのサイズが著しく増大する。代替りの方法は、両方の感知域を同じ光ファイバーに設置することによって自己参照プローブを構築することである。本発明の好ましい実施態様において、2つの感知域を有する自己参照光ファイバープローブが提供される。1つの実施態様において、クラッドおよびバッファの空間的に隔てられた2つの区域が光ファイバーから除かれる。この実施態様が図4に示される。2つの離れた感知領域は、抗体結合プロセスのときに異なるように処理することができる。抗体が一方の感知領域から除かれるか、または抗原に対して非反応性にされる場合、一方の領域が環境の変化に対する応答（非特異的な結合）のみをもたらし、その一方で、もう一方の領域が、環境の変化および抗原の濃度に対する応答をもたらす。多変量校正方法では、これらの2つのスペクトル情報源が用いられる。他の好ましい実施態様において、ファイバーの先端が補角で傾斜させられる。ファイバーを傾斜させることにより、傾斜した感知領域に対するSPRスペクトルが赤方偏移する。これが図5に例示される。反射スペクトルにおけるより小さい（青色側の）波長極小値は、ファイバープローブの非先細り部分におけるRIとともに変化し、その一方で、より大きい（赤色側の）波長低下は、プローブの傾斜した先端におけるRIとともに変化する。先細りの程度により、これらの2つの低下の間における隔たりが決定される。傾斜プローブの利点は、能動的な感知領域と参照用感知領域との間におけるより大きな程度の波長分離が達成されるということである。直線型プローブの場合、スペクトル分離は、抗体が存在することに由来するRI差に基づいて達成されるだけである。傾斜プローブの場合、このスペクトル分離はまた、傾斜した領域の自然の結果としての赤方偏移によっても増強される。

【0035】

本発明の重要な態様において、ハウジングが、プローブ先端表面の汚れを防止するために提供される。ハウジングは、バイオセンサープローブ先端の表面の周りに位置し、SPRセンサーを細胞の妨害から保護する。ハウジングは、流体が流れることができるが、細胞および他の懸濁された粒子がそのサイズのために通過することができない1つ以上の流路を含む。従って、標的分析物は、この流路を容易に通過して、センサー上の特異的な受容体と結合することができるが、細胞は、この流路を通過することができず、センサーと相互作用することができない。競合的な免疫アッセイを含むそのような実施態様において、合成された分析物分子を、大きい非反応性分子に共有結合的に結合させ、ハウジングの内部に取り付けることができる。これらの取り付けられた分子は、センサー上の受容体との結合について、血液により運ばれる分析物と競合し得る。ハウジングは一辺が約100 μm である。すなわち、ハウジングは、埋め込み用デバイス（一般にはカテーテル）の中に合わせるために十分に小さいが、光ファイバーセンサーの周りに合わせるためには十分に大きい。

【0036】

センサーは、細胞 - センサー相互作用およびタンパク質 - センサー相互作用を最小限にするために、生物活性が低い材料でコーティングされる。この生体適合性コーティングにより、埋め込まれたセンサーに対する長期間の有用な寿命が可能になる。

【0037】

センサーハウジングの構築

本発明の技術の感度は、反応性プローブ表面に対する非特異的な結合によって低下する。本発明のバイオセンサーでは、目的とする分析物に対する非常に特異的な結合性メンバーを選択することによって特異性が達成されるが、非特異的な結合はバックグラウンドシグ

ナルを大きくし、アッセイの感度を低下させる。懸濁された粒子状成分は非特異的な結合の主要な原因である。例えば、血液は、妨害の原因となる赤血球および白血球を含有する。

【0038】

ほぼすべての埋め込まれた生物医学的なデバイスおよび材料は、最終的には、身体によって拒絶される。身体との望ましくない相互作用を最小限に抑え、かつ体内におけるセンサー寿命を最大にするために、センサーハウジングおよび光ファイバー上の感知領域は、生物活性が低い材料でコーティングされる。センサーハウジングは、それ自体が、生物活性が低いポリマーであるPDMSから作製される。センサーハウジングは、酸化されたデキストランで官能化およびコーティングされ、これにより、その表面が非常に生体適合性にされ、その結果、センサーハウジングにおける汚れ、非特異的なタンパク質相互作用、および炎症応答の開始を排除または最小限にすることができる。パリレン-Cを用いた表面処理もまた、生物活性が低い表面をもたらす。生体適合性をさらに改善するために、パリレンはまた、生物活性が低いポリマーまたは糖または他の分子でコーティングすることができる。金のコーティングをハウジングに直接施すことができ、そして生物活性が低いポリマーまたは分子または糖をこのコーティングに付けることができる。汚れ、非特異的な結合、および炎症応答の開始を最小限にし、そして体内におけるセンサー寿命を改善するために、多くの他のポリマーおよび表面コーティング剤（ヘパリンなど）をハウジング内またはハウジング表面に付けることができる。感知領域自体もまた、汚れ、特異的な結合を受けやすく、免疫応答に対する触媒であり得る。光ファイバーの金感知領域におけるデキストランコーティングは、これらの作用を最小限に抑えるように作用する。多くの他の材料（ポリエチレングリコールなど）を、センサー部位における非特異的な結合を最小限に抑えるために使用することができる。これらの表面処理は、センサーの埋め込まれた寿命がおよそ2週間～3週間から数ヶ月程度の時間枠にまで増大させられ得る方法の例である。センサー自体における生体適合性分子領域のハウジングおよびデキストランまたは他のポリマーまたは糖の化学的処理もまた、埋め込まれた寿命を延ばすために使用することができる。酸化された表面、および表面の親水性を改善するプラズマ処理による表面を、拒絶を最小限に抑えるために適用することができる。

【0039】

従って、ハウジングが、流体マトリックスにおいてその場で遭遇する粒子状成分との接触からバイオセンサーの反応性プローブ先端を保護するために提供される。ハウジングは、より大きい粒子のプローブ表面への通過を妨げるが、可溶性成分、具体的には、目的とする分析物の通過を可能にするための小さい孔を伴って設計される。

【0040】

ハウジングは、エラストマー、好ましくは、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、Dow Chemical Companyから得られる二部エラストマーを含む。ハウジングは、好適な大きさのポストの繰り返しパターンを有するフォトレジスト鋳型におけるフォトリソグラフィによって形成される。エラストマーが鋳型から剥がされたとき、微細な穴を有する薄膜が生じる。薄膜の形態は、2つのプラズマ処理された表面の不可逆的な結合を可能にするための高周波（rf）酸素プラズマで薄膜を処理することによって、プローブ先端の周りにハウジングを形成させるために改変される。

【0041】

実験セクション

ハウジング製造手順：

ハウジングは下記のプロセスによって製造される。

1. フォトリソグラフィーマスクの製造
2. SU-8フォトレジスト鋳型の製造
3. PDMSメッシュを剥離するための鋳型の処理
4. PDMSメッシュの回転塗布
5. 生体適合性を改善するためのPDMS表面の処理

10

20

30

40

50

6. 好適な形態へのPDMSメッシュの形成および光ファイバープローブへの取り付け。

【0042】

フォトリソグラフィーマスクの製造：

フォトリソグラフィーを使用する材料のパターン化にはマスクが必要である。約50μmまでの形態サイズの場合、Adobe Illustratorで作製され、5080dpiのプリンター解像度で印刷されたマスクが提供される。標準的なIC製造において一般的に使用されているようなクロムマスクを、サブミクロンレベルでの形態サイズを作製するために使用することができる。50μm～10μmの間の形態サイズの場合、ガラスエマルジョンマスクが必要である。10μm未満の形態サイズの場合、クロムマスクが必要である。生物学的な流体および組織における小さい粒子を排除するための本発明のハウジングの場合、形態サイズは、最適には約5μmである。例えば、赤血球は直径が5ミクロン～10ミクロンである。穴をサブミクロンにするために現代のフォトリソグラフィーを使用することは可能である。

【0043】

SU-8フォトレジスト鑄型の製造

露出したSiウエハーは、約1インチ四方の正方形であるクーポンに切断される。接着促進剤のヘキサメチルジシラザン（HMDS）が4000rpmで約30秒間回転塗布される。SU-8（微小流体力学デバイスの製造において一般的に使用されている市販の濃厚な薄膜フォトレジスト（Microchem、Newton、MA））が提供される。厚さが約20μmである薄膜を得るために、SU-8が1000rpmで約30秒間回転塗布される。ウエハーは65℃で約3分間ベーキング処理され、その後、95℃で約1時間ベーキング処理される。冷却後、ウエハーは、130mW/cm²の強度で30秒間、透明画マスクを使用してKarl Sussアライナーで感光される。ウエハーは再び、65℃で約3分間ベーキング処理され、その後、95℃で約1時間ベーキング処理される。構築物はSU-8現像機で約30秒間現像され、そして白色残渣が現れるまでイソプロパノール中で洗浄される。現像工程および洗浄工程は、それ以上の白色残渣が現れなくなるまで繰り返される。その後、構築物は200℃で1時間ベーキング処理される。

【0044】

図6は、フォトリソグラフィーを使用してシリコンウエハー上にSU-8フォトレジストから作製された鑄型のSEM（走査電子顕微鏡）像である（19倍の倍率）。ポストは高さが約25ミクロンであり、直径が約80ミクロンである。（5080dpiで印刷された）透明画が、この鑄型を製造するためのマスクとして使用された。しかし、エマルジョンマスクまたはクロムマスクを使用して、それぞれ、10ミクロンまでの形態サイズまたは5ミクロンまでの形態サイズを達成することができる。

【0045】

PDMSメッシュを剥離するための鑄型の処理

シリコンウエハーは、薄膜への回転塗布の前に、PDMSが露出シリコンに付着することを防止するためにコーティングされる。好ましくは、表面は金でコーティングされるが、フッ素化およびクロムコーティングもまた適用することができる[31、32]。

【0046】

PDMSメッシュの回転塗布

好適な大きさの構造体が、PDMSを鑄型に回転塗布し、一般には約1000℃で15分間硬化させ、そして剥離することによって、PDMSで製造される。これらの方法はJackmanによって開示されている（Jackman, R.J. et al., "Using Elastomeric Membranes as Dry Resists and for Dry Lift-Off: Langmuir, 1999, 15:2971-2984）（これは参考として本明細書中に組み込まれる）。穴を薄膜に生じさせるフォトレジストポストよりも薄いPDMS薄膜の厚さを維持することは、このプロセスにおけるこの態様の本質的な態様である。

【0047】

生体適合性を改善するためのPDMSメッシュの処理

PDMSメッシュは、PDMSメッシュを生体適合性にし、かつインビボでの組織との反応を特異的に防止するために処理される。好ましくは、ポリマーはアンモニアプラズマで処理される。この処理の結果として生じる一級アミン基は、酸化されたデキストランに対する結

合部位として役立つ[33]。デキストランによるコーティングは生体適合性を改善する。

【0048】

パリレンコーティングによるハウジング表面の化学的修飾を、細胞がセンサーハウジングに結合しないように、そして細胞が流体流通ポートを詰まらせないようにするために使用することができる。パリレンがセンサーコーティング剤であるとき、パリレンに対する化学的修飾およびその後の非生物活性化学種のグラフト化が望まれる。遠隔マイクロ波酸素プラズマまたはUV照射を使用して、パリレンにおける表面アルデヒドおよびカルボン酸基の形成が誘導されている[34]。これらの化学種は、生物活性が低い化学種をパリレンにグラフト化するために使用することができる。生物活性が低い表面をハウジングに提供するための代替の技術には、金属を蒸着し、その後、生物活性が低い標的分子を表面に結合させるためにチオール連結技術を使用することが含まれる。固有的に非生物活性な他の化学種もまた考慮され得る。これらは、細胞-ハウジングの相互作用を除くためにさらなる加工を必要とし得るか、または不要とし得る。

10

【0049】

ハウジングの光ファイバーへの取り付け

PDMSメッシュは、接触したときに相互に反応する-OH基の形成を生じさせる高周波(rf)酸素プラズマで処理される。この現象は、2つのプラズマ処理されたPDMS表面の不可逆的な結合を生じさせるために使用することができる。PDMSメッシュは、プラズマ処理を使用してメッシュの形態を改変することによって光ファイバーに取り付けることができる。例えば、PDMSのリングを光ファイバーに印刷し、その後、プラズマで処理することができる。これらの処理されたリングはPDMSメッシュの処理された表面と接触させられ、ファイバーの周りにおけるハウジングの結合がもたらされる。あるいは、PDMSメッシュの反対側の表面を処理し、そのメッシュでファイバーの周りを包み、処理された表面を接触させることができ、これにより、表面が相互に接着させられ、ハウジングをプローブ表面の周りに形成させることができる。

20

【0050】

図7は、高周波(rf)酸素プラズマによる処理により自身に接着したポリジメチルシロキサン(PDMS)薄膜のSEM像である(16倍の倍率)。処理条件は、70Wの出力で10秒間、120mtorrの圧力での50sccmのO₂であった。接触したとき、薄膜の端が相互に不可逆的に接着した。

30

【0051】

SPRプローブを用いた親和性型アッセイ

本発明において、従来の光ファイバー型SPRセンサーが、目的とする分析物に対する親和性を有するリガンドを含む薄膜でプローブ先端をコーティングすることによって改変されている。小型化されたバイオセンサーは、個体の組織に、例えば、生物学的マーカーに関連するシグナルをバイオセンサーがその場で生じさせる組織に、カテーテルによって埋め込むことができる。SPR分析の感度を抗体または他の特異的な受容体の選択性と組み合わせることにより、強力なセンサーシステムがもたらされる。プローブ先端は、組織部位において標的の生物学的分子に選択的に結合することができる固定化された分子を含む。固定化された分子と標的のマーカー分子とにより、結合対が構成される。

40

【0052】

本発明の親和性型SPRバイオセンサーにおいて、競合的Elisa法およびサンドイッチElisa法などの従来の結合アッセイを、標準的なElisaシステムにおいて従来から使用されている標識された分子を使用することなく用いることができる。従って、本発明の親和性型SPRバイオセンサーにより、親和性技術がその場での分析に拡張される。その有用性は、生物特異的な相互作用のリアルタイムでの連続した分析を可能にする親和性バイオセンサーとしてである。

【0053】

親和性アッセイのための光学プローブ表面の調製

図3bに写真で示されるセンサーに類似する光ファイバーセンサーが、クラッドおよび

50

バッファーをファイバーから5mmの長さで取り除くことによって調製された。ファイバーは、油脂を表面から除くために、高温の30%過酸化水素および硫酸からなる「ピラニア液」で清浄化された。その後、ファイバーは、2nmのクロムおよび50nmの金がスパッターコーティングされた。

【0054】

デキストラン層を、抗ミオグロビン抗体を結合させるための担体を提供し、かつセンサー表面に対するミオグロビン（または他のタンパク質）の非特異的な結合を防止するために、金表面に結合させた。11-メルカプトドデカノールの自己集合単層（SAM）を、5mM溶液に浸けることによって金表面に堆積させた。その後、この単層を、5%ジグリシンおよび50% NaOH（0.4M）におけるエピクロルヒドリンの0.6M溶液と反応させる。その後、デキストランT500をSAMのアルコール末端に共有結合的に結合させた。デキストラン上のヒドロキシル基をプロモ酢酸でカルボキシル化し、その後、EDC/NHS（N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドHCl/N-ヒドロキシスクシンイミド）の混合物で活性化した。これにより、反応性のN-ヒドロスクシンイミドエステルがデキストラン層に生じ、センサー表面が様々な抗体固定化化学反応のために準備される。多くの結合化学反応を使用することができるが、本発明者らは、抗ミオグロビンを官能化デキストラン層に固定化するためにアミンカップリング法を使用している。

10

【0055】

センサーに対する非特異的なタンパク質結合を排除することが必要とされる場合、チオール末端のポリエチレングリコールまたは他の材料を使用して、光ファイバーセンサーの表面を修飾することができる。PEGが、人体内の埋め込みのために米国食品医薬品局によって承認されている。表面に固定され、水性環境にさらされるPEG分子は非常に水和され、大きな排除容積を示す。この性質により、PEGは、溶解タンパク質が十分に近くまで表面に接近して付着することを妨げることによって、表面へのタンパク質の吸着を阻害することができる。メトキシ-PEG-チオールがFluka Fine Chemicalsから市販されている。これは分子量が5000である。このポリマーは、金-チオールの結合によって光ファイバーの金表面に結合させることができる。このポリマーはまたデキストランにも結合することができる。スキームにおいて、センサーを取り囲む固定化されたPEGは、受容体-リガンドの特異的な相互作用を可能にしながら、表面との非特異的な相互作用を妨げる。

20

【0056】

固定化されたPEGまたは別のコーティングの存在は、表面に対する非特異的なタンパク質結合を妨げるが、SPRシグナルにも影響を及ぼす。上記で議論されたように、SPRシグナルは、標的分析物の結合の存在下または非存在下における、表面に結合した化学種の分子量的変化によって決定される。

30

【0057】

本発明の重要な態様において、生物学的分子のインビボにおけるリアルタイムでの測定のための様々な方法が示される。そのような方法において、臨床的に重要な生物学的マーカーである分子を、疾患の進行または治療の有効性を追跡するために連続的にモニターすることができる。

【0058】

図8は、ヒトミオグロビンをその場でモニターするために光ファイバーSPRバイオセンサーを使用する本発明の方法の例示である。ミオグロビンは、結合対の一方のメンバーであり、この例示における目的とする生物学的分子である。結合対のもう一方のメンバーは、バイオセンサーのプロブ表面に固定化されている抗ミオグロビンである。操作において、プロブが組織/生物学的流体マトリックス内に置かれ、その場に留められた後、RIシグナルがプロブ表面から受け取られる。SPR波長の偏移（ナノメートル）が一定期間にわたって測定される。固定化抗ミオグロビンに対するミオグロビンの結合が、一定期間の後における増大した偏移で示される。究極的には、それ以上の結合が生じない定常状態が達成される。

40

【0059】

50

この方法は、結合対の一方のメンバーがブローブ先端表面に固定化されているとき、結合対のもう一方のメンバーである任意の生物学的分子をインピボまたはインピトロで測定するために使用することができる。好ましくは、結合対は、抗原と抗体との結合対（この場合、抗原は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、薬物または他の化学化合物である）、ヌクレオチドと抗ヌクレオチドとの結合対、酵素と受容体との結合対、炭水化物とレクチンとの結合対、および薬理学的分析物とポリマーとの結合対を含む群のメンバーである。最も好ましくは、結合対は抗原と抗体との結合対であり、抗原は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、薬物または他の化学化合物を含む群から選択され、そして抗体は、そのような抗原に特異的かつ大きい親和性で結合することができる。

【0060】

分析物の分子量が大きくなるほど、固定化された結合性メンバーに分析物が結合したときのSPRシグナルの変化が著しくなる。図9は、センサーからシグナルを生じさせる反応の概略図である。デキストランがコーティングされ、かつ抗体が固定化されたセンサーは、デキストラン層および抗体層の表面被覆および厚さの関数であるSPRスペクトルを示す（図9a）。ある濃度の標的タンパク質にされされたとき、タンパク質の一部が、結合対に対する親和性定数に基づいて抗体に結合する。これはSPRセンサーの表面性状を変化させ、そして図9bに示されるように、抗原濃度に比例するSPRスペクトルの偏移が観測される。遊離抗原の集団が除かれると、すなわち、心臓事象の後では、結合していた抗原がセンサー表面から離れるように分配される。そのとき、図9cに示されるように、SPRスペクトルのその最初の形態への復帰が観測される。

【0061】

分析物の分子量は、感知において重要な役割を果たしている。心臓ミオグロビンは分子量が17600ダルトン（d）である。CK-MB = 86,000d : cTnT = 33,000d : CRP ~ 150,000d。分析物の分子量が大きいくほど、分析物が選択的な受容体に結合したときのSPRシグナルの変化が著しくなる。これらの標的分子は、センサー表面と結合したとき、シグナルの増幅を用いることなく、検出可能なSPR偏移を生じさせるために十分な分子量を有している。

【0062】

標的分析物が小さすぎて、結合したときに有意なSPRシグナルを誘導することができないことがある場合には、シグナルの増幅が必要である。低分子量分析物のシグナル強度を増大させるために、競合的な結合アッセイ方法が提案されている。下記において議論されるように、センサーは保護ハウジングに含有される。ウシ血清アルブミン（BSA）または別の高分子量の分子が中心の内側に固定されるが、分子の自由端が標的分析物（すなわち、cTnT、CRP、CK-MBおよびミオグロビン）につながれ得る。BSA-分析物コンジュゲートはセンサーハウジングから決して離れないが、センサー上における結合のために、血液により運ばれる分析物と競合する。BSAで標識された分析物は、表面に結合した受容体単独に対してSPRスペクトルの赤方偏移を誘発するために十分な分子量を有している。BSA標識の存在により、分析物と受容体との会合が少し妨げられ、従って、受容体の遊離分析物との会合が熱力学的には有利である。遊離分析物がBSA標識の分析物を置換すると、SPRシグナルの低下は、図10に示されるように、会合していない生物受容体のSPRスペクトルに向かって青色偏移する。

【0063】

心筋梗塞を明らかにするための本発明の好ましい実施態様において、生物学的マーカーは、心臓トロポニンT（cTnT）または心臓トロポニンI（cTnI）、C反応性タンパク質（CRP）、クレアチニンキナーゼ心筋バンド（CK-MB）、および心臓ミオグロビン（ミオグロビン）を含む群から選択される。cTnT、cTnI、CK-MBおよびミオグロビンは心臓細胞の死のマーカーであり、一方、CRPは、急性冠動脈症候群患者における心臓事象の危険性がより大きいことに関連する非特異的反応期反応物である。cTnTおよびcTnIは、心筋細胞損傷時に循環に放出される心臓の構造タンパク質である。CK-MBは、梗塞の大きさを推定するために歴史的に使用されている。ミオグロビンは小さいタンパク質であるが、損傷を受けた心筋細胞から速やかに（多くの場合には損傷後45分以内に）放出される。無症状梗塞

10

20

30

40

50

を経験する高リスク患者群のいくつか（糖尿病患者または透析患者など）は、このセンサーにより、いつ梗塞事象を受けたかが知らされ、その結果、処置を求めることができるので、このセンサーから利益を受けることになる。これらのセンサーはまた、救急処置室、救急車、病院、または遠隔地／屋外の状況において相反する症状を示す、危険にさらされている患者をモニターすることにおいて有用であるはずである。

【0064】

本発明のセンサーは、発作を検出するために脳CK-BBを測定すること、細胞および組織の死もしくは疾患、疾患の進行、そして代謝的变化を含む組織拒絶およびさらなる問題を検出するためにCRPを測定すること、または毒物および他の異物物質の濃度さえも測定することを含む他の医学的問題を検出するために、同様に、そして類似する様式で使用する

10

【0065】

これらのマーカーは結合対の第1のメンバーであり、そして、この結合対の第2のメンバー、すなわち、これらのマーカーに対して特異的な抗体がバイオセンサーのプロープ先端表面に固定化される。本発明の方法では、特異的な抗体を含むプロープが個体の体内に埋め込まれ、SPR波長偏移が一定期間にわたって観測される。偏移は、プロープのRIシグナルを変化させる、対の両者が表面で結合することの結果である。偏移を校正するために、そして方法を定量的にするために、結果は、既知量のみオグロビンを含む類似する組織から得られた測定値と比較される。

20

【0066】

本発明の他の好ましい実施態様において、治癒中の創傷と非治癒性創傷とを識別するために個体における組織の創傷治癒の進行をモニターするためにバイオセンサーを使用するための方法が提供される。観測中の創傷が、外見上、治癒しつつあるように見えるが、それにもかかわず、望ましくない方向に進行していることは、多くの場合、火傷犠牲者における1つの問題である。結果を成功させるための治癒軌跡には、血小板および凝固（ホメオスタシス）が伴う。生化学的応答は、炎症期（約1週間）、増殖期（数週間または数ヶ月）および成熟期（数ヶ月～数年）を経る。多くの症例（約5%）において、治癒がこれらの段階を経ないで進行している。これらの非治癒性症例では、インターロイキン1およびインターロイキン6などの炎症性の化学的シグナル分子が、治癒中の創傷の場合よりも高濃度であることが観測されている。マトリックスプロテオラーゼ、すなわち、組織破壊の生物学的マーカーもまた、高濃度になっている。

30

【0067】

創傷が非治癒性であることの指標は、その状態を改善するために医師の介入を可能にする。火事による火傷は都市では一般的な出来事である。火傷の処置は、より大きい都市の中心的な病院が今では専門化した火傷センターを有するので、今日、医療では副次的になっている。火傷の近年の処置方法は、死亡率および病的状態を低下させており、そして入院期間の短縮および費用の削減をもたらしている。しかしながら、80歳を越える火傷患者の処置は、依然として死亡率において差がない。

40

【0068】

この数年間にわたる研究により、特異的な因子が火傷分泌液および組織治癒中の滲出液の両方に存在し、これらが治癒速度を変化させていることが示されている。注目がインターロイキン（特に、IL-1、IL-4およびIL-6）および腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）に集まっている。後者は創傷および火傷の治癒を遅らせ、その一方で、インターロイキンは治癒の遅延または促進のいずれかをもたらす。

【0069】

これらの方法において、生物学的マーカーは、インターロイキン、マトリックスプロテオラーゼおよび腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）を含む群から選択される。このような生物学的マーカーに特異的かつ大きい親和性で結合することができる抗体がSPRプロープ先端表

50

面に固定化される。プローブが創傷部に埋め込まれた後において受け取られるRIシグナルの偏移が観測され、創傷非治癒の生物学的マーカーの濃度と相関させられる。バイオセンサーは、火傷部および創傷部から集められた滲出液におけるそれらの濃度を測定するために、上記マーカーに対する抗体がコーティングされる。これらのインビトロ測定は、バイオセンサーが外科的手当て材料の下に火傷または創傷の治癒領域に直接置かれるその場での測定によって補足されている。これらのマーカーの濃度の変化が検出されると、適切な処置を開始することができる。

【0070】

本発明の他の好ましい方法において、乳ガンの検出が提供される。乳ガンは、女性における最も一般的なガン形態である。全女性の約10%が生存中に乳ガンを発症する。乳ガンの家族歴を有する場合、30歳以降に最初の子供を出産した場合、月経が早く始まった場合、またはホルモン代償治療を閉経後に受けている場合には、危険性が高いと考えられる。一般的な臨床的診断検査には、乳房X線撮影法が含まれるが、多くの女性はこの検査を利用しておらず、そして、乳房X線撮影法は、50歳未満の若い患者では腫瘍を検出することにおいてあまり効果的でない。

10

【0071】

確認された乳ガン患者はCA15-3およびCA27-29のマーカーを放出している。これらのマーカーに対する女性患者における血液のモニタリングにより、乳ガンについて危険性のある非常に多数の女性をスクリーニングすることが可能になる。本発明の方法において、SPR光学プローブ先端は、これらのマーカーに対して特異的な抗体がコーティングされる。固定化された抗体を使用するアッセイにより、疾患のこれらの早期マーカーについて血液をインビボおよびインビトロの両方でモニタリングすることが可能になる。現場使用のために設計された小型化システムは、より洗練されたアッセイが利用できる大都市地域から外れた患者にこれらのアッセイをもたらすために特に有用である。

20

【0072】

場合により、手術後の患者が、これらのマーカーの上昇したレベルを依然として示しており、これは、多くの場合、乳腫瘍が再発したことの徴候である。

【0073】

本発明のSPRバイオセンサーの場合、これらのマーカーを、患者から得られた血液サンプルにおいてインビトロで、またはプローブを任意の静脈内に導入することによってインビボで、そのいずれかで測定することが可能である。

30

【0074】

本発明の方法は、1)手術後における腫瘍の考えられる再発について女性をモニターすることに対して、2)他の検出手段が利用できない女性に対して、特に、乳房X線撮影法が利用できないか、または拒否される場合の女性に対して、3)家族歴またはホルモン代償治療などの知られている危険性因子を有する女性に対して、そして4)早期検出に対するその機会を最適化したい女性に対して使用することができる。

【0075】

類似する原理が、卵巣ガンについてスクリーニングすることができる別の腫瘍マーカーCA125の使用において存在する。約25,000名の女性が、今年、卵巣ガンと診断されようとし、そして約15,000名が死亡すると推定されている。このガン形態は、検出がはるかにより困難であり、多くの場合、女性は、卵巣腫瘍の転移のために、骨の痛みを訴えて診療所に診察を受けに行く。より簡便な検査を容易に利用することができないので、双手骨盤検査、骨盤超音波検査および手術による生検が診断的である。CA125が80%の卵巣ガン女性において検出される。CA125に対する抗体がコーティングされた本発明のSPRバイオセンサーは、この卵巣ガンマーカーを検出するためのより簡便な方法である。このバイオセンサーは、このタイプのガンに対する危険性が高い女性をスクリーニングするためにインビトロおよびインビボの両方で使用することができ、これには、陽性の家族歴を有する女性が含まれる。

40

【0076】

50

記載されたプローブに対する他の医学的検出使用には、薬物レベルを検出すること、生物学的な戦争の検出、および殺虫剤の検出が含まれるが、これらに限定されない。

【0077】

本発明の他の好ましい実施態様において、埋め込まれたバイオセンサーを、一体化された薬物送達システムのの一部として使用することができる。これらの実施態様において、センサーの出力は、シグナル変換処理を行い、血液または他の生物学的流体または組織における標的の薬物またはホルモンまたは他の生化学的化合物種のレベルを明らかにする集積化されたマイクロチップに通される。そのとき、マイクロチップは、ポンプおよび貯蔵部の一体化され、かつ埋め込まれたシステム、または制御された治療放出媒介因子の使用によって体内に直接、薬物、タンパク質、ホルモンまたは他の治療剤の送達を行うために使用することができる。センサーのこの適用は、患者が自身の血液を採取して検査し、そしてインスリンの注射を行うのではなく、血流中のグルコースおよびインスリンのレベルをモニターし、インスリン送達を自動的に調節することによって糖尿病患者に大きな利点をもたらす。これは、より良好な疾患管理のために、応答性がより大きく、むらのない治療送達レベルをもたらす。類似する方法を、経時的なモニタリングおよび治療送達を必要とする、甲状腺機能低下、閉経後の女性におけるエストロゲンおよびプロゲステロンの生産低下（これらに限定されない）を含む他のホルモン型疾患ならびに非ホルモン型状態を処置するために採用することができる。

10

【実験の詳細】

【0078】

20

実施例1：

本実施例は、血中のヒトミオグロビン进行分析するための本発明の方法を例示する。

凍結乾燥された粉末形態にある抗ミオグロビン（ヒトミオグロビン抗血清）およびヒトミオグロビン陽性コントロール（これらはICN Pharmaceuticalsから得られる）を脱イオン水で再構成した。光学プローブ表面を、pH7.0（HBS）で、HEPES、NaCl、EDTAおよび界面活性剤P20の混合物で洗浄して、センサー表面を調整した。デキストラン層が、本明細書中上記に記載されるようにEDC/NHS溶液で活性化されると、抗ミオグロビンが、再構成された抗血清のppm溶液にセンサーを浸けることによって固定化される。SPRスペクトルの極小値を感知することにより、抗体の結合が示される。図11を組み立てる際に用いられた特定のセンサーの場合、EDC/NHSで活性化されたプローブは、反射スペクトルの極小値を約616.5nmに示し、経時的に安定している。表面プラズモン共鳴の極小値は、抗ミオグロビンが活性化デキストランに結合するに従い高波長側に偏移する。抗ミオグロビンを活性化デキストランと50分間反応させたが、このデキストランに対する抗ミオグロビンの固定化は15分後に大部分が完了していた。

30

【0079】

抗ミオグロビンを固定化した後、センサーは、過剰なエステルを不活性化し、ゆるく結合した抗体を除くために1Mエタノールアミン塩酸塩で洗浄される。その後、陽性コントロール（ミオグロビン）を、ミオグロビンの約2ng/ml溶液にセンサーを浸けることによって抗血清に結合させる。図6は、ミオグロビンの初期の検知が1分未満であるが、結合したミオグロビンの濃度が定常状態に達するまでには約10分必要であることを示している。センサーの校正は定常状態分析を必要としないことに留意すること。センサーに対するミオグロビン結合の初速度は溶液中のミオグロビンの濃度に比例している。従って、ミオグロビン濃度の最初の推定をSPRシグナルにおける変化速度から行うことができる。センサーが富ミオグロビン溶液から除かれたとき、SPRシグナルにおける対応する低下を伴って、ミオグロビンが抗体から迅速に遊離することが観測されている。このことは、結合が可逆的であり、その結果、センサーが、血流中における心臓損傷マーカーレベルの増大および減少を感知するために使用できることを示している。

40

【0080】

実施例2：

本実施例は、連続したリアルタイムで心筋梗塞の生物学的マーカーをインビボで測定す

50

るための本発明の方法を例示する。

心筋梗塞の生物学的マーカーには、心臓トロポニン T (cTnT)、C 反応性タンパク質 (CRP)、クレアチニンキナーゼ心筋バンド (CK-MB) および心臓ミオグロビン (ミオグロビン) が含まれる。

【0081】

各ファイバーがこれらのマーカーの 1 つに対する抗体を含有するように、これらのマーカーに対する抗体がマルチファイバー光学センサーのプロープ表面に固定化される。マルチファイバープロープ表面が、心筋梗塞を受けていることが疑われる個体の静脈内にカテーテルを介して挿入される。最初のシグナルが、センサーに取り付けられた分光光度計によって受け取られる。このシグナルはプロープの反射率および最小屈折率を表し、そしてプロープがその場に留められている血液から受け取るバックグラウンドシグナルである。第 2 のシグナルが、偏移した波長において一定期間の後に記録される。このシグナルは、プロープ表面と標的マーカーとの間の反応の後におけるプロープの反射率および最小屈折率を表す。これらの 2 つの波長の間における差が測定され、そして、その差が、標的分子を既知の濃度で有するモデル血液システムから得られる値と比較される。一定期間の後、カテーテル内のプロープ表面およびプロープ表面の周りのハウジングが、その場で形成された妨害物質を除くためにヘパリンでフラッシングされる。新しいバックグラウンドシグナルが記録され、測定が繰り返される。

10

【0082】

実施例 3 :

20

実施例 2 のその場での連続アッセイは、治療経過時に濃度が変化する生物学的マーカーである血液成分を測定することによって治療をモニターするために使用することができる。

【0083】

実施例 4 :

本実施例は、低濃度の心臓トロポニン I を測定するための本発明の方法を例示する。括弧内の数字は、図 11 のグラフにおける数字を示す。

【0084】

プロープの調製

光ファイバープロープを HBS (10mM の HEPES、3.4mM の EDTA および 0.001% の Tween20、pH7.4) に 5 分間入れた (11)。その後、プロープを、0.4M の EDC (N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩) と 0.01M の NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) との 1:1 溶液に入れた (12)。次に、プロープを、濃度が 500mg/ml ~ 700mg/ml である抗トロポニン I 溶液 (pH=4) に入れた (13)。光ファイバープロープをこの抗体溶液に 20 分間置いた。プロープを HBS で 5 分間洗浄した (14)。プロープをエタノールアミンの 1M 水溶液 (pH8.4) に入れた (15)。pH=4 溶液のために使用された緩衝液は 10mM 酢酸ナトリウムである。光ファイバープロープを HBS で t 分間洗浄した (16)。

30

【0085】

標的生体分子 (トロポニン I) との反応 :

プロープを、HBS における所望する濃度のトロポニン I 溶液に 20 分間入れた (17)。

40

【0086】

プロープの再生 :

プロープを HBS で洗浄し (18)、その後、10mM グリシン (pH=2) と 4 分間接触させることによって再生した (19)。

【0087】

実施例 5 :

本実施例は、親和性型 SPR バイオセンサーを使用するナノグラム量のトロポニン I の検出を例示する。実施例 3 の方法による 25 マイクログラムのトロポニン I のアッセイ結果が図 12 に示される。

【0088】

50

実施例 6 :

ミオグロビンの500ng溶液のアッセイ結果が図 1 3 に示される。

【 0 0 8 9 】

実施例 7 :

ミオグロビンの250ng溶液のアッセイ結果が図 1 4 に示される。

【 0 0 9 0 】

実施例 8 :

本実施例は、乳ガンを検出するために本発明のバイオセンサーを使用する方法を例示する。

実施例 1 の方法を、女性患者から取り出された血液におけるCA15-3およびCA27-29の生物学的マーカーの存在を明らかにするために繰り返した。抗CA15-3および抗CA27-29がプローブ表面に固定化された。固定化抗体とマーカーとの間における結合のために血液サンプルから得られる波長偏移の分析が、疾患の存在を明らかにするために記録された。

【 0 0 9 1 】

本発明者らのセンサーを用いて、本発明者らは、この患者から得られた血液サンプルにおいてインピトロで、またはプローブを任意の静脈に導入することによってインピボのいずれかでこれらのマーカーを測定することができる。これらのバイオセンサーは、1)手術後における腫瘍の考えられる再発について女性をモニターすることにおいて、2)他の検出手段が利用できない女性、特に、乳房X線撮影法が利用できないか、または拒否される場合の女性において、3)家族歴またはホルモン代償治療などの知られている危険性因子を有する女性において、そして4)早期検出に対するその機会を最適化したい女性において有用である。

【 0 0 9 2 】

類似する原理が、卵巣ガンについてスクリーニングすることができる別の腫瘍マーカーCA125の使用において存在する。約25,000名の女性が、今年、卵巣ガンと診断されようとし、そして約15,000名が死亡すると推定されている。このガン形態は、検出がはるかにより困難であり、多くの場合、女性は、卵巣腫瘍の転移のために、骨の痛みを訴えて診療所に診察を受けに行く。より簡便な検査を容易に利用することができないので、双手骨盤検査、骨盤超音波検査および手術による生検が診断的である。CA125が80%の卵巣ガン女性において検出される。

【 0 0 9 3 】

CA125に対する抗体がコーティングされた本発明者らのSPRバイオセンサーは、この卵巣ガンマーカーを検出するためのより簡便な方法である。本発明者らは、現在、このタイプのガンに対する危険性が高い女性をスクリーニングするためにこのバイオセンサーをインピトロおよびインピボの両方で使用しており、これには、陽性の家族歴を有する女性が含まれる。

【 0 0 9 4 】

いくつかの好ましい実施態様および方法が本明細書中に開示されているが、そのような実施態様および方法の様々な変化および改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく行い得ることが、当業者には前記の開示から明らかになる。

【 参考文献 】

【 0 0 9 5 】

1. A. ブレクト(Brecht)およびG. ガウグリッツ(Gauglitz)、Anal. Chem. Acta、347、1997、219頁 ~ 233頁。

2. M.-P. マルコ(Marco)、S. ゲー(Gee)、B.D. ハンモック(Hammock)、TRAC、14、1995、341頁 ~ 350頁。

3. C.E.H. ベーガー(Berger)、T.A.M. パウマー(Beumer)、R.P.H. クーイマン(Kooyman)およびJ. グレベ(Greve)、Anal. Chem.、70、1998、703頁 ~ 706頁。

4. K. アルフサン(Alfthan)、バイオセンサー アンド バイオエレクトロニクス(Biosensors and Bioelectronics)、13、1998、653頁 ~ 663頁。

10

20

30

40

50

5. M. クニビーラー (Knibiehler)、F. ガウビン (Goubin)、N. エスカラス (Escalas)、Z. O. ジョンソン (Jonsson)、H. マラグイル (Maraguil)、U. ハブッシャー (Hubscher) および B. デュコミュン (Ducommun)、FEBS Letters、391、1996、66頁 ~ 70頁。

【 0 0 9 6 】

6. R. カールソン (Karlsson)、アン ミカエルソン (Anne Michaelsson) および ラース マットソン (Lars Mattsson)、J. Immun. Meth.、145、1991、229頁 ~ 240頁。

7. C.E. ジョーダン (Jordan) および R.M. コーン (Corn)、Anal. Chem.、69、1997、1449頁 ~ 1456頁。

8. J. ラーメ (Lerme)、B. パルパント (Palpant)、B. プレベル (Prevel)、E. コッタシン (Cottancin)、M. ペレリン (Pellerin)、M. トレイロックス (Treilleux)、J.L. バイアレ (Vialle)、A. ペレズ (Perez) および M. ブロイヤー (Broyer)、Eur. Phys. J. D.、4、1998、95頁 ~ 108頁。 10

9. H.E. デ ブルージン (de Bruijn)、R.P.H. クーイマン (Kooyman) および J. グレブ (Greve)、Applied Optics、29、1990、1974頁 ~ 1978頁。

10. W.J. ベンダー (Bender)、R.E. デセイ (Dessey)、M.S. ミラー (Miller) および R.O. クラウス (Claus)、Anal. Chem.、66、1994、963頁 ~ 970頁。

【 0 0 9 7 】

11. E.G. ルイズ (Ruiz)、I. ガーセス (Garces)、C. アルデア (Aldea)、M.A. ロペズ (Lopez)、J. マテオ (Mateo)、J. アロンゾ - カマーロ (Alonso-Chamarro) および S. アレグレット (Alegret)、センサーズ アンド アクチュエーター エー (Sensors and Actuators A)、37-38、1993、221頁 ~ 225頁。 20

12. K. マツバラ (Matsubara)、S. カワタ (Kawata) および S. ミナミ (Minami)、Appl. Spectr.、42、1988、1375頁 ~ 1379頁。

13. M.N. ウェッス (Weiss)、S. スリーバスタバ (Srivastava) および H. グロガー (Grogger)、エレクトロニクス レターズ (Electronics Letters)、32、1996、842頁 ~ 843頁。

14. L.S. ユング (Jung)、C.T. キャンベル (Campbell)、T.M. キノウスキー (Chinowsky)、M.N. および S.S. イー (Yee)、ラングミュア (Langmuir)、14、1998、5636頁 ~ 5648頁。

15. M. ハウシュ (Hausch)、D. ベイヤー (Beyer)、W. クノル (Knoll) および R. ゼンタル (Zentel)、ラングミュア (Langmuir)、14、1998、7231頁 ~ 7216頁。

【 0 0 9 8 】 30

16. C.R. ローレンス (Lawrence)、A.S. マーチン (Martin) および R. サンプルス (Sambles)、チン ソリッド フィルムス (Thin Solid Films)、208、1992、269頁 ~ 273頁。

17. A.G. フルーツ (Frutos) および R.M. コーム (Corm)、Anal. Chem.、70、1998、449A頁 ~ 455A頁。

18. S. ササキ (Sasaki)、R. ナガタ (Nagata)、B. ホック (Hock) および I. カルベ (Karube)、Anal. Chem. Acta、368、1998、71頁 ~ 76頁。

19. S. ロファス (Lofas) および B. ジョンソン (Johnsson)、J. Chem. Soc., Chem. Commun.、1990、1526頁 ~ 1528頁。

20. S. ロファス (Lofas)、B. ジョンソン (Johnsson)、A. エドストロム (Edstrom)、A. ハンソン (Hansson)、G. リンドキュイスト (Lindquist)、R.-M.M. ヒルグレン (Hillgren) および L. スティグ (Stigh)、バイオセンサー アンド バイオエレクトロニクス (Biosensors and Bioelectronics)、10、1995、813頁 ~ 822頁。 40

【 0 0 9 9 】

21. C.E.H. ベーガー (Berger)、T.A.M. バウマー (Beumer)、R.P.H. クーイルマン (Kooyman) および J. グレブ (Greve)、Anal. Chem.、70、1998、703頁 ~ 706頁。

22. J. ホモラ (Homola)、G. シュボッツァー (Schwotzer)、H. レーマン (Lehman)、R. ヴィリッシュ (Willisch)、W. エケ (Ecke)、H. パーテレット (Bartelt)、Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors VII、2508、1995、324頁 ~ 333頁。

23. K.S. ジョンストン (Johnston)、S.S. イー (Yee)、K.S. ブークシュ (Booksh)、Anal. Chem.、69、1997、1844頁 ~ 1851頁。

24. M.K. ボーイスワース(Boysworth)、IL A. オバンド(Obando)、K.S. ブークシュ(Booksh)、Proceedings of SPIE、3856 (R. シャッフアー(Shaffer)、R. ポチライロ(Potyralo)編)、1999、308頁～316頁。

25. ダフィ(Duffy)、D.C.、J.C. マクドナルド(McDonald)、O.J.A. シューラー(Schueler)およびG.M. ホワイトサイデス(Whitesides)、アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、70、1998、4974頁～4984頁。

【 0 1 0 0 】

26. ダフィ(Duffy)、D.C.、O.J.A. シューラー(Schueler)、S.T. ブリッタイン(Brittain)およびG.M. ホワイトサイデス(Whitesides)、ジャーナル オブ マイクロメカニクスズ アンド マイクロエンジニアリング(Journal of Micromechanics and Microengineering)、9(3)、1999、211頁～217頁。 10

27. リー(Lee)、L.J.、M.J. マドウ(Madou)、K.W. コーリング(Koelling)、S. ドーナート(Daunert)、S. ライ(Lai)、C.G. コー(Koh)、Y. ユアング(Juang)、Y. ルー(Lu)およびL. ユー(Yu)、バイオメディカル マイクロデバイスズ(Biomedical Microdevices)、3(4)、2001、339頁～351頁。

28. マクドナルド(McDonald)、J.C.、D.C. ダフィ(Duffy)、J.R. アンダーソン(Anderson)、D.T. チュー(Chiu)、H. ウー(Wu)、O.J.A. ショウラー(Schueler)およびG.M. ホワイトサイデス(Whitesides)、エレクトロフォレシス(Electrophoresis)、21、2000、27頁～40頁。

29. ホワイトサイデス(Whitesides)、G.M.およびA.D. ストルーク(Stroock)、フレキシブル メソッズ フォア マイクロフリューイディクス フィジックス トュディ(Flexible Methods for Microfluidics. Physics Today)、54(6)、2001、42頁～50頁。 20

30. ジャクマン(Jackman)、R.J.、D.C. ダフィー(Duffy)、O. ケルニアヴスカヤ(Cherniavskaya)およびG.M. ホワイトサイデス(Whitesides)、ラングミュア(Langmuir)、15、1999、2973頁～2984頁。

【 0 1 0 1 】

31. ジョー(Jo)、B.H.、L.M. ファン レーベージェー(Van Lerberghe)、K.M. モトセグッド(Motsegood)およびD.J. ベーベ(Beebe)、ジャーナル オブ マクロエレクトロメカニカル システム(Journal of Microelectromechanical Systems)、9(1)、2000、76頁～81頁。 30

32. ホン(Hong)、S.、Z. タン(Tang)、D. デュキック(Djukic)、A. チュケイ(Tucay)、S. バカル(Bakhrui)、R. オスグッド(Osgood)、J. ヤードレイ(Yardley)、A.C. ウェスト(West)およびV. モディ(Modi)、2001 マクロエレクトロメカニカル システムズ カンファレンス 2002 パークレイ カリフォルニア(Microelectromechanical Systems Conference. 2002、Berkeley、CA)。

33. ダイ(Dai)、L.、H.A. St. ジョーン(John)、J. ビ(Bi)、P. ジーエンテック(Zientek)、R.C. チャットラー(Chatlier)およびH.J. グリエッサー(Griesser)、サーフェース アンド インターフェース アナリシス(Surface and Interface Analysis)、29、2000、46頁～55頁。

34. カラーン(Callahan)、R.、ラウベ(Raupp)、G.およびビードイン(Beaudoin)、S.、ジャーナル オブ パキュームサイエンス アンド テクノロジー ビー(Journal of Vacuum Science and Technology B)、19(3)、2000、725頁～731頁。 40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 2 】

【 図 1 】 SPRプローブ表面の反射特性の例示である。

【 図 2 】 マルチモード光ファイバーSPRセンサーの概略図である。

【 図 3 】 図 3 (a)はSPRバイオセンサーの概略図である。図 3 (b)は、SPRバイオセンサーの写真像である。例示のために、図 3 (b)における各ブロックは長さが5mmである。

【 図 4 】 二域型自己参照センサーの形態の例示である。

【 図 5 】 二重感知領域プローブから得られるSPRスペクトルである。最初のスペクトル低 50

下がプローブ軸表面のRIから生じる。第2のスペクトル低下は、先細り領域におけるRIに依存する。

【図6】フォトリソグラフィーを使用してシリコンウエハー上にSU-8フォトレジストから作製された鋳型のSEM（走査電子顕微鏡）像（19倍の倍率）である。ポストは、高さが約25ミクロンであり、直径が約80ミクロンである。

【図7】高周波（rf）酸素プラズマによる処理により自身に接着したポリジメチルシロキサン（PDMS）薄膜のSEM像（16倍の倍率）である。処理条件は、70Wの出力で10秒間、120m torrの圧力での50sccmのO₂であった。接触したとき、薄膜の端が相互に不可逆的に接着した。

【図8】センサー上の金表面における抗ミオグロビン固定化（これにより、センサーが形成される）のSPR検出、および固定化された抗ミオグロビンとのミオグロビン結合のSPR検出を例示するグラフである。 10

【図9】抗体／抗原結合およびセンサーシグナルの概略図である。

【図10】血液により運ばれるマーカー分子を検出するための競合的免疫アッセイの概略図である。a)遊離抗原の非存在下でのセンサーであり、SPRシグナルは大きいRIを示している；b)血中の遊離抗原にさらされたセンサーであり、遊離抗原の結合は、BSAで標識された抗原と比較して熱力学的に有利である；c)BSAで標識された抗原が遊離抗原によって置換されると、プローブ表面におけるRIが低下し、SPRシグナルを低波長側に偏移させる。

【図11】抗トロポニンIとトロポニンIとの結合に対するセンサーグラムである。グラフ上の数字は、アッセイについて記載された工程を示す。 20

【図12】本発明のSP2バイオセンサーを用いたトロポニンIアッセイのセンサーグラムである。

【図13】本発明のSPRバイオセンサーを用いたミオグロビンアッセイ（濃度、500ng/ml）のセンサーグラムである。

【図14】ミオグロビンアッセイ（濃度、25ng/ml）のセンサーグラムである。

【図 1】

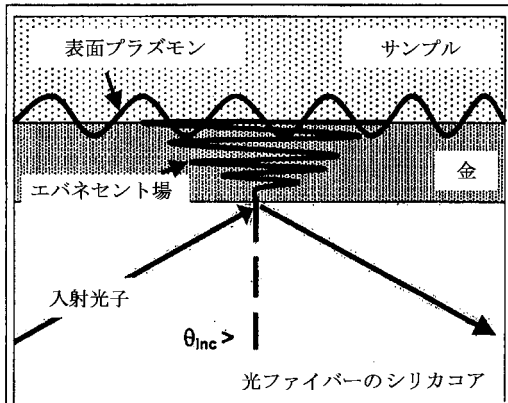


図 1

【図 2】

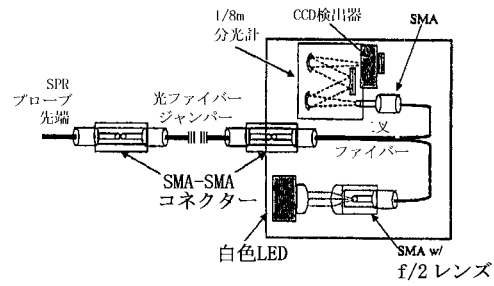


図 2

【図 3】

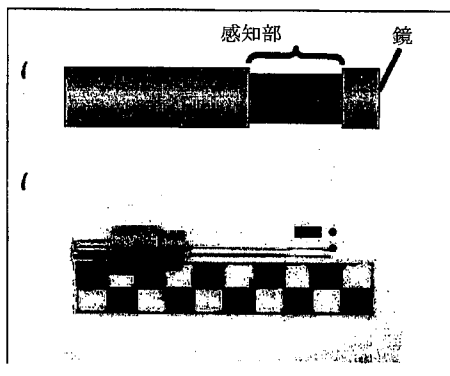


図 3

【図 4】

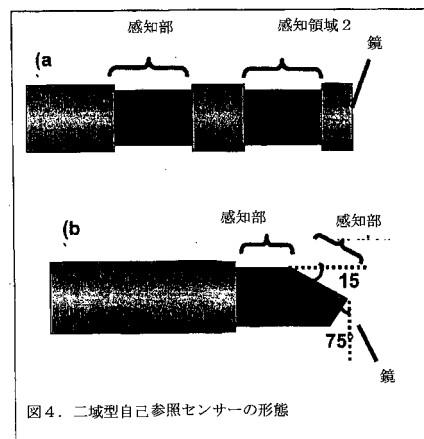


図 4. 二域型自己参照センサーの形態

図 4

【図 5】

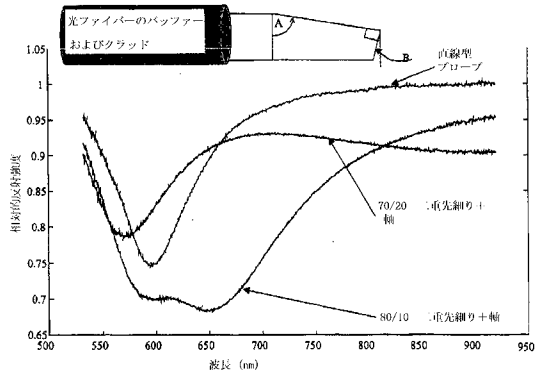


図 5 二重減細領域プロローブから得られるSPRスペクトル。最初のスペクトル低下がプロローブ軸表面のRIから生じる。第2のスペクトル低下は先細り領域におけるRIに依存する。

図 5

【図 6】

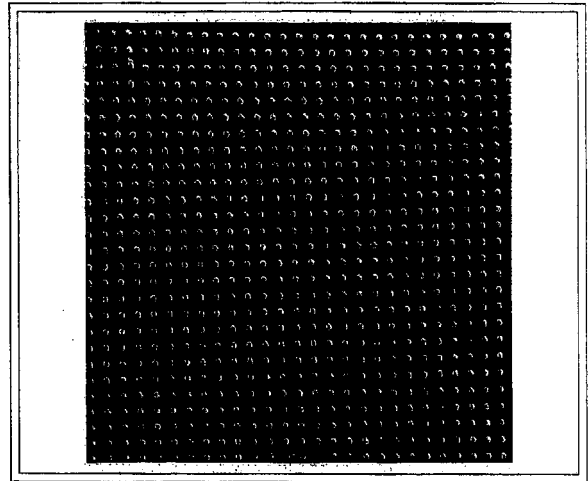


図 6

【図 7】

- これは、高周波 (+f) 酸素プラズマによる処理により自身に接着したポリジメチルシロキサン (PDMS) 薄膜のSEM像 (16倍の倍率) である。処理条件は、70Wの出力で10秒間、120torrの圧力で0.50sccmの O_2 であった。接触したとき、薄膜の端が相互に不可逆的に接着した。

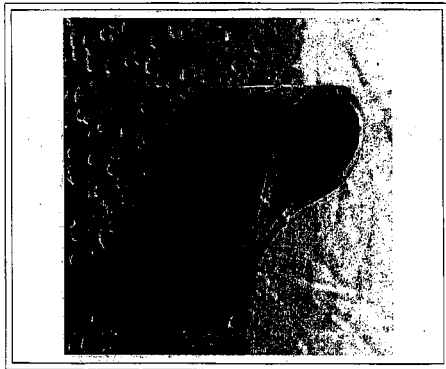


図 7

【図 8】

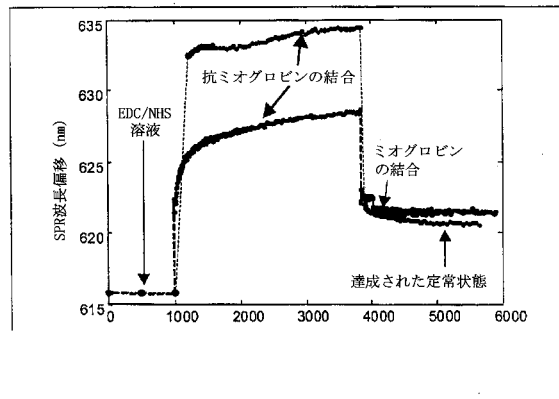


図 8

【 図 9 】

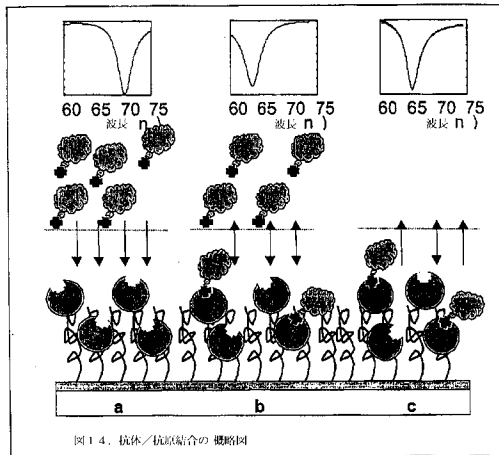


図 9

【 図 10 】

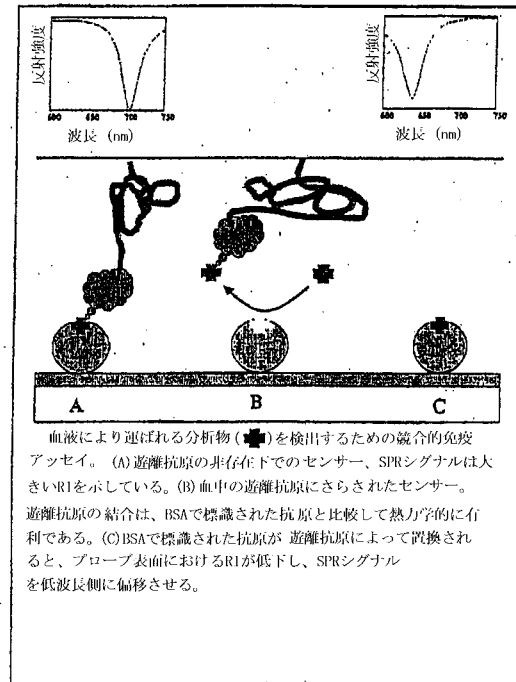
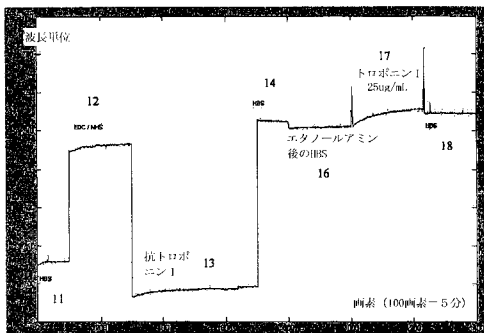


図 10

【 図 11 】

図 1. 抗トロポニンIとトロポニンIとの結合に対するセンサーグラム



グラフ内の数字は説明における工程を示す。

図 11

【 図 12 】

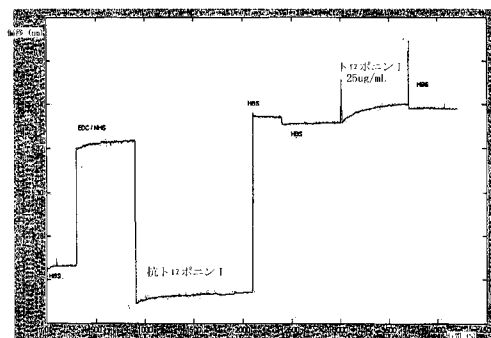


図 12

【図 13】

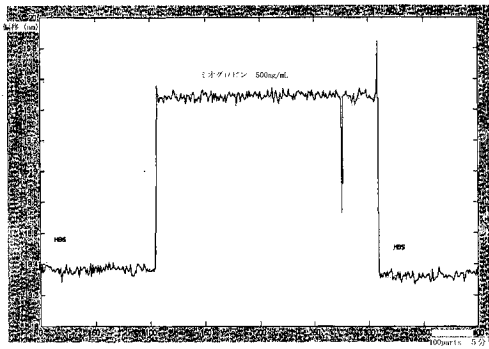


図 13

【図 14】

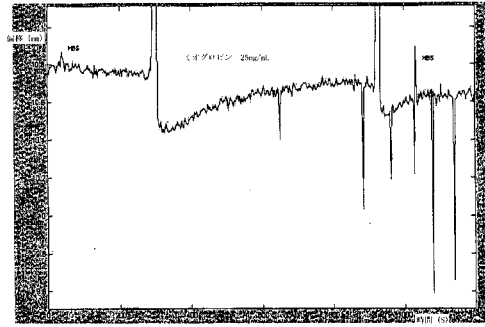


図 14

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/23300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61B 5/055; A61 K 31/665 US CL : 600/310, 473, 476; 514/100 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) U.S. : 600/310, 473, 476; 514/100 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, E	US 2002/0128234 A1 (HUBBELL et al) 12 September 2002, paragraphs 7, 136, 200, 211, 246, 248, 306,	1-37
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 MARCH 2003		Date of mailing of the international search report 05 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JEYU LIN <i>Diana Amate</i> Telephone No. (703) 306-5990

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/531	B
	G 0 1 N 33/543	5 2 5 E
	G 0 1 N 33/543	5 9 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ブックシュ, カール エス.
アメリカ合衆国 8 5 2 9 6 アリゾナ ギルバート カイル コート 5 3 3
- (72)発明者 ハイララ, フィリップ エイ.
アメリカ合衆国 8 5 2 5 4 アリゾナ スコッツデイル イースト グリーンウェイ パークウ
エイ # 2 0 9 3 6 6 3 3
- (72)発明者 ロウトフィ, ハッサン
アメリカ合衆国 8 5 2 6 0 アリゾナ スコッツデイル イースト デザート コープ アベニ
ュー 9 7 0 9
- (72)発明者 パニッチ, アリッサ
アメリカ合衆国 8 5 2 3 6 アリゾナ ヒッグリー イースト インディゴ ベイ コート 3
7 0 3
- (72)発明者 ラザトス, アニータ
アメリカ合衆国 8 5 2 8 3 アリゾナ テンペ イースト ベースライン ロード # 2 1 1 7
9 9 5
- (72)発明者 プロフィ, コリーン
アメリカ合衆国 8 5 2 5 9 アリゾナ スコッツデイル ノース 1 0 9 ス ストリート 1 6
3 0 1

F ターム(参考) 2G059 AA06 BB04 BB13 CC16 EE02 EE12 GG02 HH01 HH02 JJ17
KK04 MM01
4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ21 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR55
QR82 QS32 QX01

【要約の続き】

の表面における結合性メンバーによって結合したマーカーの存在または非存在が、これらの2つの領域から戻ってくる分光情報の類似性または非類似性において明らかになる。プローブは、動物被験体またはヒト被験体における医学的状态を示し得るマーカーの存在について、血液、脊髄液、粘膜、創傷組織、移植臓器、尿、および他の物質をモニターすることができる。

专利名称(译)	用于监测生物过程的亲和生物传感器		
公开(公告)号	JP2005512021A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003511703	申请日	2002-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	亚利桑那板校董		
申请(专利权)人(译)	校务委员会亚利桑那州		
[标]发明人	ビュードインスティーブンピー ブックシュカールエス ハイララフィリップエイ ロウトフィハッサン パニッチアリッサ ラザトスアニータ ブロフィコリーン		
发明人	ビュードイン, スティーブン ピー. ブックシュ, カール エス. ハイララ, フィリップ エイ. ロウトフィ, ハッサン パニッチ, アリッサ ラザトス, アニータ ブロフィ, コリーン		
IPC分类号	G01N33/53 A61B5/00 A61B10/00 C12Q1/00 C12Q1/68 G01N21/27 G01N21/55 G01N21/77 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61B5/0084 A61B5/0075 A61B5/0091 A61B5/02 A61B5/4312 A61B2562/02 G01N21/553 G01N21/7703 G01N33/54373 G01N33/57415 G01N33/6887		
FI分类号	G01N21/27.C A61B10/00.E C12Q1/00.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/531.B G01N33/543.525.E G01N33/543.595		
F-TERM分类号	2G059/AA06 2G059/BB04 2G059/BB13 2G059/CC16 2G059/EE02 2G059/EE12 2G059/GG02 2G059/HH01 2G059/HH02 2G059/JJ17 2G059/KK04 2G059/MM01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ21 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS32 4B063/QX01		
代理人(译)	川崎孝雄 Toshizo饭		
优先权	60/303956 2001-07-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

光学生物传感器具有一种或多种亲和配体或结合成员，其特异性结合监测器中的标记物。沿光纤引导的光照射固定有结合构件的表面等离子体共振（“SPRN”）探针表面。分光光度计接收沿光纤路径返回的反射光，并提供指示表面等离子共振的存在或不存在的波长信息，指示已知SPR模式中的结合标记。探针用于体外或体内。当在体内使用时，光纤光路包括将探针引导到植入部位的导管。在体内植入的情况下，壳体适于在植入部位容纳探针并过滤掉被认为对光谱分析产生不利影响的较大颗粒。在一个实施方案中，探针在其表面上具有两个区域。在第一区域中，结合成员不是固定的。在第二区域中，结合成员固定在其表面上。可以比较从第一区域和第二区域返回的光。在这两个区域返回的光谱信息的相似性或不相似性中，明显存在或不存在由第二表面上的结合成员结合的标记。所述探针为标记物的存在，其可指示在动物受试者或人受试者，血液，脊髓液，粘液的医学病症，受伤组织，可以监测移植的器官，尿液和其它物质。

