

(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2017-524140

(P2017-524140A)

(43) 公表日 平成29年8月24日 (2017. 8. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	2 G O 5 9
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-507701 (P2017-507701)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月13日 (2015. 8. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月21日 (2017. 2. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/045041
 (87) 国際公開番号 W02016/025703
 (87) 国際公開日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 (31) 優先権主張番号 62/037, 071
 (32) 優先日 平成26年8月13日 (2014. 8. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/082, 468
 (32) 優先日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

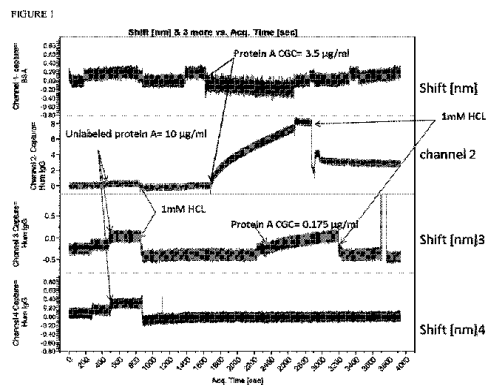
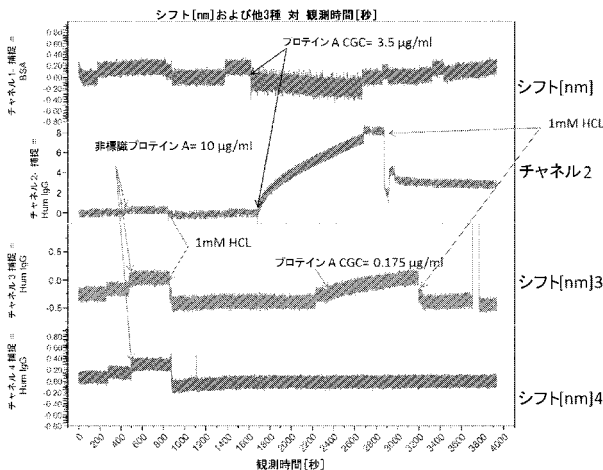
(71) 出願人 505452771
 アバクシス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 5 8 7 ユニオンシティー ウィップル
 ロード 3 2 4 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラズモン特異的結合パートナーアッセイにおけるシグナル増幅

(57) 【要約】

本発明は、分析物検出デバイス、及び試料中の微量の標的分析物を検出するためのかかるデバイスの使用方法に関する。とりわけ、本発明は、分析物の結合パートナーにコンジュゲートしている複数の複合金属ナノ構造体、及び複数の捕捉分子が固定化された金属ナノ層を含有する表面を含む、分析物検出デバイスを提供する。複合ナノ構造体の調製方法もまた記載する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下を含む、分析物検出デバイス：

標的分析物に特異的に結合することができる結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む、複数の検出コンジュゲート；

金属ナノ層を含有する表面；及び

該金属ナノ層上に固定化されておりかつ該標的分析物に特異的に結合することができる、複数の捕捉分子。

【請求項 2】

以下を含む、分析物検出デバイス：

標的分析物と結合している複合金属ナノ構造体を含む、複数の検出コンジュゲート；

金属ナノ層を含有する表面；及び

該金属ナノ層上に固定化されておりかつ該標的分析物に特異的に結合することができる、複数の捕捉分子。

【請求項 3】

前記複合金属ナノ構造体が、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも 2 種の金属を含む、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 4】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、第一の金属からなるコア及び第二の金属からなるコーティングを含む、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 5】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、金のコーティング及び銀のコアを含む、請求項 4 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 6】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、第一の金属と第二の金属の合金である、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 7】

前記複合金属ナノ構造体が、球状ナノ粒子でありかつ約 5 nm から約 200 nm の直径を有する、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 8】

前記複合金属ナノ構造体が、球状ナノ粒子でありかつ約 10 nm から約 100 nm の直径を有する、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 9】

前記複合金属ナノ構造体が、エッジ長が約 10 nm から約 800 nm でありかつ厚さが約 1 nm から約 100 nm のナノプレートである、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 10】

前記複数の検出コンジュゲートが、凍結乾燥されたペレットまたはビーズの形である、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 11】

前記表面が、チップ、ウェル、ビーズ、またはキュベットの壁、蓋、及び/もしくは底部である、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 12】

前記金属ナノ層が金属フィルムである、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 13】

前記金属フィルムが、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、亜鉛、またはそれらの複合材料を含む、請求項 1 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記金属フィルムが金を含む、請求項 1 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 1 5】

前記金属ナノ層が、前記表面に固定化された複数の金属ナノ構造体を含む、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 1 6】

前記複数の金属ナノ構造体が、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、亜鉛、またはそれらの複合材料を含む、請求項 1 5 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 1 7】

前記複数の金属ナノ構造体が金ナノ構造体である、請求項 1 5 に記載の分析物検出デバイス。

10

【請求項 1 8】

前記複合ナノ構造体が、球状ナノ粒子、ピラミッド形ナノ粒子、六角形ナノ粒子、ナノシェル、ナノチューブ、ナノロッド、ナノドット、ナノアイランド、ナノワイヤ、またはそれらの組合せから選択される形状を有する、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 1 9】

前記結合パートナー及び/または捕捉分子が、抗体、抗原、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、核タンパク質、アプタマー、リガンド、受容体、またはハプテンである、請求項 1 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 2 0】

前記結合パートナーが、標的分析物の第一のエピトープを認識する抗体であり、かつ前記捕捉分子が、標的分析物の第二のエピトープを認識する異なる抗体である、請求項 1 に記載の分析物検出デバイス。

20

【請求項 2 1】

前記捕捉分子が、抗体、抗原、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、核タンパク質、アプタマー、リガンド、受容体、またはハプテンである、請求項 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 2 2】

前記標的分析物が、感染症、生理学的状態、または病理学的状態に関連するマーカーまたは抗原である、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

30

【請求項 2 3】

前記標的分析物が、イヌ系状虫、ネコ白血病ウイルス、イヌパルボウイルス、C 反応性タンパク質、ジアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*)、エールリヒア属 (*Ehrlichia*) 抗原もしくは抗体、ボレリア属 (*Borrelia*) 抗原もしくは抗体、アナプラズマ属 (*Anaplasma*) 抗原もしくは抗体、がん抗原、心臓マーカー抗原、甲状腺刺激ホルモン、チロキシン、トロポニン、または脳性ナトリウム利尿ペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の分析物検出デバイス。

【請求項 2 4】

以下の工程を含む、試料中の標的分析物の検出方法：

該試料を複数の検出コンジュゲートと混合する工程であって、該コンジュゲートが、結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含み、該結合パートナーが、該試料中に該標的分析物が存在する場合に該標的分析物に特異的に結合することができ、それにより分析物 - 検出コンジュゲート複合体が形成される、工程；

40

該混合物を、金属ナノ層を含有する表面に接触させる工程であって、該金属ナノ層上に複数の捕捉分子が固定化されており、かつ、該複数の捕捉分子が、該試料中に該標的分析物が存在する場合に該標的分析物に特異的に結合することができる、工程；

該表面を紫外 可視 赤外スペクトルの波長範囲内の光源に暴露する工程；及び

該表面からの光シグナルを測定する工程であって、該光シグナルの変化が、該試料中に該標的分析物が存在することを示す、工程。

【請求項 2 5】

50

前記光シグナルが、反射率、吸光度スペクトル、散乱スペクトル、または発光スペクトルである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記光シグナルの変化が、スペクトルピーク波長シフトを含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

ナノグラム量の前記標的分析物の存在が検出される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

ピコグラム量の前記標的分析物の存在が検出される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

フェムトグラム量の前記標的分析物の存在が検出される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記表面が、遠心ロータに組み込まれるキュベットの壁または底部である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記複合金属ナノ構造体が、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも 2 種の金属を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、第一の金属からなるコア及び第二の金属からなるコーティングを含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、金のコーティング及び銀のコアを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記複合金属ナノ構造体の各々が、第一の金属と第二の金属の合金である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記金属ナノ層が金属フィルムである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記金属フィルムが金を含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記金属ナノ層が、前記表面に固定化された複数の金属ナノ構造体を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記複数の金属ナノ構造体が金ナノ構造体である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記複合ナノ構造体が、球状ナノ粒子、ピラミッド形ナノ粒子、六角形ナノ粒子、ナノチューブ、ナノシェル、ナノロッド、ナノアイランド、ナノドット、ナノワイヤ、またはそれらの組合せから選択される形状を有する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 4 0】

以下の工程を含む、複合金属ナノ構造体の調製方法：

ポリマーと塩化金酸の混合物を含む第一の溶液を調製する工程；

銀または銅ナノ構造体を含む第二の溶液を調製する工程；及び

該第一の溶液と該第二の溶液を一定期間インキュベートする工程であって、得られる混合物が、金でコーティングされた銀ナノ構造体または金でコーティングされた銅ナノ構造体を含む、工程。

【請求項 4 1】

前記第二の溶液が、銀ナノ構造体を含み、かつ、約 5 5 0 ~ 7 5 0 nm のピーク吸光度を有する、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

10

20

30

40

50

前記ポリマーが、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリレート、ポリエチレングリコール、またはポリエチレンイミンである、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

以下を含む、アッセイ複合体：

結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む検出コンジュゲート；

標的分析物；及び

捕捉分子が固定化された金属ナノ層でコーティングされたビーズであって、該検出コンジュゲート中の該結合パートナーが該標的分析物上の第一のエピトープと結合し、かつ、該捕捉分子が該標的分析物上の第二のエピトープと結合し、それによって、該検出コンジュゲート、標的分析物、及び該捕捉分子を含む複合体が形成される、ビーズ。

10

【請求項 44】

前記結合パートナーが抗体であり、かつ、前記捕捉分子が異なる抗体である、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 45】

前記金属ナノ層が金属フィルムである、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 46】

前記金属フィルムが、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、亜鉛、またはそれらの複合材料を含む、請求項 45 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 47】

前記金属フィルムが金を含む、請求項 46 に記載のアッセイ複合体。

20

【請求項 48】

前記金属ナノ層が、前記ビーズに固定化された複数の金属ナノ構造体を含む、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 49】

前記複数の金属ナノ構造体が、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、亜鉛、またはそれらの複合材料を含む、請求項 48 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 50】

前記複数の金属ナノ構造体が金ナノ構造体である、請求項 49 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 51】

前記複合金属ナノ構造体が、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも 2 種の金属を含む、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

30

【請求項 52】

前記複合金属ナノ構造体が、第一の金属からなるコア及び第二の金属からなるコーティングを含む、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 53】

前記複合金属ナノ構造体が、金のコーティング及び銀のコアを含む、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

【請求項 54】

前記複合金属ナノ構造体が、第一の金属と第二の金属の合金である、請求項 43 に記載のアッセイ複合体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年8月13日に提出された米国仮出願第62/037,071号、及び、2014年11月20日に提出された米国仮出願第62/082,468号の優先権を主張する。これら仮出願の各々は、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。

50

【0002】

発明の分野

本発明は、試料中の標的分析物の検出システム及び検出方法に関する。とりわけ、本発明は、試料中の微量の標的分析物の検出が可能な局在プラズモン共鳴に基づく分析物検出システムを提供する。

【背景技術】

【0003】

現行の免疫アッセイ及び生体分子結合アッセイは、通常、複数の工程及びこれらアッセイを行うための高機能の機器を要する。かかる不均質なアッセイの実施に伴う感度の不足及び複雑性は、標識された特異的結合パートナーを非標識の特異的結合パートナーと分離するという特定の必要性に起因する。

10

【0004】

貴金属ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴(LSPR)特性に基づくアッセイを開発する試みがなされている(Tokelら, Chem Rev., Vol. 114: 5728-5752, 2014(非特許文献1))。LSPRは、入射光によって誘導されるナノメートルサイズの構造体における電子の集団振動である。金属ナノ粒子は、それらのごく近傍での屈折率の変化に対する強い電磁応答性を有し、ひいては該ナノ粒子の共振周波数のシフトが、該ナノ粒子表面への分子の結合の指標として測定されうる。金属ナノ粒子、とりわけ金ナノ粒子が、結合事象を検出するための診断アッセイに用いられているが、かかるアッセイは、一般に、感度が低く、逐次結合事象の反応速度を定量的にモニタリングするには用いることができない。

20

【0005】

従って、感度の向上をもたらしながら、均質な形式を採用する改良されたアッセイ法が必要である。分光法等の標準的な実験技術を利用したアッセイもまた望まれる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Tokelら, Chem Rev., Vol. 114: 5728-5752, 2014

【発明の概要】

30

【0007】

本発明は、一部分において、複合金属ナノ構造体が、金属ナノ層表面への分子の結合によって誘導される光シグナルを増強することができるという発見に基づく。観測される増幅は、サブピコグラム量の生体分子が検出できるように、特定の生体分子の結合事象の検出感度を著しく高める。従って、本発明は、試料中の微量の標的分析物を検出するため、分析物検出デバイス及びかかるデバイスの使用方法を提供する。

【0008】

1つの実施形態では、前記分析物検出デバイスは、複数の検出コンジュゲート、金属ナノ層を含有する表面、及び複数の捕捉分子を含み、ここで、該捕捉分子は、該金属ナノ層上に固定化されており、かつ、該標的分析物に特異的に結合することができる。前記分析物検出デバイスがサンドイッチアッセイ形式で構成される実施形態では、前記検出コンジュゲートは、前記標的分析物に特異的に結合することができる結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む。前記分析物検出デバイスが直接競合アッセイ形式で構成される実施形態では、前記検出コンジュゲートは、標的分析物と結合している金属ナノ構造体を含む。

40

【0009】

前記検出コンジュゲート中の前記複合金属ナノ構造体は、一般に、少なくとも2種の貴金属、遷移金属、アルカリ金属、ランタニド元素、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも2種の金属を含む。特定の実施

50

形態では、前記複合金属ナノ構造体の各々は、第一の金属からなるコアと第二の金属からなるコーティングを含む。いくつかの実施形態では、前記コアは、金のコーティングを備えた銀または銅でもよい。他の実施形態では、第一の金属からなる前記コアは、前記第二のコーティング金属結果物からなる中空構造が生じるように、コーティング後に溶解されてもよい。

【0010】

前記表面上に堆積した前記金属ナノ層は、金属フィルムでもよいし、前記表面に固定化された複数の金属ナノ構造体からなってもよい。前記金属ナノ層はまた、貴金属または遷移金属からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記金属ナノ層は、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、亜鉛、またはそれらの複合材料を含む。1つの実施形態では、前記金属ナノ層は金を含む。別の実施形態では、前記金属ナノ層は銀を含む。さらに別の実施形態では、前記金属ナノ層は、金ナノ層を重ねた銀ナノ層を含む。

10

【0011】

本発明はまた、本明細書に記載の分析物検出デバイスを用いた試料中の標的分析物の検出方法を提供する。1つの実施形態では、前記方法は、当該試料を複数の検出コンジュゲートと混合する工程、該混合物を複数の捕捉分子が固定化された金属ナノ層を含有する表面に接触させる工程、該表面を紫外可視赤外スペクトルの波長範囲内の光源に暴露する工程；及び該表面からの光シグナルを測定する工程を含み、ここで、該光シグナルの変化は、該試料中に該標的分析物が存在することを示す。特定の実施形態では、本発明の方法は、試料中のフェムトグラムからナノグラム量の標的分析物の検出が可能である。

20

【0012】

本発明は、結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む検出コンジュゲート；標的分析物；及び捕捉分子が固定化された金属ナノ層でコーティングされたビーズを含むアッセイ複合体を含み、該検出コンジュゲート中の該結合パートナーが該標的分析物上の第一のエピトープと結合し、かつ、該捕捉分子が該標的分析物上の第二のエピトープと結合し、それによって、該検出コンジュゲートと標的分析物と該捕捉分子とを含む複合体が形成される。いくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金でコーティングされた銀ナノ構造体または金でコーティングされた銅ナノ構造体であって、前記ビーズ上の前記金属ナノ層コーティングは、金を含む。

30

【0013】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の検出デバイス及び方法に用いる複合金属ナノ構造体の調製方法を提供する。1つの実施形態では、前記方法は、ポリマーと塩化金酸の混合物を含む第一の溶液を調製する工程、銀または銅ナノ構造体を含む第二の溶液を調製する工程、及び該第一の溶液と該第二の溶液を一定期間インキュベートする工程を含み、ここで、得られる混合物は、金でコーティングされた銀ナノ構造体または金でコーティングされた銅ナノ構造体を含む。特定の実施形態では、アスコルビン酸等の還元剤を前記反応混合物に添加し、ナノ構造体の生産量を増やす。1つの実施形態では、前記第一の溶液中の前記ポリマーはポリビニルピロリドンである。別の実施形態では、前記第一の溶液中の前記ポリマーはポリビニルアルコールである。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ウシ血清アルブミン(BSA)が結合している金ナノ層センサー(チャンネル1)及びヒトIgGが結合している金ナノ層センサー(チャンネル2~4)についての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。矢印は、非標識プロテインA、1mMのHCl、または金コロイド(CGC)で標識されたプロテインAのインジェクションの順序及び濃度を示す。

【図2】抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。矢印は、異なるチャンネルでの濃度0~100ng/mlのCRP(CRPロード)、1μg/mlの非標識抗CRP C6抗体、または3μg/mlの金コロイド標識抗CRP C6抗体(C6-CGC)のインジェクションの順序

50

を示す。センサー表面が非標識抗CRP C6抗体で占められた場合、さらなるC6-CGC結合は認められなかった。

【図3】抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。矢印は、異なるチャンネルにおける0~100 ng/ml濃度のCRP (CRPロード)、1 μg/mlの金コロイド標識抗CRP C6抗体 (C6-CGC)、3 μg/mlのC6-CGC、または1 mMのHCl (酸)のインジェクションの順序を示す。

【図4】図4A. 図3における様々なC6-CGC濃度での、10 ng/mlのCRPがロードされた、抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーの反射スペクトル。図4B. 3種の濃度のうちの1種のCRPとともにインキュベートされ、その後、3 μg/mlの金コロイド標識抗CRP C6抗体 (C6-CGC)が導入された、抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。右の表は、C6-CGCの導入の700秒後のピーク分析を示す。

【図5】抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。矢印は、異なるチャンネルにおける0~100 ng/ml濃度のCRP (インキュベーション時間が最小化されたCRPロード)、3 μg/mlの金コロイド標識抗CRP C6抗体 (C6-CGC)、または1 mMのHCl (酸)のインジェクションの順序を示す。

【図6】3 μg/mlの金コロイド標識抗CRP C6抗体 (C6-CGC)の即時導入後、図5のトレースについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。右の表は、C6-CGCの導入の700秒後のピーク分析を、CRPのインキュベーションで得たピークシフト (図4Bに示す値)と比較して示す。

【図7】3種の濃度のうちの1種のCRP及び金でコーティングされた銀ナノ構造体にコンジュゲートしているC6抗CRP抗体とともにインキュベートした、抗CRP C7抗体が結合している金ナノ層センサーについての観測時間に対するピーク波長のシフトのプロット。対照は、C7抗体の代わりにウシ血清アルブミン (BSA)が固定化された金ナノ層センサーであった。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、複合金属ナノ構造体で標識された結合パートナーを用いることによって、LSPRに基づくアッセイにおける有意な増幅が達成されうる、という発見に部分的に基づく。従って、本発明は、LSPR表面 (例えば、金属ナノ層を含有する表面)と、該金属ナノ層上に固定化された複数の捕捉分子と、生体分子と結合している複合金属ナノ構造体を含む複数の検出コンジュゲートとを含む、分析物検出デバイスを提供する。

【0016】

前記分析物検出デバイスは、サンドイッチアッセイ形式または直接競合アッセイ形式で構成されうる。例えば、1つの実施形態では、サンドイッチアッセイ形式での分析物検出デバイスは、(i) 標的分析物に特異的に結合することができる結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む、複数の検出コンジュゲート、(ii) 金属ナノ層を含有する表面、及び(iii) 該金属ナノ層上に固定化されておりかつ該標的分析物に特異的に結合することができる、複数の捕捉分子を含む。別の実施形態では、直接競合アッセイ形式での分析物検出デバイスは、(i) 標的分析物と結合している複合金属ナノ構造体を含む、複数の検出コンジュゲート、(ii) 金属ナノ層を含有する表面、及び(iii) 該金属ナノ層上に固定化されておりかつ該標的分析物に特異的に結合することができる、複数の捕捉分子を含む。

【0017】

本発明の分析物検出デバイスは、金属ナノ層を含有する表面を含む。前記表面は、チップ、ウェル、キュベット、またはビーズ等の任意の適切なサイズと形状でもよい。いくつかの実施形態では、前記表面は矩形チップである。他の実施形態では、前記表面はディスクである。特定の実施形態では、前記表面は、キュベット (例えば、円筒または矩形のキ

ュベット)の底部、蓋、及び/または内壁である。さらに別の実施形態では、前記表面は、非金属粒子のアレイである。前記表面は、限定されないが、ガラス、石英、ケイ素、シリカ、ポリスチレン、黒鉛、布帛(例えば、ポリエチレン布帛)、メッシュ、または膜(例えば、ラテックス膜、ポリビニル膜、ナイロン膜、もしくはポリエステル膜)等の様々な材料から製造されうる。

【0018】

前記表面上に、好ましくは金属ナノ層が堆積している。前記金属ナノ層は、いくつかの実施形態では、特定の表面の全表面積を覆っていてもよい。他の実施形態では、前記金属ナノ層は、前記表面の一部のみに堆積されていてもよい。例えば、前記表面は複数の凹部またはウェルを含んでいてもよく、該凹部またはウェル内に前記金属ナノ層が堆積されている。他の実施形態では、前記金属ナノ層は、前記表面にわたって存在する複数の離間した堆積物として前記表面に施されていてもよい。前記金属ナノ層の光学特性は、該ナノ層の厚さ及び/またはナノ構造体の性質を変えることによって調整されうる。1つの実施形態では、前記ナノ層は、金属ナノアイランドからなる。別の実施形態では、前記ナノ層は、ナノロッドからなる。本発明のデバイス及び方法での使用に適した前記金属ナノ層の厚さとしては、約0.5nmから約100nm、約5nmから約30nm、または約3nmから約10nmが挙げられる。本発明のデバイス及び方法に用いることができる金属ナノ層コーティングを備えた典型的な表面としては、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2006/0240573号に記載の表面が挙げられる。

10

20

【0019】

特定の実施形態では、前記金属ナノ層は、金属フィルムである。基材表面への金属フィルムの堆積法は、当業者に公知であって、限定されないが、原子層堆積、パルスレーザー堆積、ドロップキャストリング、蒸着、及び吸着が挙げられる。例えば、Atanasovら, *Journal of Physics: Conference Series* 514 (2014); Walters and Parkin, *Journal of Materials Chemistry*, 19: 574-590, 2009; 及び Guptaら, *J. Appl. Phys.* 92, 5264-5271, 2002を参照されたい。これらの各々は、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。前記金属フィルムは、他の成分を含んでもよく、例えば、前記金属フィルムは、ポリマーフィルム、ラングミュア-ブロッコットフィルム、または酸化フィルムでもよい。いくつかの実施形態では、前記金属フィルムは、各層が異なる金属を含む2つの層を含む。一例として、前記金属フィルムは、金層を重ねた銀層を含みうる。

30

【0020】

他の実施形態では、前記金属ナノ層は、前記表面に固定化された複数の金属ナノ構造体を含む。金属ナノ構造体は、前記表面の材料を試薬で処理して化学官能基(例えば、シアニ化物、アミン、チオール、カルボキシル、アルデヒド、またはマレイミド)を付加し、処理された表面を金属ナノ構造体と反応させることによって、前記表面に固定化されうる。金属ナノ構造体は、かかる化学官能基に高い親和性で結合することが知られている。いくつかの実施形態では、前記金属ナノ層を構成する前記金属ナノ構造体は、球状ナノ粒子である。かかるナノ粒子は、約300nm未満、約200nm未満、または約150nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、前記球状ナノ粒子は、約5nmから約200nm、約10nmから約100nm、または約20nmから約60nmの直径を有する。特定の実施形態では、前記金属ナノ層を作製するために使用される前記金属ナノ構造体のサイズは、前記検出コンジュゲートに用いられる前記複合ナノ構造体のサイズと同様である。かかる実施形態では、二組のナノ構造体のサイズを適合させることによって、反射率、発光、または散乱スペクトルの最適な波長シフトがもたらされうる。

40

【0021】

前記金属ナノ層(金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は、貴金属またはその複合材料からなってもよい。他の実施形態では、前記金属ナノ層(金属フィルムまたは複数

50

の金属ナノ構造体)は、遷移金属またはその複合材料からなってもよい。特定の実施形態では、前記金属ナノ層は、金、銀、銅、白金、パラジウム、ルテニウム、ロジウム、オスミウム、イリジウム、チタン、クロム、カドミウム、亜鉛、鉄、コバルト、ニッケル、及びそれらの複合材料から選択される金属を含む。1つの特定の実施形態では、前記金属ナノ層(例えば、金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は金を含む。別の特定の実施形態では、前記金属ナノ層(例えば、金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は銀を含む。特定の実施形態では、前記金属ナノ層(例えば、金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は金と銀または金と銅の複合材料を含む。アルカリ金属(例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、及びフランシウム)またはランタニド元素(例えば、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、及びルテチウム)の使用は、LSPRピーク強度を向上しうる。従って、いくつかの実施形態では、前記金属ナノ層(金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は、1種以上のアルカリ金属またはランタニド元素からなってもよい。別の実施形態では、前記金属ナノ層(金属フィルムまたは複数の金属ナノ構造体)は、貴金属とアルカリ金属またはランタニド元素との組合せからなってもよい。

10

20

30

40

50

【0022】

本発明の分析物検出デバイスは、さらに、表面に堆積した前記金属ナノ層上に固定化された複数の捕捉分子を含む。前記捕捉分子は、標的分析物に特異的に結合することができる。本明細書で用いられる「特異的結合」とは、高い親和性、例えば、少なくとも 10^{-6} Mの親和性で標的分子に結合することを指す。いくつかの実施形態では、前記捕捉分子は、ハプテン及び他の小分子、薬物、ホルモン、生体高分子であって、抗体もしくはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、(Fab)₂、一本鎖、CDR等)、抗原、受容体、リガンド、ポリヌクレオチド、アプタマー、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、糖ペプチド、リポタンパク質、または核タンパク質を非限定的に含む。特定の実施形態では、前記複数の捕捉分子は抗体である。他の実施形態では、前記複数の捕捉分子は抗原である。

【0023】

金属ナノ層またはナノ構造体への分子の固定化法は当業者には公知である。かかる方法としては、コンジュゲーションケミストリー、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、スルホNH₂カップリング、疎水性結合、またはチオエーテル化学を含むものが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記分子は、より大きな担体分子またはタンパク質を介して間接的に、前記金属ナノ層またはナノ構造体に結合せらる。かかる間接的な結合は、前記分子が小さい場合(例えば、ホルモン、薬物、及び他の10 kD未満の小分子の場合)に特に有用である。前記担体タンパク質は、前記標的分析物と特異的に相互作用できないことが好ましい。

【0024】

本発明の分析物検出デバイスはまた、複数の検出コンジュゲートも含みうる。検出コンジュゲートは、アッセイの構成によって、標的分析物に特異的に結合することができる結合パートナーまたは捕捉分子と結合している金属ナノ構造体を含む。例えば、前記デバイスがサンドイッチアッセイ形式で構成される実施形態では、前記検出コンジュゲートは、標的分析物に特異的に結合することができる結合パートナーと結合またはコンジュゲートしている金属ナノ構造体を含む。前記デバイスが直接競合アッセイ形式で構成される他の実施形態では、前記検出コンジュゲートは、標的分析物と結合またはコンジュゲートしている金属ナノ構造体を含む。

【0025】

前記結合パートナーは、前記捕捉分子と同じ種類の分子でよく、限定されないが、ハプテン及び他の小分子、薬物、ホルモン、生体高分子、例えば、抗体もしくはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、(Fab)₂、一本鎖、CDR等)、抗原、受容体、リガンド、ポリヌクレオチド、アプタマー、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、糖ペプチド

、リポタンパク質、または核タンパク質が挙げられる。いくつかの実施形態では、前記結合パートナーは、前記捕捉分子と同じ種類の分子であるが、好ましくは、前記捕捉分子の結合部位とは異なる位置で前記標的分析物に結合する。一例として、前記結合パートナーと前記捕捉分子はともに標的分析物を認識する抗体でもよいが、前記結合パートナーが前記標的分析物に結合するエピトープは、前記捕捉分子が前記標的分析物に結合するエピトープと離れており、理想的には重複していない。従って、特定の実施形態では、前記結合パートナーは、標的分析物の第一のエピトープを認識する抗体であって、前記捕捉分子は、標的分析物の第二のエピトープを認識する異なる抗体である。

【0026】

前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体は、貴金属またはその複合材料からなりうる。いくつかの実施形態では、前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体は、遷移金属またはその複合材料からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体は、アルカリ金属またはランタニド元素と、貴金属または遷移金属との組み合わせを含んでもよい。特定の実施形態では、前記検出コンジュゲート中の金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、ルテニウム、ロジウム、オスミウム、イリジウム、チタン、クロム、カドミウム、亜鉛、鉄、コバルト、ニッケル、及びそれらの複合材料から選択される金属を含む。1つの実施形態では、前記金属ナノ構造体は、金ナノ構造体である。別の実施形態では、前記金属ナノ構造体は、銀ナノ構造体である。

10

【0027】

好ましい実施形態では、前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体は、複合金属ナノ構造体である。「複合金属ナノ構造体」とは、少なくとも2種の貴金属、遷移金属、アルカリ金属、またはランタニド元素を含むナノ構造体を指す。前記2種以上の金属は、合金の場合のように互いに混合されていてもよいし、前記ナノ構造体の別個の部分に存在してもよい。例えば、1種の金属が前記ナノ構造体のコアを形成することができ、第二の金属は前記ナノ構造体のシェルまたはコーティングを形成する。いくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、ルテニウム、ロジウム、オスミウム、イリジウム、チタン、クロム、カドミウム、亜鉛、鉄、コバルト、及びニッケルから選択される少なくとも2種の金属を含む。他の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも2種の金属を含む。1つの特定の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金と銀を含む。別の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金と銅を含む。さらに別の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、銀と銅を含む。

20

30

【0028】

いくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体の各々は、第一の金属と第二の金属の合金である。特定の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体の各々は、第一の金属からなるコアと第二の金属からなるコーティングを含む。1つの実施形態では、前記コアは銀であって、前記コーティングは金である。別の実施形態では、前記コアは銅であって、前記コーティングは金である。別の実施形態では、前記コアは銀であって、前記コーティングは銅である。いくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体の各々は、誘電体コア（例えば、二酸化ケイ素、硫化金、二酸化チタン、シリカ、及びポリスチレン）、第一の金属からなる第一のコーティング、並びに第二の金属からなる第二のコーティングを含む。1つの特定の実施形態では、前記コアはシリカであって、前記第一のコーティング（すなわち、内側コーティング）は銀のコーティングであり、前記第二のコーティングは金のコーティング（すなわち、外側コーティング）である。別の実施形態では、前記コアはシリカであって、前記第一のコーティング（すなわち、内側コーティング）は銅のコーティングであり、前記第二のコーティングは金のコーティング（すなわち、外側コーティング）である。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、第一の金属を含む前記コアは、第二の金属でのコーティング

50

工程の後、溶解され、前記第二の金属からなる中空構造を形成する。例えば、銀のコアを金ナノ粒子でコーティングすることで前記銀のコアの周囲に金のシェルを生じ、前記銀のコアをその後溶解または分解することで、中空ナノ金シェル構造が形成される。

【0030】

前記金属ナノ構造体は、球状ナノ粒子と同様、ナノプレート及びナノシェルを含む。ナノプレートは、厚さよりも大きな横寸法（例えば、エッジ長）を有する。ナノプレートとしては、ナノディスク、ナノ多角形、ナノ六角形、ナノキューブ、ナノリング、ナノ星形、及びナノプリズムが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記金属ナノ構造体は、前記複合ナノ構造体を含めて、球状ナノ粒子、ピラミッド形ナノ粒子、六角形ナノ粒子、ナノチューブ、ナノシェル、ナノロッド、ナノドット、ナノアイランド、ナノワイヤ、ナノディスク、ナノキューブ、またはそれらの組合せから選択される形状を有する。不規則な形状を含む他の形状もまた可能である。特定の実施形態では、前記金属ナノ構造体のサイズ及び形状は、均一ではない - すなわち、前記金属ナノ構造体は、異なる形状とサイズのナノ構造体の不均質な混合物である。

10

【0031】

球状ナノ粒子については、適切な直径範囲としては、約5 nmから約200 nm、約10 nmから約100 nm、及び約20 nmから約60 nmが挙げられる。ナノプレートについては、エッジ長は約10 nmから約800 nm、約20 nmから約500 nm、約50 nmから約200 nm、約30 nmから約100 nm、または、約10 nmから約300 nmでもよい。前記ナノプレートの厚さは、約1から約100 nm、約5 nmから約80 nm、約10 nmから約50 nm、または、約5 nmから約20 nmに及びうる。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、前記ナノプレートは、2を超えるアスペクト比を有する。アスペクト比は、厚さに対するエッジ長の比である。好ましくは、前記ナノプレートはアスペクト比約2から約25、約3から約20、約5から約10、約2から約15、または約10から約30を有する。

【0033】

前記結合パートナーまたは標的分析物は、前記金属ナノ構造体（例えば、複合ナノ構造体）に、前記捕捉分子の前記金属ナノ層への固定化のための上記と同様の方法を用いて結合またはコンジュゲートされうる。かかる方法としては、限定されないが、EDCコンジュゲーションケミストリー、スルホNHSカップリング、疎水性結合またはチオエーテル化学が挙げられる。前記結合パートナーまたは標的分析物は、チオール、アミン、ジチオール、アクリルホスホラミダイト、アジド、またはアルキンを含む様々な化学官能基を介して、前記金属ナノ構造体に結合されうる。

30

【0034】

いくつかの実施形態では、前記表面に堆積される前記金属ナノ層に使用される金属は、前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体の製造に使用される金属と同じでもよい。例えば、1つの実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは金ナノ構造体を含む。他の実施形態では、前記表面に堆積される前記金属ナノ層に使用される金属は、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体の作製に使用される金属とは異なる。例えば、いくつかの実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、銀フィルムまたは複数の銀ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは金ナノ構造体を含む。他の実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは銀ナノ構造体を含む。特定の実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは複合ナノ構造体を含む。関連する実施形態では、前記複合ナノ構造体は、金でコーティングされた銀ナノ構造体を含む。他の特定の実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは、金でコーティングされた銅ナノ構造体を含む複合ナノ構造体を含

40

50

む。さらに他の実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは、金でコーティングされたマグネタイトナノ構造体を含む複合ナノ構造体を含む。さらに他の実施形態では、前記表面に堆積した前記金属ナノ層は、金フィルムまたは複数の金ナノ構造体を含み、かつ、前記検出コンジュゲートは、金及びアルカリ金属またはランタニド元素を含む複合ナノ構造体を含む。

【0035】

本発明はまた、本明細書に記載の本発明の分析物検出デバイスを含むキットを含む。1つの実施形態では、前記キットは、(i)複数の捕捉分子が固定化されている金属ナノ層を含有する表面及び(ii)本明細書に記載の複数の検出コンジュゲートを含む組成物を含む。特定の実施形態では、前記組成物は、後に前記検出方法の実施中に前記表面と接触させられるように、前記表面とは別に包装される。いくつかの実施形態では、前記複数の検出コンジュゲートを含む前記組成物は、例えばペレットまたはビーズの形で凍結乾燥されている。関連する実施形態では、前記金属ナノ層を含有する前記表面は、チップ、ディスク、またはキュベットでありうる。1つの特定の実施形態では、前記金属ナノ層を含有する前記表面は、遠心ロータでの使用に適合したキュベットである。かかる実施形態では、前記金属ナノ層は、前記キュベットの蓋、底部、及び/または壁に堆積されうる。

【0036】

特定の実施形態では、本明細書に記載の分析物検出システムのすべての構成要素は、遠心ロータまたはディスク内に含まれる。例えば、ロータまたはディスクは、1つ以上の反応チャンバを含むことができ、ここに、固定化された捕捉分子を含む前記金属ナノ層表面及び前記複数の検出コンジュゲートが配置される。1つの実施形態では、前記金属ナノ層表面は、前記反応チャンバの底部に位置するチップである。別の実施形態では、前記金属ナノ層は、前記反応チャンバの底に直接堆積されている。さらに別の実施形態では、前記金属ナノ層表面は、前記金属ナノ層でコーティングされたビーズ(例えば、プラスチックビーズ)である。かかる実施形態のすべてにおいて、前記捕捉分子は前記金属ナノ層表面に固定化されている。関連する実施形態では、前記複数の検出コンジュゲートは、凍結乾燥された組成物、例えば、凍結乾燥ビーズまたはペレットの形で存在する。

【0037】

別の実施形態では、捕捉分子は、コロイド懸濁液内の金属ナノ構造体にコンジュゲートしている。試験試料の存在下で前記懸濁液に前記複数の検出コンジュゲートが添加される。前記試料中に前記標的分析物が存在する場合、前記検出コンジュゲートと、前記捕捉分子を含む懸濁された前記ナノ構造体との間で複合体が形成され、光シグナルの変化(例えば、懸濁された前記ナノ構造体のピーク吸収波長のシフト)がもたらされる。

【0038】

従って、いくつかの実施形態では、前記キットは、1つ以上の反応チャンバを有するロータまたはディスクを含むとともに、各反応チャンバは、(i)本明細書に記載の複数の検出コンジュゲートを含む凍結乾燥された組成物及び(ii)金属ナノ層でコーティングされたビーズであって、前記金属ナノ層上に複数の捕捉分子が固定化されている、ビーズを含む。かかるキットは、試験試料を前記ロータまたはディスクに接触させ、前記ロータまたはディスクに遠心力を加えることで前記試験試料を前記反応チャンバに供給し、そこで前記試料が前記複数の検出コンジュゲート及び固定化された捕捉分子を含む前記金属ナノ層でコーティングされたビーズと混ざる、一工程の分析物検出アッセイを提供する。前記ロータまたはディスクが2つ以上の反応チャンバを含む実施形態では、前記検出コンジュゲート及び捕捉分子は、各反応チャンバにおいて異なる分析物を検出できるように選択されうる。これらのロータ形式検出デバイスは、サンドイッチアッセイ形式、直接競合アッセイ形式、または前記ロータが複数の反応チャンバを含む場合は両方で構成されうる。

【0039】

本明細書で説明されている任意のタイプの金属ナノ層または金属ナノ構造体を、これらロータ形式検出デバイスで用いることができる。いくつかの実施形態では、前記ビーズ上

10

20

30

40

50

の前記金属ナノ層コーティングは金ナノ層であり、かつ、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体は金ナノ構造体である。他の実施形態では、前記ピーズ上の前記金属ナノ層コーティングは銀ナノ層であり、かつ、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体は金ナノ構造体である。さらに他の実施形態では、前記ピーズ上の前記金属ナノ層コーティングは金ナノ層であり、かつ、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体は銀ナノ構造体である。1つの実施形態では、前記ピーズ上の前記金属ナノ層コーティングは金ナノ層を重ねた銀ナノ層であり、かつ、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体は金ナノ構造体である。特定の実施形態では、前記ピーズ上の前記金属ナノ層コーティングは金ナノ層であり、かつ、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体は複合ナノ構造体である。例えば、1つの実施形態では、前記複合ナノ構造体は、金でコーティングされた銀ナノ構造体である。別の実施形態では、前記複合ナノ構造体は、金でコーティングされた銅ナノ構造体である。

10

【0040】

本発明のキットはまた、前記デバイスを用いて試験試料中の分析物を検出するための取扱説明書、生体試料を収集するためのデバイスもしくは道具、並びに/または、固体材料（例えば、土壌、食品、及び生体組織）から試料を採取するための抽出緩衝液を含んでもよい。

【0041】

本発明はまた、試料中の標的分析物の検出方法も提供する。1つの実施形態では、前記方法は、(i) 試験試料を本明細書に記載の複数の検出コンジュゲートと混合する工程；(ii) 該混合物を本明細書に記載の複数の捕捉分子が固定化された金属ナノ層を含有する表面に接触させる工程；(iii) 該表面を紫外 可視 赤外スペクトルの波長範囲内の光源に暴露する工程；(iv) 該表面からの光シグナルを測定する工程を含み、ここで、該光シグナルの変化は、該試料中に該標的分析物が存在することを示す。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、前記検出方法はサンドイッチアッセイである。かかる実施形態では、前記検出コンジュゲートは、結合パートナーと結合している金属ナノ構造体を含み、該結合パートナーは、前記試料中に前記標的分析物が存在する場合に前記標的分析物に特異的に結合することができ、それにより分析物 - 検出コンジュゲート複合体が形成される。前記金属ナノ層表面に固定化された前記複数の捕捉分子もまた、前記試料中に前記標的分析物が存在する場合に前記標的分析物に特異的に結合することができる。前記金属ナノ層が光源に暴露されると、光シグナルが測定され、前記光シグナルの変化は、前記試料中に分析物が存在することを示す。例として、前記標的分析物を含む試料を前記複数の検出コンジュゲートと混合した場合、前記標的分析物が前記検出コンジュゲートの前記結合パートナーと結合し、分析物 - 検出コンジュゲート複合体が形成される。これらの複合体は、同様に、前記分析物を介して、前記金属ナノ層表面に固定化された前記複数の捕捉分子に結合し、これにより、前記検出コンジュゲートの前記金属ナノ構造体を、前記金属ナノ層表面にごく接近させる。前記金属ナノ層表面で吸収または散乱される光量は、前記複合体中の前記金属ナノ構造体の近接性に影響され、ひいてはピーク吸収波長のシフトの増大を生じ、これは前記試料中に前記標的分析物が存在することを示す。

30

40

【0043】

他の実施形態では、前記検出方法は競合アッセイである。かかる実施形態では、前記検出コンジュゲートは、目的の前記標的分析物と結合している金属ナノ構造体を含む。前記サンドイッチアッセイ法のように、前記金属ナノ層表面に固定化された前記複数の捕捉分子は、前記標的分析物に特異的に結合することができる。この種類のアッセイでは、前記検出コンジュゲートは、最初に前記捕捉分子に結合する。標的分析物を含む試料がこれら初期の複合体と混合されると、前記試料中の非標識すなわち遊離の標的分析物は、前記捕捉分子への結合について前記検出コンジュゲートと競合する。この種類のアッセイにおける光シグナルの変化は、前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体が前記金属ナノ層表面から離れたことに起因し、これに比例して前記ピーク吸収波長の波長シフトが減少

50

する。

【0044】

試験試料は、生体試料または環境もしくは食品試料から調製される抽出物を含む任意の種類液体試料でもよい。1つの特定の実施形態では、前記試験試料は生体試料である。生体試料としては、限定されないが、全血、血漿、血清、唾液、尿、胸水、汗、胆汁、脳脊髄液、糞便、膿液、精液、眼水晶体液、粘液、滑液、腹水、羊水、生検組織、唾液、及び細胞溶解物が挙げられる。生体試料は、がん、感染症（例えば、ウイルス、細菌、寄生虫、または真菌感染症）、心血管疾患、代謝性疾患、自己免疫疾患等の病状を有する疑いのあるヒト対象または動物対象から採取することができる。前記生体試料はまた、定期検診を受ける健康な対象（例えば、ヒトまたは動物）から採取してもよい。

10

【0045】

前記方法のいくつかの実施形態では、前記試験試料を複数の検出コンジュゲートと混合し、続いて当該混合物を前記固定化された捕捉分子を含む前記金属ナノ層表面に接触させる。他の実施形態では、前記試験試料を、前記固定化された捕捉分子を含む前記金属ナノ層表面に接触させ、続いて前記複数の検出コンジュゲートを添加する。特定の実施形態では、前記試料、前記複数の検出コンジュゲート、及び前記固定化された捕捉分子を含む前記金属ナノ層表面を同時に接触させる。例えば、前記試料の両試薬との同時の接触は、上記ロータ形式検出デバイスで生じうる。

【0046】

上記分析物検出デバイスのいずれかが本発明の検出方法に使用されうる。従って、本明細書に記載の様々な金属ナノ層表面、捕捉分子、及び検出コンジュゲートが前記検出方法での使用に適する。例えば、前記方法のいくつかの実施形態では、金属ナノ層を含有する前記表面は、チップ、ウェル、キュベット、またはビーズである。前記方法の特定の実施形態では、金属ナノ層を含有する前記表面は、遠心ロータに組み込まれた、または遠心ロータでの使用に適合したキュベットの壁及び底部である。これら及び他の実施形態では、前記表面上の前記金属ナノ層は、金フィルム等の金属フィルムである。前記方法の他の実施形態では、前記表面上の前記金属ナノ層は、前記表面に固定化された複数の金属ナノ構造体、例えば金ナノ構造体を含む。

20

【0047】

前記検出方法の特定の実施形態では、前記検出コンジュゲートは、結合パートナーまたは標的分析物と結合している複合金属ナノ構造体を含む。本明細書に記載の通り、複合金属ナノ構造体は、少なくとも2種の貴金属または遷移金属を含む。前記方法のいくつかの実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、ルテニウム、ロジウム、オスミウム、イリジウム、チタン、クロム、カドミウム、亜鉛、鉄、コバルト、及びニッケルから選択される少なくとも2種の金属を含む。前記方法の他の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金、銀、銅、白金、パラジウム、カドミウム、鉄、ニッケル、及び亜鉛から選択される少なくとも2種の金属を含む。1つの特定の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金と銀を含む。別の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金と銅を含む。さらに別の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、銀と銅を含む。本発明の前記方法で使用される前記複合金属ナノ構造体としては、球状ナノ粒子、ピラミッド形ナノ粒子、六角形ナノ粒子、ナノチューブ、ナノシェル、ナノロッド、ナノドット、ナノアイランド、ナノワイヤ、ナノディスク、ナノキューブ、またはそれらの組合せ等の多数の異なる形状を挙げることができる。

30

40

【0048】

特定の実施形態では、本発明の方法で使用される前記複合金属ナノ構造体は、第一の金属と第二の金属の合金である。いくつかの実施形態では、本発明の方法で使用される前記複合金属ナノ構造体は、第一の金属からなるコアと第二の金属からなるコーティングを含む。特定の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、銀のコアと金のコーティングを含む。他の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、銅のコアと金のコーティングを含む。別の実施形態では、前記コアは銀であり、前記コーティングは銅である。いくつかの実

50

施形態では、前記複合金属ナノ構造体の各々は、誘電体コア（例えば、二酸化ケイ素、硫化金、二酸化チタン、シリカ、及びポリスチレン）、第一の金属からなる第一のコーティング、並びに第二の金属からなる第二のコーティングを含む。前記検出方法の1つの特定の実施形態では、前記コアはシリカであって、前記第一のコーティング（すなわち、内側コーティング）は銀のコーティングであり、前記第二のコーティングは金のコーティング（すなわち、外側コーティング）である。別の実施形態では、前記コアはシリカであって、前記第一のコーティング（すなわち、内側コーティング）は銅のコーティングであり、前記第二のコーティングは金のコーティング（すなわち、外側コーティング）である。

【0049】

本発明の検出方法は、標的分析物の定性的または定量的な量を測定するのに使用される。かかる方法は、試料中の標的分析物のおおよその量を測定するのに特に有用であって、とりわけ、特定の医学的状態の診断または薬物療法の有効性の評価に使用できる。1つの実施形態では、標的分析物の量が既知の試料について本明細書に記載の通りに前記金属ナノ層表面からの光シグナルの変化を測定することによって検量線を作成し；試験試料についての光シグナルの変化を測定し；前記試験試料についての光シグナルの変化と、前記検量線として得られた値を比較することによって、特定の分析物についての標的分析物の量を決定することができる。いくつかの実施形態では、第一の試薬と第二の試薬の複合体の量の測定は、試験試料からの吸光度比及び/または反応速度を、複合体の量が既知の試料からの吸光度比及び/または反応速度と比較し、それによって、前記試験試料中の前記複合体の量を決定することを含む。試験試料から得られた定量値は、所定の閾値と比較されてもよく、ここで、当該所定の閾値は、前記標的分析物の異常または正常レベルのどちらかを示す。

【0050】

本発明の検出方法は、試料中の微量の標的分析物を検出するための高感度の技術を提供する。実施例によって実証されているとおり、試料中のナノグラム量の標的分析物を検出できるように、金ナノ構造体コンジュゲートを用いて金ナノ層表面からのプラズモン共鳴に基づくシグナルの増幅を実現することができる。従って、前記方法の1つの実施形態では、ナノグラム量の標的分析物の存在が検出される。本発明者らは、意外にも、複合金属ナノ構造体コンジュゲートを用いることによって、金ナノ層表面からのプラズモン共鳴に基づくシグナルの有意に大きな増幅が実現されうることを見出した。分析物に特異的な抗体とコンジュゲートしている、金でコーティングされた銀ナノ構造体の使用は、ピコグラム量の前記標的分析物の検出を可能にしたが、これは、金ナノ構造体コンジュゲートで得られるものと比較して、感度が1000倍増加している。実施例3を参照されたい。従って、前記方法のいくつかの実施形態では、ピコグラム量の前記標的分析物の存在が検出される。前記方法の他の実施形態では、フェムトグラム量の前記標的分析物の存在が検出される。より高い感度は、前記複合金属ナノ構造体並びに/または金属ナノ層表面の組成及び/もしくは形状を変えることによって得ることができる。

【0051】

金属ナノ構造体に入射光が当たると、前記金属中の伝導体電子は、前記入射電磁波と同じ周波数で集合的に振動する。これら共鳴振動の結果として、前記ナノ構造体は、特定の波長範囲で光を強く吸収及び散乱する。貴金属または遷移金属を含む金属ナノ構造体の場合のこの波長範囲は紫外可視赤外スペクトルにあり、これは前記ナノ構造体の個々の組成に依存する。従って、本発明の方法に使用するのに適した電磁エネルギーを印加するための光源としては、アーク灯及びレーザ等の、紫外可視スペクトルまたは紫外可視赤外スペクトルに入る波長範囲を適用しうる任意の光源を挙げることができる。いくつかの実施形態では、前記光源は、特定の波長の光が前記金属ナノ層表面に適用されうるように、モノクロメータを備えうる。

【0052】

前記金属ナノ層及びナノ構造体の光学特性は、それらのサイズ、形状、及び組成に依存する。例えば、固体金ナノ粒子は、粒径に依存して約515nmから約560nmの吸収

10

20

30

40

50

ピーク波長 ($m_{a x}$) を有する。直径 30 nm の球状金ナノ粒子は、約 520 nm で最大限に吸収し、粒径が大きくなるにつれて $m_{a x}$ は長波長側へとシフトする。銀及び銅の粒子は、紫外/青または赤色領域 (例えば、約 350 nm から約 500 nm) に $m_{a x}$ を有し、粒径が大きくなるにつれて $m_{a x}$ は長波長側へとシフトする。金属ナノロッドは、横 $m_{a x 1}$ 及び縦 $m_{a x 2}$ を有する。異なる金属の合金は、通常、構成金属の吸収ピークの間域に吸収ピークを示す。例えば、金と銀の 50/50 合金を含むナノ構造体は、約 470 nm の $m_{a x}$ を示し、金の量が増加するにつれて吸収ピークは長波長側へとシフトする。前記 LSPR シグナルの局所媒質屈折率の変化に対する感度は、前記ナノ構造体の形状や配置を変えることで変更できる。例えば、非球形粒子 (例えば、ナノプリズム、ナノロッド、ナノシェル、等) は、球形のものと比較して増加した LSPR 感度を有する。いくつかの実施形態では、光学特性 (例えば、特定の波長での吸収/散乱) は、前記表面に堆積した前記金属ナノ層または前記検出コンジュゲートに使用される前記金属ナノ構造体のサイズ、形状、または組成を変えることで、特定の用途に合わせて調整される。

10

【0053】

入射光と前記金属ナノ層表面と間の相互作用は、反射光または透過光としてモニタリングされうる。入射光の吸収量または散乱量は、反射モードの吸収スペクトルまたは透過モードの吸収スペクトルとして測定されうる。いくつかの実施形態では、前記金属ナノ層から測定される光シグナルは、光の反射、吸光度スペクトル、散乱スペクトル、及び/または発光スペクトルの場合がある。

20

【0054】

前記結合パートナーと標的分析物と捕捉分子と間の複合体の形成に起因する、前記金属ナノ層と前記検出コンジュゲート中の前記金属ナノ構造体と間のプラズモンカップリングは、前記金属ナノ層の局在表面プラズモン共鳴スペクトルに変化をもたらす。例えば、かかる変化としては、光消費の増加、光の反射の増加、並びに/または散乱及び/もしくは発光シグナルの増加を挙げることができる。いくつかの実施形態では、前記試料中に前記標的分析物が存在することを示す光シグナルの変化としては、シフト、すなわち、光学散乱の増加もしくは減少、またはこれらの特徴の組合せが挙げられる。特定の実施形態では、前記試料中に前記標的分析物が存在することを示す光シグナルの変化は、スペクトルピーク波長シフトである。1つの実施形態では、前記光学スペクトルピークの波長シフトは、200 nm から 1200 nm のスペクトルウィンドウ内のレッドシフト (例えば、長波長側へのシフト) でありうる。別の実施形態では、前記光学スペクトルピークの波長シフトは、200 nm から 1200 nm のスペクトルウィンドウ内のブルーシフト (例えば、短波長側へのシフト) でありうる。光シグナルのこれらの変化は、一定の反応時間後の特定の時点で測定されうる。追加として、または別の方法として、反応時間中の光シグナルの変化 (例えば、速度決定) が測定されうる。両方の種類の測定を、標的分析物の定性的または定量的分析のどちらかに使用できる。

30

【0055】

種々の波長での光シグナルの様々な測定手段や、消費スペクトル、散乱スペクトル、または発光スペクトルの様々な取得手段が、当技術分野で公知である。任意の分光光度計または光度計器が本開示の方法での使用に適する。いくつかの非限定的な例としては、プレートリーダー、Cobas Fara アナライザー、並びに Piccolo xpress (登録商標) 及び Vetscan アナライザー (Abaxis, Inc., カリフォルニア州ユニオンシティ)、光ファイバーリーダー (例えば、Light Path (商標) S4 (Lamda Gen, カリフォルニア州メンローパーク))、SPR 機器 (例えば、GE Healthcare より入手可能な Biacore 機器)、オリンパス、日立等の遠心アナライザーが挙げられる。

40

【0056】

本発明はまた、(i) 結合パートナーと結合している複合金属ナノ構造体を含む検出コンジュゲート、(ii) 標的分析物、及び (iii) 捕捉分子が固定化された金属ナノ層

50

でコーティングされたビーズを含むアッセイ複合体も含み、該検出コンジュゲート中の該結合パートナーは、該標的分析物上の第一のエピトープと結合し、かつ、該捕捉分子は該標的分析物上の第二のエピトープと結合し、それによって、該検出コンジュゲート、標的分析物、及び該捕捉分子を含む複合体が形成される。いくつかの実施形態では、前記アッセイ複合体は、遠心ロータでの使用に適合したキュベット内に含まれる。他の実施形態では、前記アッセイ複合体は、遠心ロータまたはディスクの反応チャンバ内に含まれる。

【0057】

前記アッセイ複合体中の前記結合パートナー及び前記捕捉分子は、ハプテン及び他の小分子、薬物、ホルモン、生体高分子、例えば、抗体またはそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、(Fab)₂、一本鎖、CDR等）、抗原、受容体、リガンド、ポリヌクレオチド、アプタマー、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、糖ペプチド、リポタンパク質、または核タンパク質を含めた上記のいずれかの種類の分子でありうる。1つの実施形態では、前記結合パートナーは抗体であり、前記捕捉分子は異なる抗体である。

10

【0058】

前記金属ナノ層及び複合金属ナノ構造体は、上記に詳述されている。1つの実施形態では、前記ビーズ（例えば、プラスチックまたはガラスビーズ）の前記金属ナノ層コーティングは金ナノ層である。別の実施形態では、前記ビーズの前記金属ナノ層コーティングは、銀ナノ層である。前記ビーズは、好ましくは、0.5cm未満だが0.1mmより大きい。特定の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金でコーティングされた銀ナノ構造体である。他の実施形態では、前記複合金属ナノ構造体は、金でコーティングされた銅ナノ構造体である。さらに他の実施形態では、前記金属ナノ構造体は、銀イオン、銅イオン、またはこれらイオンの両方でドーブされた金を含む。

20

【0059】

任意の種類 of 標的分析物、特に疾患の診断において重要なものが、本発明の方法、デバイス、及びアッセイ複合体を用いて検出されうる。標的分析物としては、限定されないが、タンパク質、酵素、抗原、抗体、ペプチド、核酸（RNA、DNA、mRNA、miRNA）、ホルモン、糖タンパク質、多糖、毒素、ウイルス、ウイルス粒子、薬物分子、ハプテン、または化学薬品を挙げることができる。いくつかの実施形態では、前記標的分析物は、ヒト及び/または動物の感染症に関連するマーカーまたは抗原である。他の実施形態では、前記標的分析物は、特定の生理学的状態または病理学的状態に関連するマーカーまたは抗原である。

30

【0060】

特定の実施形態では、前記標的分析物は、病原性抗原または病原性抗原に対する抗体である。例えば、前記病原性抗原は、ウイルス抗原（例えば、ネコ白血病ウイルス、イヌパルボウイルス、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、肝炎A型、B型、C型ウイルス、HIVウイルス、ヒトパピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス、狂犬病ウイルス、等）、細菌性抗原（例えば、エールリヒア属（*Ehrlichia*）、ボレリア属（*Borrelia*）、アナプラズマ属（*Anaplasma*）、炭疽（*Anthrax*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、バシラス属（*Bacillus*）、等）、真菌抗原、または寄生虫抗原（例えば、イヌ糸状虫、ジアルジア・ランブリア（*Giardia lamblia*）、熱帯熱マラリア原虫（*plasmodium falciparum*）、アフリカトリパノソーマ症、トリパノソーマ・ブルセイ（*Trypanosoma brucei*）、等）でありうる。他の実施形態では、前記標的分析物は、疾患関連抗原または疾患関連抗原に対する抗体である。疾患関連抗原としては、限定されないが、がん関連抗原もしくはマーカー（例えば、PSA、AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、CEA、NY-ESO-1、MUC1、GM3、GD2、ERBB2、等）、心血管疾患に関連する抗原もしくはマーカー（例えば、トロポニン、C反応性タンパク質、脳性ナトリウム利尿ペプチド、CKMB、脂肪酸結合タンパク質、等）、代謝関連抗原もしくはマーカー（例えば、甲状腺刺激ホルモン、チロキシン、レプチン、インスリン）、または自己免疫疾患関連抗原もしくはマーカー（例えば、自己抗体）が挙げ

40

50

られる。特定の実施形態では、前記標的分析物は、炎症性の抗原またはマーカー（例えば、C反応性タンパク質、MRP14、MRP8、25F9、等）である。他の実施形態では、前記標的分析物は、妊娠に関連する抗原またはマーカー（例えば、胎児抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピン）である。

【0061】

本発明はまた、複合金属ナノ構造体の調製法も提供する。1つの実施形態では、前記方法は、ポリマーと塩化金酸の混合物を含む第一の溶液を調製する工程、銀または銅ナノ構造体を含む第二の溶液を調製する工程、及び該第一の溶液と該第二の溶液を一定期間インキュベートする工程を含み、得られる混合物は、金でコーティングされた銀ナノ構造体または金でコーティングされた銅ナノ構造体を含む。前記得られる混合物は、好ましくは、約515nmから約670nm、または約520nmから約560nmのピーク吸光度を有する。1つの実施形態では、前記得られる混合物は、約530nmのピーク吸光度を有する。

10

【0062】

前記第一の溶液の調製に使用されるポリマーは、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリレート、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、種々のガム、ゼラチン、またはこれらのいずれかを含む混合ポリマーのうちのいずれかでもよい。1つの特定の実施形態では、前記ポリマーはポリビニルピロリドンである。前記ポリマーの分子量を変えることで、異なる種類のコーティングされたナノ構造体を得ることができる。前記ポリマーの適切な分子量範囲としては、約5,000ダルトンから約150,000ダルトン、約10,000ダルトンから約100,000ダルトン、約20,000ダルトンから約80,000ダルトンが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは、50,000ダルトン未満の分子量を有する。他の実施形態では、前記ポリマーは、20,000ダルトン未満の分子量を有する。特定の実施形態では、前記ポリマーは、約10,000ダルトンの分子量を有する。

20

【0063】

前記金のコーティングの特性は、ポリマーと塩化金酸の濃度比を調整することによって制御されうる。例えば、ポリマーと塩化金酸の濃度比は、約100:1から約1:100、約2:1から約5:1、または約1.5:1から約8:1である。いくつかの実施形態では、ポリマーと塩化金酸の濃度比は、1:1である。適切なポリマー濃度としては、限定されないが、水またはエタノール中で、約0.1%から約20%wt/ウェットが挙げられる。適切な塩化金酸の濃度としては、限定されないが、約0.001Mから約1.0M、約0.010Mから約0.500M、及び約0.050Mから約0.100Mが挙げられる。

30

【0064】

塗布効率及び厚さもまた、コーティング溶液（すなわち、第一の溶液）のpHとハロゲン化物含量に影響されうる。特定の実施形態では、前記溶液のpHは、約3から約14の範囲に維持される。前記溶液の前記ハロゲン化物含量は、いくつかの実施形態では、150mM未満である。他の実施形態では、前記溶液の前記ハロゲン化物含量は、約0から約50mMの範囲である。

40

【0065】

銀及び銅ナノ構造体の溶液の調製法は当業者には公知である。例えば、銀または銅ナノ構造体を含む前記第二の溶液は、各々が参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2012/0101007号、米国特許公開第2014/0105982号、または米国特許公開第2013/0230717号に記載の方法のいずれかによって調製されうる。1つの実施形態では、銀または銅ナノ構造体を含む前記第二の溶液は、銀源または銅源と還元剤を混合することによって調製される。適切な銀源としては、銀塩、例えば、硝酸銀が挙げられる。適切な銅源としては、硫酸銅(II)、塩化銅(II)、水酸化銅(II)、硝酸銅(II)、酢酸銅(II)及び、トリフルオロ酢酸銅(II)が挙げられる。前記銀源または銅源と反応してナノ構造体を形成できる還元剤と

50

しては、グルコース、アスコルビン酸、水素化ホウ素ナトリウム、及びPVP等のポリマーのアルカリ性溶液（例えば、pH 7.5を超える）を挙げることができる。特定の実施形態では、前記還元剤はアスコルビン酸である。前記銀ナノ構造体または銅ナノ構造体の所望の形状及び光学スペクトルピークは、当業者に知られる通り、反応物の比や濃度を調整することによって実現される。ほんの一例として、高濃度の前記還元剤は、五角両錐形状ナノ構造体をもたらすのに対し、低濃度の前記還元剤は、細長いナノワイヤまたはチューブをもたらす。前記ナノ構造体の個別の形状に応じて、銀または銅ナノ構造体を含む前記第二の溶液は、約550 nmから約1000 nm、約600 nmから約700 nm、約630 nmから約680 nm、約750 nmから約850 nm、約900 nmから約940 nm、約580 nmから約620 nm、約550 nmから約750 nmのピーク吸光度を有する。特定の実施形態では、銀ナノ構造体を含む前記第二の溶液は、約600 nm（すなわち、595 nmから605 nm、端点を含む）のピーク吸光度を有する。いくつかの実施形態では、銅ナノ構造体を含む前記第二の溶液は、約585 nm（すなわち、580 nmから590 nm、端点を含む）のピーク吸光度を有する。いくつかの実施形態では、銅ナノ構造体を含む溶液のピーク吸光度は、同様のサイズ及び形状の銀ナノ構造体を含む溶液のピーク吸光度よりも大きい（すなわち、レッドシフトしている）。

10

【0066】

いくつかの実施形態では、第一の溶液の第二の溶液とのインキュベーション期間は、少なくとも12時間である。他の実施形態では、第一の溶液の第二の溶液とのインキュベーション期間は、24時間より長く、好ましくは48時間より長く、より好ましくは少なくとも72時間である。前記インキュベーション期間中に前記反応混合物のピーク吸光度の変化をモニタリングし、前記インキュベーション時間を適切に調整することができる。例えば、（例えば、520 nmから550 nmの領域における）短波長側へのピーク吸光度のシフトは、前記金でコーティングされたナノ構造体が安定化されたことを示す。特定の実施形態では、得られるナノ構造体の塩化ナトリウム（例えば、0.25 ~ 1 M）に対する安定性は、前記ナノ構造体の適正なコーティングを示すために用いられる。

20

【0067】

特定の実施形態では、本発明は、光学濃度が約50 / mLより大きいナノ構造体の合成法を提供する。1つの実施形態では、前記方法は、本明細書に記載のポリマーを塩化金酸と混合する工程、該混合物を所定の温度で第一の期間攪拌する工程、該混合物にアスコルビン酸を添加する工程、及び該混合物を第二の期間インキュベートする工程を含む。前記ナノ構造体のサイズ及び形状は、ポリマーと塩化金酸の濃度比並びにインキュベーションの温度及び時間によって決まる。ポリマーと塩化金酸の前記濃度は、上述した範囲でもよい。前記温度は、所望の前記ナノ構造体のサイズ及び形状を基に調整されるが、約4から約100 の範囲でありうる。同様に、前記インキュベーション期間（すなわち、第一の期間）は、前記ナノ構造体の所望の特性に基づいて調整されるが、約15分から1日に及びうる。

30

【0068】

いくつかの実施形態では、前記第一のインキュベーション期間の後、約0.1 ~ 1部のアスコルビン酸（例えば、約1 ~ 5 M）が前記混合物に添加される。前記アスコルビン酸の添加後の第二のインキュベーション期間は約1 ~ 約24時間でもよい。理論に拘束されるわけではないが、アスコルビン酸の添加は、生じるナノ構造体量の実質的な増加をもたらす。

40

【0069】

特定の実施形態では、前記方法は、さらに、前記混合物に、約1 ~ 約100部の塩化金（例えば、約0.001 Mから1 M）、硝酸銀（例えば、約0.001 Mから1 M）、または他の金属（例えば、貴金属、遷移金属、アルカリ金属、もしくはランタニド元素）を追加またはドーピングする工程を含む。このドーピング工程は、得られるナノ構造体の共鳴強度をさらに増加させることができる。いくつかの実施形態では、前記塩化金、硝酸銀、または他の金属は、前記反応物にアスコルビン酸が添加される前に前記混合物に添加される

50

。他の実施形態では、前記塩化金、硝酸銀、または他の金属は、アスコルビン酸の添加後に前記混合物に添加される。前記金属とアスコルビン酸の添加順序を調整し、得られるナノ構造体を所望の形状及びサイズに合わせてもよい。

【0070】

本発明は、以下、追加の実施例によってさらに説明されるが、これら実施例は限定とは解釈されないものとする。当業者には、本開示に照らし、開示され、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく同等または同様の結果をさらに得る具体的な実施形態に対して、多くの変更がなされることが理解されよう。

【0071】

本開示を通して参照されるすべての特許文献及び非特許文献は、すべての目的のため、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【実施例】

【0072】

実施例1．金ナノ粒子とコンジュゲートしている分析物を用いたLSPRシグナルの増幅
金ナノ層フィルムが堆積したプラスチックチップを用意することによって、分析物検出システムを調製した。この金ナノ層フィルムにヒトIgGタンパク質(100 μg/ml)を固定化してセンサー表面を作製した。対照のセンサーは、この金ナノ層フィルムにウシ血清アルブミンを固定化することで構成した。これら2種類のセンサー表面を、金ナノ層表面への光の照射及び前記表面からの反射光の収集を行う発光集光ファイバーを備えた機器内に配置した。

20

【0073】

遊離のプロテインA(10 μg/ml)を含む試料を、これら2種類のセンサー表面に接触させ、反射スペクトルの変化を測定した。図1に示すように、固定化されたヒトIgGを含むセンサーに遊離のプロテインAを導入しても、ピーク波長のシフトによって測定される金ナノ層フィルムの反射スペクトルにおける有意な目に見える変化は生じていない。

【0074】

これらのセンサー表面を1 mMの塩酸で処理することによって再生し、これらセンサー表面に、2種の異なる濃度(3.5 μg/ml及び0.175 μg/ml)で金コロイドナノ粒子(CGC)にコンジュゲートしたプロテインAを含む試料を接触させた。プロテインA(すなわち、標的分析物)が金コロイドナノ粒子にコンジュゲートしていた場合に、金ナノ層表面の反射スペクトルの変化が強められた。具体的には、3.5 μg/mlのプロテインA-CGCは、10 μg/mlの非標識プロテインAより大きなピーク波長シフトをもたらした。図1、センサー2参照。プラズモン共鳴シグナルの増幅は、ナノグラム濃度のプロテインA-CGCの検出を可能にするのに十分大きかった。図1、センサー3参照。BSAセンサーの反射スペクトルの変化は、センサー表面へのプロテインA分子の非特異的結合を表しており、当該変化は、固定化されたIgG分子にプロテインA分子が特異的に結合することによって誘導される変化よりも有意に小さい。

30

【0075】

この最初の実験の結果は、標的分析物を金コロイドナノ粒子に結合させることによって、金属ナノ層表面での結合事象によって誘導される局在表面プラズモン共鳴シグナルの変化の大きな増幅が実現されうることを示している。ナノグラム量の分析物が検出される場合に、ほぼ60倍の感度の増加が認められる。

40

【0076】

実施例2．サンドイッチアッセイにおけるLSPRシグナルの増幅

本実施例は、金ナノ粒子複合体での局在表面プラズモン共鳴シグナルの増幅が、標的分析物が金ナノ粒子に直接コンジュゲートされないサンドイッチアッセイ形式でも実現されるかどうかを評価するために設計された一連の実験を示す。金ナノ層チップ表面は、実施例1に記載の通りに調製した。このチップ表面に堆積した金ナノ層フィルムに、C反応性タンパク質(CRP)(100 μg/ml)に対するC7抗体を固定化して、抗CRP

50

センサーを作製した。このC7抗体と異なる、CRPの非重複エピトープを認識するC6抗体を、いくつかの実験については金コロイドナノ粒子にコンジュゲートさせ(C6-CGC)、他の実験については非標識の形で使用した。

【0077】

最初の一連の実験では、3種の異なる濃度(1 ng/ml、10 ng/ml、または100 ng/ml)のうちの1種のCRPを含む試料を抗CRPセンサーと15~20分間インキュベートし、金ナノ層の反射スペクトルの変化をモニタリングした。図2に示すように、センサー表面上に固定化されたC7抗CRP抗体へのCRPの結合時に、極めて最小限のピークシフトが認められた。その後、センサー表面を非標識C6抗CRP抗体(1 µg/ml)に暴露しても、さらなる有意なピークシフトは生じなかった。図2参照。同様に、その後、センサー表面を3 µg/mlのC6-CGCに暴露しても、さらなる反射スペクトルの変化は生じなかった。これは、結合したCRP分子はおそらく非標識C6抗体で飽和したことを示している。図2参照。

10

【0078】

第二の一連の実験では、3種の異なる濃度(1 ng/ml、10 ng/ml、または100 ng/ml)のうちの1種のCRPを含む試料を抗CRPセンサーと15~20分間インキュベートした。その後、2種の異なる濃度(1 µg/ml及び3 µg/ml)のC6-CGCを導入し、反射スペクトルの変化を測定した(図3及び4A)。これらの結果は、C6抗CRP抗体の金ナノ粒子への結合は、非標識C6抗体と比較してピーク波長シフトを増幅することを示している。C6-CGCの濃度を増加させると、用量依存的にピーク波長のシフトが生じる。しかしながら、1 ng/mlと10 ng/mlの間のシグナルの差は小さかった(図4B)。

20

【0079】

第三の一連の実験では、分析物のインキュベーション時間がシグナルの発達に与える影響を評価した。抗CRPセンサーを0 ng/ml、10 ng/ml、または100 ng/mlのCRPを含む試料と接触させ、分析物のインキュベーション時間または洗浄なしで直ちに3 µg/mlのC6-CGCを導入した。図5及び6に示す通り、分析物のインキュベーション時間が短いと、ピーク波長シフトが小さくなる。

【0080】

これら3組の実験の結果は、LSPRシグナルの増幅は、サンドイッチアッセイ形式において金ナノ粒子コンジュゲートを用いて実現されうるということを示している。非標識抗体と比較して、検出抗体が金コロイド粒子で標識されている場合にシグナルのシフトの増強が認められ、それによって、ナノグラム濃度の分析物の検出が可能になる。

30

【0081】

実施例3．金でコーティングされた銀ナノ構造体でのシグナル増幅の増強

結合パートナーを標識するために使用される金属の種類を変えることがLSPRシグナルの増幅に影響したかどうかを調べるため、複合金属ナノ構造体を調製した。具体的には、金でコーティングされた銀ナノ構造体を以下のようにして調製した。室温で激しく攪拌しながら50.0 mLの脱イオンH₂O、500.0 µLのクエン酸三ナトリウム(75 mM)、200 µLのAgNO₃(200 mM)、及び500.0 µLのH₂O₂(27%)を添加することによって、銀ナノ構造体を調製した。その後、この水溶液に500 µLのアリコートNaBH₄(200 mM)を速やかに注入し、淡黄色への変色を引き起した。数分にわたり、暗黄色から赤色、紫色へと変色が続き、最終的に青色で安定した。UV/可視スペクトルは、当該溶液のピーク吸光度を604.5 nmに決定した。

40

【0082】

この青色溶液5.0 mLを、50 µLのポリビニルピロリドン(PVP MW 10,000 20%エタノール溶液)と50 µLのHAuCl₄(20 mM)の混合物に添加することによって、銀ナノ構造体に金コーティングが追加された。72時間のインキュベーション時間の後、この試料は暗赤色になり、ピーク吸光度534.5 nmを呈した。これらナノ粒子を、20,000 rpmで20分間の遠心分離によって2度洗浄し、2.0

50

m Lの脱イオンH₂Oに再懸濁した。この溶液は深紅色、吸収ピーク530.3 nm、及び総吸光度15.0 OD単位を呈した。

【0083】

600.0 μLのAu@AgNPと20.0 μLのC6抗CRP抗体(8.0 mg/mL)を880.0 μLの脱イオンH₂Oに添加することによって、金でコーティングされた銀ナノ構造体(Au@AgNP)がC6抗CRP抗体にコンジュゲートされたが、最終的な抗体濃度は17.8 μg/mL/ODであった。4 で2時間のインキュベーション期間の後、この試料を30,000 gで20分間遠心分離し、PBS中にBSA(10 mg/mL)を含むブロッッキング溶液1.5 mLに再懸濁した。抗CRP C6抗体にコンジュゲートしたこのAu@AgNPは、さらなる使用まで4 で保管した。

10

【0084】

実施例2に記載の通りに抗CRP金ナノ層センサーを調製したところ、530 nmにピーク吸収を呈した。固定化抗体なしの金ナノ層を含有する対照センサーも調製した。これらのセンサーは100 μLのPBSで平衡化した。

【0085】

PBSで1.5 ODまで希釈された、Au@AgNPとコンジュゲートしているC6抗CRP抗体100 μLを、1、10、または500 pg/mLのCRP抗原と1分間予備混合した。その後、当該混合物を、抗CRPセンサー表面または対照センサー表面と接触させ、金ナノ層表面の反射スペクトルの変化を測定した。これらの結果は、CRP-抗体複合体のセンサー表面への結合によって誘導されたピーク波長シフトが、金でコーティングされた銀ナノ構造体によって増強されたことを示している(図7)。金でコーティングされた銀ナノ構造体を用いたところ、1 pg/mLのCRP抗原の検出が可能であったが、これは、金ナノ粒子で得られたものと比較して1000倍の感度向上である。抗原が高濃度の場合には結合部位が飽和し、さらなるシフトは生じない。

20

【0086】

本実験の結果は、複合ナノ構造体(例えば、金でコーティングされた銀ナノ構造体)を用いて分析物の結合パートナーを標識した場合に、金属ナノ層表面からのLSPRシグナルの顕著に増強された増幅が実現されることを実証している。

【0087】

実施例4. 光学濃度が高いナノ構造体の合成

30

以下の試薬を、示した順番に混合し、最終体積1 mLの金ナノ粒子を調製した: 0.1 mLの1% PVP-10(1% wt/wt)、0.2 mLの0.1 M塩化金、0.1 mLの5 N NaOH、0.4 mLの水、及び0.2 mLの1 Mアスコルビン酸。反応混合物は、毎添加後に混合した。この反応の大部分は室温で24時間後に完結したことが、分光計測によって示された。本プロトコルによって、LSPRピーク約535 nmと、対応する光学濃度約80 / mLを示す球状金ナノ粒子が得られた。さらなる金または銀の積層は、あらかじめ形成された金ナノ粒子に硝酸銀または塩化金を添加して行った。過剰の試薬は30,000 gでの1~2時間の遠心分離によって除去した。

【0088】

別の反応では、20%のPVP(wt/wt)0.05 mLを水0.25 mL、5 NのNaOH 0.1 mL、1 Mのクエン酸ナトリウム 0.1 mL、0.1 Mの塩化金 0.5 mL、及び1 Mのアスコルビン酸 1 mLと混合した。本プロトコルは、OD約90 / mLで、LSPRピーク約525 nmの金コロイド粒子の即時形成をもたらした。最終的な反応混合物中、金2.5 mMと金25 mMの間で、最終的なODと金濃度の間に直線状の対応が認められた。

40

【0089】

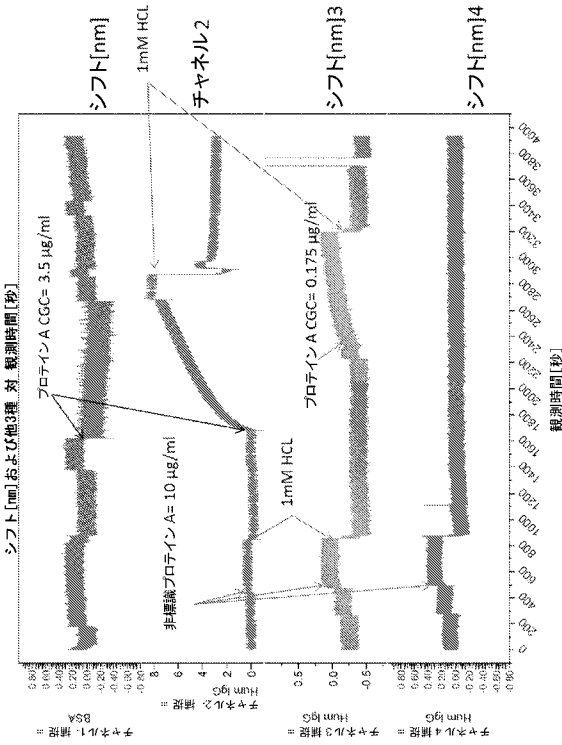
本開示の発明は、特定の方法に限定されず、これらのように記載されたプロトコル及び材料は変えることができることが理解される。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであって、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図しないこともまた理解される。

50

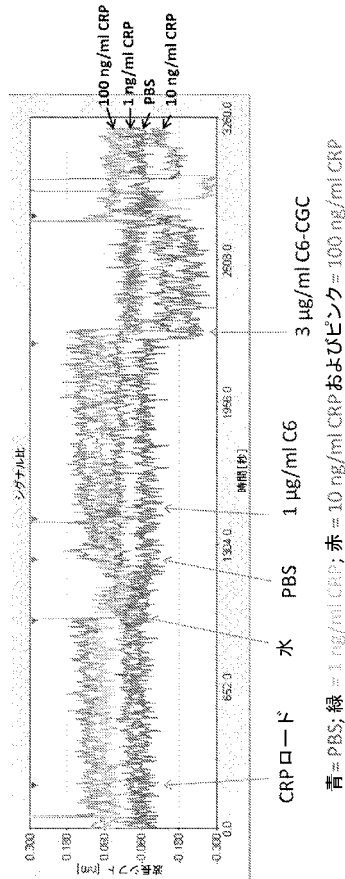
【0090】

当業者には、通常に過ぎない実験を用いて、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認め、または確認することが可能になろう。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲に含まれるように意図される。

【図1】

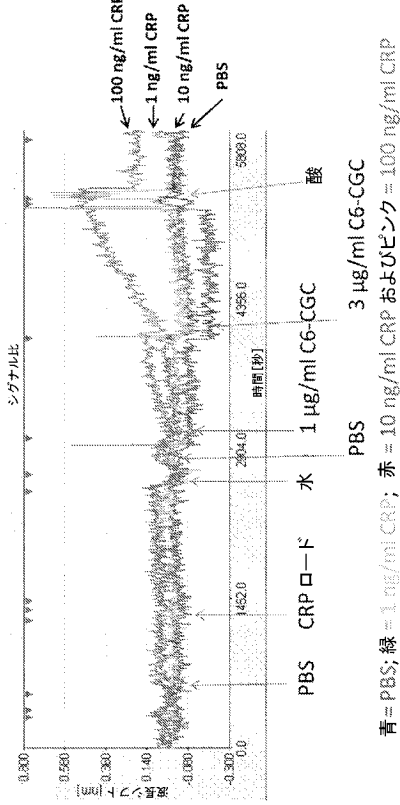


【図2】

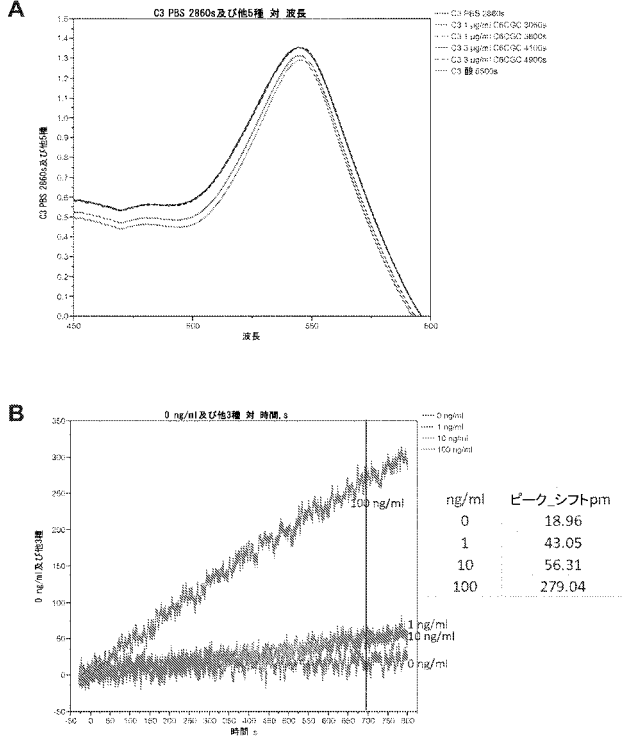


青 = PBS; 緑 = 1 ng/ml CRP; 赤 = 10 ng/ml CRP および ピンク = 100 ng/ml CRP

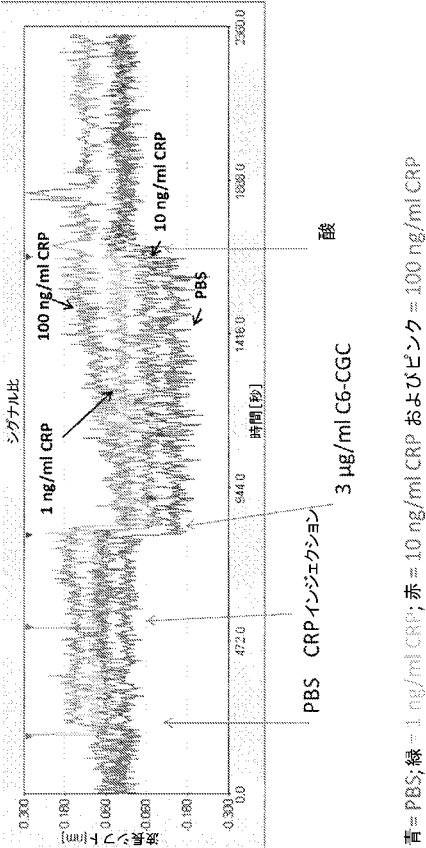
【 図 3 】



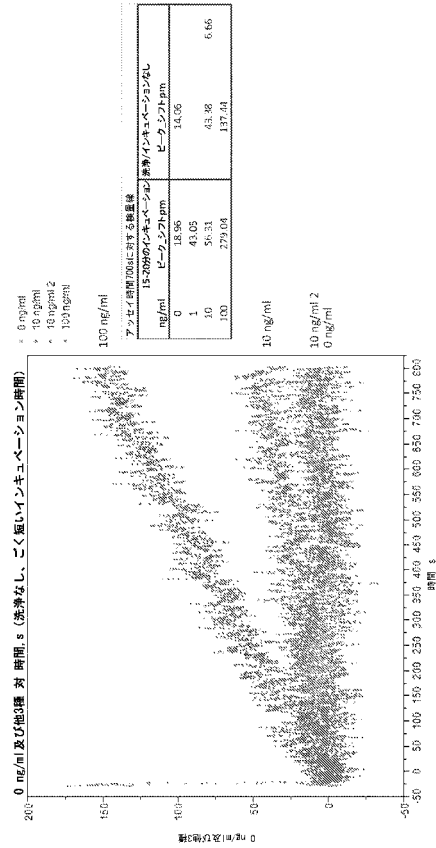
【 図 4 】



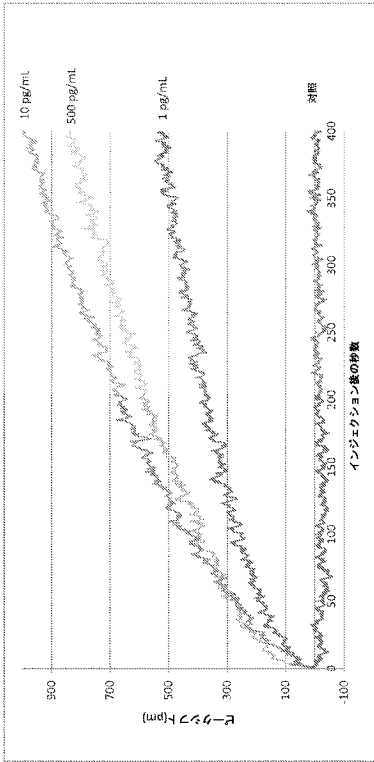
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/45041															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53; C07K 14/00; C40B 40/10 (2015.01) CPC - G01N 33/53, 33/5302 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01N 33/53; C07K 14/00; C40B 40/10 (2015.01) CPC - G01N 33/53, 33/5302 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: G01N 33/53, 33/5302 (text search) USPC: 435/7.1, 7.92; 506/18 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Patents; Google Scholar Search terms: Surface plasmon detection device, plasmon ELISA, spherical nanoparticle, nanolayer, nanoshell, binding partner, antibody, antigen, gold, silver, Erlichia sp.																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X ----- Y</td> <td>WO 2014/05927 4 A1 (ABAXIS, Inc) 17 April 2014 (17.04.2014). Especially para [0007], [0016], [0022], [0033], [0082], [0083], [0092].</td> <td style="text-align: center;">1, (3-6, 10-18)/1, 19, (22-23)/1 (7-9)/1, 20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2007/0054337 A1 (FERNING et al.) 08 March 2007 (08.03.2007). Especially para [0026].</td> <td style="text-align: center;">(7,8)/1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2013/0172207 A1 (DAI et al.) 04 July 2013 (04.07.2013). Especially para [0025], [0104].</td> <td style="text-align: center;">9/1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>LamdaGen. Plasmonic ELSA. [online] 21 April 2014 [retrieved 27 November 2015]. Available on the internet at <URL: http://web.archive.org/web/20140421112507/http://lamdagen.com/lpr-overview/plasmonic-elisa/> Especially pg 1; see right panel, steps 2-3</td> <td style="text-align: center;">20</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X ----- Y	WO 2014/05927 4 A1 (ABAXIS, Inc) 17 April 2014 (17.04.2014). Especially para [0007], [0016], [0022], [0033], [0082], [0083], [0092].	1, (3-6, 10-18)/1, 19, (22-23)/1 (7-9)/1, 20	Y	US 2007/0054337 A1 (FERNING et al.) 08 March 2007 (08.03.2007). Especially para [0026].	(7,8)/1	Y	US 2013/0172207 A1 (DAI et al.) 04 July 2013 (04.07.2013). Especially para [0025], [0104].	9/1	Y	LamdaGen. Plasmonic ELSA. [online] 21 April 2014 [retrieved 27 November 2015]. Available on the internet at <URL: http://web.archive.org/web/20140421112507/http://lamdagen.com/lpr-overview/plasmonic-elisa/ > Especially pg 1; see right panel, steps 2-3	20
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X ----- Y	WO 2014/05927 4 A1 (ABAXIS, Inc) 17 April 2014 (17.04.2014). Especially para [0007], [0016], [0022], [0033], [0082], [0083], [0092].	1, (3-6, 10-18)/1, 19, (22-23)/1 (7-9)/1, 20															
Y	US 2007/0054337 A1 (FERNING et al.) 08 March 2007 (08.03.2007). Especially para [0026].	(7,8)/1															
Y	US 2013/0172207 A1 (DAI et al.) 04 July 2013 (04.07.2013). Especially para [0025], [0104].	9/1															
Y	LamdaGen. Plasmonic ELSA. [online] 21 April 2014 [retrieved 27 November 2015]. Available on the internet at <URL: http://web.archive.org/web/20140421112507/http://lamdagen.com/lpr-overview/plasmonic-elisa/ > Especially pg 1; see right panel, steps 2-3	20															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 27 November 2015 (27.11.2015)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">26 JUL 2016</div>															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/45041

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
----Go to Extra Sheet for continuation----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, (3-18)(in part), 19, 20, (22-23) (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/45041

-----Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)-----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

- Group I: Claims 1, (3-18)(in part), 19, 20, (22-23) (in part), drawn to an analyte detection device comprising metallic nanostructures coupled binding partners that are capable of specifically binding to a target analytes.
 Group II: Claims 2, (3-18) (in part), 21, (22-23) (in part) drawn to an analyte detection device comprising metallic nanostructures coupled to target analytes.
 Group III: Claims 24-39, drawn to a method of detecting a target analyte in a sample.
 Group IV: Claims 40-42, drawn to a method for preparing composite metallic nanostructures.
 Group V: Claims 43-54, drawn to a composition comprising an assay complex.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a device comprising metallic nanostructures coupled binding partners that are capable of specifically binding to a target analytes, not required by Groups II-V.

Group II has the special technical feature of a device comprising metallic nanostructures coupled to target analytes, not required by Groups I, III-V.

Group III has the special technical feature of a method involving the step of contacting a sample with detection conjugates and then contacting the mixture with a surface contain a metallic nanolayer with immobilized capture molecules, not required by Groups I, II, IV or V.

Group III has the special technical feature of a method involving exposing the surface to a light source at a wavelength range within the ultraviolet-visible-infrared spectrum; and measuring an optical signal from the surface, wherein a change in the optical signal indicates the presence of the target analyte in the sample, not required by Groups I, II, IV or V.

Group IV has the special technical feature of a method for preparing composite metallic nanostructures, not required by Groups I-III or V.

Group V has the special technical feature of a composition comprising a target analyte comprising a first epitope and a second epitope, not required by Groups I-IV.

Group V has the special technical feature of a composition comprising a complex comprising detection conjugate, target analyte, and capture molecule, not required by Groups I-IV.

Common Technical Feature:

1. Groups I, II, III, IV and V share the common the technical feature of metallic nanostructures.
2. Groups I, III and V share the common technical feature of metallic nanostructures coupled to binding partners capable of binding to or bound to a target analyte.
3. Groups I, II, III and V share the common technical feature of capture molecules immobilized on a metallic nanolayer capable of binding to target analyte.
4. Groups III and V share the common technical feature of a complex of metallic nanostructure coupled to a binding partner bound to a target analyte, where the target analyte is also bound by a capture molecule immobilized on a nanoparticle nanolayer.

However, said common technical features do not represent a contribution over the prior art, and are obvious over WO 2014/059274 A1 to MEHRA et al. (hereinafter "Mehra") [published 17 April 2014], in view of the online publication "Plasmonic ELISA" by LamdaGen (hereinafter "LamdaGen") [available on the internet at <URL: <http://web.archive.org/web/20140421112507/http://lamdagen.com/spr-overview/plasmonic-elisa/>> available on 21 April 2014].

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/45041

----continued from previous sheet-----

As to common technical features #1, #2 and #3, Mehra teaches metallic nanostructures and metallic nanolayer and capture molecule bound to either (Para [00106]: " In certain embodiments, the detecting step comprises performing an ELISA [.....] measuring or determining a change in the surface plasmon resonance or localized surface plasmon resonance wavelength resulting from binding of antibodies to peptides attached to metallic nanolayers or metallic nanoparticle/nanoshells"). Although Mehra does teach a secondary antibody bound to a nanostructure and also sandwich ELISA (para [00130]" metallic nanoparticles or metallic nanoshells (e.g., colloidal gold, etc.) conjugated to [.....] antibodies capable of detecting sample antibodies (e.g., anti-human IgG or IgM antibodies, anti-dog IgG or IgM antibodies, anti-cat IgG or IgM antibodies, etc.), in the case of a sandwich assay). Mehra does not specifically teach using a metallic nanostructure coupled to a binding partner capable of binding to a target analyte in combination with a capture molecules immobilized on a metallic nanolayer capable of binding to the target analyte . However, such an arrangement could have devised without undue effort with the tools taught by Mehra and used for plasmon detection, as taught, for example, by LamdaGen (see pg 1 Plasmonic ELISA illustrations 2 and 3).

Common technical feature #4 is obvious based on the discussion set forth above (for common technical features #1- #3), and the fact that LamdaGen teaches a sandwich complex with a capture antibody coupled to a solid support and bound to target analyte and also detection antibody bound to the target analyte (see pg 1 Plasmonic ELISA illustration 3).

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 21/41 (2006.01) G 0 1 N 33/542
 G 0 1 N 21/41 1 0 2

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

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 メーラ ラジェッシュ ケイ .
 アメリカ合衆国 9 4 5 4 4 カリフォルニア州 ヘーワード サウスウイック ドライブ 2 5
 4 1 0 # 1 0 9

(72)発明者 チャン ヴィンセント
 アメリカ合衆国 9 4 5 8 2 カリフォルニア州 サンラモン アンドレアス ウェー 1 2 0 7

(72)発明者 アロン ケニス ピー .
 アメリカ合衆国 9 4 1 1 0 カリフォルニア州 サンフランシスコ フェア オークス ストリ
 ート 2 0 1

(72)発明者 クレル アッシャー
 アメリカ合衆国 3 5 2 2 2 アラバマ州 バーミングハム エセックス ロード 8 1 8

F ターム(参考) 2G059 AA01 AA05 BB04 BB13 CC13 CC17 CC20 EE01 EE02 EE06
 GG01 HH01 HH02 HH03 MM04

专利名称(译)	在等离子体特异性结合配偶体测定中的信号放		
公开(公告)号	JP2017524140A	公开(公告)日	2017-08-24
申请号	JP2017507701	申请日	2015-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	艾巴希斯公司		
申请(专利权)人(译)	Abakushisu公司		
[标]发明人	メーララジェッシュケイ チャンヴィンセント アロンケニスピー クレルアッシャー		
发明人	メーラ ラジェッシュ ケイ. チャン ヴィンセント アロン ケニス ピー. クレル アッシャー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/53 G01N33/542 G01N21/41		
CPC分类号	G01N33/553 B82Y15/00		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/569.L G01N33/569.F G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/542 G01N21/41.102		
F-TERM分类号	2G059/AA01 2G059/AA05 2G059/BB04 2G059/BB13 2G059/CC13 2G059/CC17 2G059/CC20 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/EE06 2G059/GG01 2G059/HH01 2G059/HH02 2G059/HH03 2G059/MM04		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/037071 2014-08-13 US 62/082468 2014-11-20 US		
其他公开文献	JP2017524140A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分析物检测装置和使用这种装置来检测样品中痕量目标分析物的方法。特别地，本发明提供了一种分析物检测装置，其包括结合到分析物结合配偶体上的多个复合金属纳米结构和包含多个固定有捕获分子的金属纳米层的表面。提供。还描述了制备复合纳米结构的方法。

FIGURE 1

