

(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2010-501067

(P2010-501067A)

(43) 公表日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 29/02 (2006.01)	GO 1 N 29/02	2 G O 4 7
HO 3 H 9/25 (2006.01)	HO 3 H 9/25	5 J O 9 7
HO 3 H 9/145 (2006.01)	HO 3 H 9/145	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	HO 3 H 9/145	D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	HO 3 H 9/145	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-524077 (P2009-524077)
 (86) (22) 出願日 平成19年8月17日 (2007. 8. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年4月17日 (2009. 4. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2007/000378
 (87) 国際公開番号 W02008/019693
 (87) 国際公開日 平成20年2月21日 (2008. 2. 21)
 (31) 優先権主張番号 PA200601073
 (32) 優先日 平成18年8月17日 (2006. 8. 17)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 506388510
 アトノミックス アクティーゼルスカブ
 デンマーク デーコー2450 コペンハーゲン
 エスヴェー ヴェストレ テグルガーデ 10
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74) 代理人 100109335
 弁理士 上杉 浩

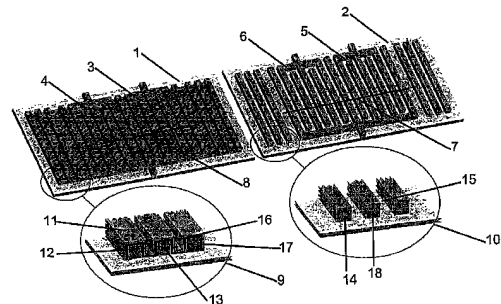
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 目標検体を検出するための、生体表面音響波 (SAW) 共振器増幅

(57) 【要約】

本発明は一般に、蛋白質や核酸を含む目標検体を含有するテストサンプルを分析するためのSAW共振器マイクロセンサに対する信号増幅方法に関する。本発明は、圧電性基板表面上に配置された反射器マイクロチャネルと複数の3次元インターデジタルトランスデューサ電極 (IDTE) とを備えた、少なくとも1つの表面音響波共振器ユニットに関する。本発明は、更に、上記3次元マイクロチャネル中の固体/液体体積比の変化に関する。液体/固体体積比におけるその変化は、テストサンプル中の目標検体濃度に相関して検出することが可能である。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面音響波 (S A W) 共振器ユニットであって、

(a) 圧電性基板と、

(b) 少なくとも 1 つのインターデジタルトランスデューサ電極 (I D T E) 構造体と

、

(c) 少なくとも 1 つの反射器構造体と、

を備え、

前記 (b) における I D T E 構造体内には 3 次元マイクロチャンネルが形成されており

、前記 (c) における反射器構造体内には 3 次元マイクロチャンネルが形成されており、

更に前記共振器ユニットが表面固定化された分子認識成分を含む、

共振器ユニット。

10

【請求項 2】

前記固定化された分子認識成分は、更に、検体種を含む目標種と第 2 の分子認識成分とに結合される、請求項 1 に記載の共振器ユニット。

【請求項 3】

前記第 2 の分子認識成分は酵素結合型抗体である、請求項 2 に記載の共振器ユニット。

【請求項 4】

少なくとも 2 つの近接した I D T E は 1 0 n m から 1 m i c r o n の間の高さを有し、該近接した電極間のマイクロチャンネルは 1 0 0 n m から 1 0 m i c r o n の間の幅を有する、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

20

【請求項 5】

少なくとも 2 つの近接した反射器は 1 0 n m から 1 m i c r o n の間の高さを有し、近接した電極間のマイクロチャンネルは 1 0 0 n m から 1 0 m i c r o n の間の幅を有する、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

【請求項 6】

少なくとも 2 つの近接した I D T E / 反射器ジャンクションは 1 0 n m から 1 m i c r o n の間の高さを有し、該近接した構造間のマイクロチャンネルは 1 0 0 n m から 1 0 m i c r o n の間の幅を有する、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

【請求項 7】

基質は、ジアミノベンジジン (D A P) 、アミノエチルカルバゾール (A E C) 、テトラメチルベンジジン (T M B) 、ないしは 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸塩 (B C I P) / ニトロブルーテトラゾリウム (N B T) 、を含む一群より選択される

、

請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

30

【請求項 8】

追加の絶縁被膜を少なくとも 1 つ有する、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

【請求項 9】

検体種は、血液、血清、血漿、排泄物、脊髄中心液、及び尿からなる一群より選択される哺乳類流体サンプルより抽出される、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の共振器ユニット。

40

【請求項 10】

請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の表面音響波 (S A W) 共振器ユニットを少なくとも 1 つ備えた、マイクロセンサ。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の表面音響波 (S A W) 共振器ユニットのセットを少なくとも 1 つ備えた、請求項 10 に記載のマイクロセンサ。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの、固定化された分子認識成分を含まない参照表面音響波 (S A W) 共

50

振器ユニットを更に備えた、請求項 10 又は 11 に記載のマイクロセンサ。

【請求項 13】

固定化された分子認識成分を含まない参照表面音響波 (SAW) 共振器ユニットのセットを少なくとも 1 つ備えた、請求項 12 に記載のマイクロセンサ。

【請求項 14】

請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載のマイクロセンサを備えた、目標検体を検出するための、手持ち型デバイス。

【請求項 15】

サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) 検体種を、請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載された表面音響波 (SAW) 共振器ユニットの表面に固定化された、少なくとも 1 つの第 1 の認識成分に接触させ、それにより、該検体と該第 1 の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 前記共振器ユニット上での前記検体の結合における質量増加を測定する段階と、を含む、方法。

【請求項 16】

サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) 検体種を、請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載された表面音響波 (SAW) 共振器ユニットの表面に固定化された、少なくとも 1 つの第 1 の認識成分に接触させ、それにより、該検体と該第 1 の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 前記複合体を、酵素連結型の第 2 の認識成分に接触させる段階と、

(c) 前記共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、それにより、該基質は、(b) における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 前記沈殿物を、前記共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、

を含む、方法。

【請求項 17】

前記検体は、トロポニン I、トロポニン T、BNP、H-FABP、アレルゲン、及び IgE よりなる一群より選択される、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 18】

サンプル中の目標検体の検出における信号を測定するための、請求項 10 乃至 14 のいずれかに記載されたマイクロセンサの使用。

【請求項 19】

前記目標検体は、トロポニン I、トロポニン T、BNP、H-FABP、アレルゲン、及び IgE よりなる一群より選択される、請求項 14 に記載のマイクロセンサの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は一般に、SAW 共振器ユニットと、そのユニットを備えた、テストサンプルを分析するために有用であるようなマイクロセンサとに関する。

【0002】

本発明は、更に、圧電性基板表面上に配置された反射器チャネルと複数の 3 次元インターデジタルトランスデューサ電極 (IDTE) とを備えた、表面音響波共振器ユニットに関する。

【0003】

本発明は、更に、上記 3 次元マイクロチャンネル中の固体 / 液体体積比の変化に関する。液体 / 固体体積比におけるその変化は、テストサンプル中の目標検体濃度に相関して検出することが可能である。そのマイクロセンサは、多くの化学的、環境上、及び医学的用途に適用される。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

背景

例えば生物検体のような検体を高感度で検出することは、分析的検出方法における重要な課題であり続けている。検出方法においては、複数のサンプルを処理することがしばしば要求される。加えて、分析的検出方法は、簡単で、迅速で、そして再現可能であるべきである。このことは、例えば診断方法のような高度に専門的な方法及び試薬を利用することができない場合において、とりわけ重要である。

【0005】

従来の生物学的分析方法には、具体的に幾つかの欠陥がある。例えば、混成プローブが放射性ラベルを含有するときには、オートラジオグラフィ、又は蛍光物質イメージ分析によって、又は、混成プローブが、例えばビオチンやジゴキシンのようなラベルを含有するときには密度計によって、一般的には核酸分子の混成が検出される。それから、そのラベルを、酵素共役抗体又は配位子によって認識することができる。最新の生体分子検出方法の多くは、例えばDNA、RNA、又は蛋白質等の分子を修飾することを必要とするのであり、このことによって、現在の検出方法は高価で手間のかかるものとなっている。

【0006】

音響波センサ技術は、検出物質における幅広い応用性を示した。音響波センサは、音響波を発生させ、そして観測することにより、物質を検出する。音響波が物質の表面を通過して伝播するとき、又は物質表面上を伝播する時には、伝播経路の特性に対する如何なる変化も、波の速度、及び/又は振幅に影響する。センサにおける、振幅、周波数、及び/又は位相特性を測定し、対応する物理量に相関付けることが可能である。

【0007】

幾つかの、異なったタイプの音響波デバイスが開発されているが、しかしながらその全ては、水溶性サンプル又は生体サンプルの測定において、わずかな成功しか収めていない。バルク音響波(BAW)は、媒体を通じて伝播する。最も一般に使われているBAWデバイスは、厚みすべりモード(TSM)共振器である。最も一般的なタイプは、石英結晶マイクロバランス、及び、せん断水平音響プレートモード(SH-APM)センサである。反対に、基板の表面上を伝播する波は、表面波として知られている。最も広く用いられている表面波デバイスは、表面音響波センサ、及びせん断水平表面音響波(SH-SAW)センサであって、それは表面横断波(STW)センサとしても知られている。全ての音響波センサは、気体、又は真空の環境において機能するであろう。しかしながら、それらの中で、液体と接触している場合において効率よく動作するものは殆どない。

【0008】

液体検出のための、公知の音響センサにおいて、せん断水平SAWの特殊な型であるラブ波のセンサは、最も高い感度を有する。ラブ波センサを作成するため、SH-SAWデバイス上には、せん断水平波のエネルギーがその被膜に集中するような、誘電性導波被膜が取り付けられる。その後、その導波被膜上には生体認識被膜が取り付けられ、完全な生体センサを形成する。ポリマーラブ導波被膜を用い、110MHz YZ-cut SH-SAWを使つての、ng/mlの濃度範囲における抗ヤギIgGの検出が成功している(非特許文献1)。

【0009】

異なったSAWセンサの間での比較については、最近説明がなされている(非特許文献2)。GizeliとLoweとは、1.92mg/cm²の感度を有する124MHzラブ波センサを説明している。生体化合物の検出にSAWセンサを用いることは、例えば、特許文献1, 2, 及び3において報告されている。その各々は、参照により、その全てがここへと組み入れられている。

【0010】

伝播波の垂直成分が液体-空気障壁によって抑制されるので、従来のSAWデバイスを液体検出のために選択することは芳しいものではない。液体中で機能するような音響波センサの1つとしては、せん断水平SAWセンサがある。圧電性結晶物質の切断部(カット)を適切に回転させれば、波は水平に、そして液体表面に平行に、伝播する。これにより

10

20

30

40

50

損失は飛躍的に減少するのであり、液体が伝播媒体と接触するようになったときに、S H - S A W センサが生体センサとして動作することが可能となる。例えば生体分子のような、溶液検体の検出における多くの取り組みは、音響波と固体 / 液体界面の性質との間の相互作用を定めることや、G H z 範囲で動作するような高周波数 S A W デバイスを設計することに集中していた。

【 0 0 1 1 】

本発明は、S A W デバイスが液体中で生体分子を含むような検体を測定できないことについての解決手段を与える。

【 0 0 1 2 】

免疫測定において S A W デバイスを用いることは、過去に説明されている。これらのデバイスは、2つの電極間に挟まれた単一の結晶ウエハで構成される。電極には、石英結晶をその共振周波数でドライブする外部の発振器回路へと、これらデバイスを接続するための手段が備えられている。この周波数は、結晶の質量や、その結晶の電極領域に閉じ込められた、あらゆる層の質量に依存する。すなわち、電極表面上、又はそれら電極上のあらゆる層中の質量の変化によって、周波数が変わる。一般には、これらデバイスにおける、その共振周波数の変化を、質量変化の総計と相関付けることが可能である。

10

【 0 0 1 3 】

1980年12月2日に R i c e に対して交付された、米国特許第 4 , 2 3 5 , 9 8 3 号 (特許文献 4) においては、抗体の特定サブクラスを決定するための方法が開示されている。その方法は、決定されるべき抗体に対する抗原に固有な 2 次元表面に結合された、
圧電発振器を利用する。抗原被膜された発振器は、未知量の抗体を含有する溶液に曝される。溶液中の抗体が発振器上の抗原に加えられた後、発振器は、いわゆるサンドイッチ物質に曝され、それは決定されている抗体の固有サブクラスと選択的に結合する。発振器の周波数は、サンドイッチ物質に曝される前後の乾燥した状態において測定される。周波数の変化は、2次元発振器表面に結合された抗体サブクラスの量に関連する。標準曲線を参照することにより、溶液中の抗体サブクラスの量を決定することができる。

20

【 0 0 1 4 】

R o e d e r e r 等は、圧電性石英結晶を用いた、その場での免疫測定、特に表面音響波デバイスを開示している。ヤギ抗ヒト I g G は、2次元石英結晶表面上で、カップリング媒体を用いて固定化されていた。圧電性結晶は、それから電気発振器回路内に置かれ、
抗原ヒト I g G の検出のためにテストされた。検出は、吸着による表面質量の変化が結晶の共振周波数のシフトとして反映されるという事実に基づくものであった。その方法は感度に乏しく、そして検出限界も芳しいものではないと、その著者らは結論付けている。その著者らはまた、検出されるべき抗原は高分子量のものでなくてはならず、この方法論によって低分子量検体を直接検出することは不可能であるとも結論付けている (非特許文献 3) 。

30

【 0 0 1 5 】

N g e h - N g w a i n b i 等は、気相中のパラチオン分析に用いられるようなパラチオンに対する抗体で被膜された圧電性石英結晶を使用することを述べている。被膜された抗体が、気相中の直接反応によりパラチオンと結合する時、結果として生じる結晶についての質量変化は、農薬の濃度に比例した周波数シフトを生み出す (非特許文献 4) 。

40

【 0 0 1 6 】

1991年3月12日に W a r d に対して交付された、米国特許第 4 , 9 9 9 , 2 8 4 号 (特許文献 5) においては、石英結晶マイクロバランス分析を用いた方法が開示されている。そこにおいては、検体の、石英結晶マイクロバランス (Q C M) 上、又は近傍表面への結合が、酵素を含む複合体によって検出される。その酵素は、基板における質量変化をもたらして、故に共振周波数のシフトをもたらすような、Q C M の 2 次元表面上への堆積、又は、それとの反応が可能な生成物への変換に対する触媒作用を及ぼす能力を有している。しかしながら、周波数は、抗 A P S 還元酵素抗体を用いた検体 A P S 還元酵素の 0 . 2 4 n g / m l の濃度において 3 0 分間で 4 0 6 H z 変化するのみであり、0 . 0 0 2

50

ng/ml (2 pg/ml) の濃度において、30分間で6.3 Hz 変化するのみであった。2次元QCM表面に異なった修飾を用いて、その著者は、0.025 ng/ml (25 pg/ml) の検体濃度において30分間で22 Hz の変化を得ることに成功している。この結果は、検出ノイズレベル以下でなければ、非常に低い (pg/ml 範囲の) 濃度において、差分Hz変化は下がるということを示唆している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】米国特許第5,478,756号

【特許文献2】国際公開第9201931号

10

【特許文献3】国際公開第03019981号

【特許文献4】米国特許第4,235,983号

【特許文献5】米国特許第4,999,284号

【特許文献6】米国特許出願第20060024813号

【特許文献7】米国特許第5,130,257号

【特許文献8】米国特許第5,283,037号

【特許文献9】米国特許第5,306,644号

【特許文献10】米国特許第5,846,708号

【非特許文献】

【0018】

20

【非特許文献1】E. Gizeli et al. 1997. "Antibody Binding to a Functionalized Supported Lipid Layer: A Direct Acoustic Immunosensor," Anal Chem, Vol. 69:4808-4813

【非特許文献2】Biomolecular Sensors, Eds. Electra Gizeli and Christopher R. Lowe (2002)

【非特許文献3】Analytical Chemistry, Vol. 55, (1983)

【非特許文献4】J. Mat. Chem. Soc., Vol. 108, pp. 5444-5447 (1986)

30

【非特許文献5】F. Jose, et al. "Guided Shear Horizontal Surface Acoustic Wave Sensors for Chemical and Biochemical Detection in Liquids," Anal. Chem. 2001, 73, 5937

【非特許文献6】W. Welsch, et al., "Development of a Surface Acoustic Wave Immunosensor," Anal. Chem. 1996, 68, 2000-2004

【非特許文献7】M. Rapp, et al. "Modification of Commercially Available LOW-LOSS SAW devices towards an immunosensor for in situ Measurements in Water" 1995 IEEE International Ultrasonics Symposium, Nov. 7-10, 1995, Seattle, Wash

40

【非特許文献8】N. Barie, et al., "Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave biosensors," Biosensors & Bioelectronics 16 (2001) 979

【非特許文献9】K. Vijayamohan et al. "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications," Biosensors

50

& Bioelectronics 17 (2002) 1-12

【非特許文献10】George M. Whitesides et al. "Array of Self-Assembled Monolayers for Studying Inhibition of Bacterial Adhesion." Anal Chem 2002, 74, 1805-1810

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

質量変化が抗原抗体間での免疫学的反応に起因するような圧電性ベース免疫測定は、一般に、2次元センサ表面が用いられるような状況下では、感度が乏しく、そして検出限界が芳しくはないものになってしまう可能性がある。したがって、当該技術において、分子認識成分、及びその目標検体の間での反応を増幅し、より鋭敏な分析をもたらすことが可能であるような、圧電性ベースの特異な結合分析が必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0020】

発明の開示

本発明者は、驚くべきことに、3次元構造を備えた表面音響波(SAW)共振器ユニットを用いるSAWセンサ技術と分子認識分子との組み合わせを用いて検体種を検出することが可能であることを発見した。

【0021】

20

その結果として、本発明は第1の態様において、

表面音響波(SAW)共振器ユニットであって、

(a) 圧電性基板と、

(b) 少なくとも1つのインターデジタルトランスデューサ電極(IDTE)構造体と

(c) 少なくとも1つの反射器構造体と、
を備え、

(b)におけるIDTE構造体内には3次元マイクロチャンネルが形成されており、(c)における反射器構造体内には3次元マイクロチャンネルが形成されており、更に共振器ユニットが表面固定化された分子認識成分を含む、

30

共振器ユニット、に関する。

【0022】

第2の態様において、本発明は、上述のとおり表面音響波(SAW)共振器ユニットを少なくとも1つ備えたマイクロセンサに関する。

【0023】

第3の態様において、本発明は、上記マイクロセンサを備えた目標検体を検出するための手持ち型デバイスに関する。

【0024】

第4の態様において、本発明は、

サンプル中の検体を検出するための方法であって、

40

(a) 検体種を酵素連結型の第2の認識成分に接触させ、それにより、検体と酵素連結型認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 複合体を、少なくとも1つの、上記表面音響波(SAW)共振器ユニットの表面に固定化された第1の認識成分に接触させる段階と、

(c) 上記(b)の共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、その基質は、(a)における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 沈殿物を、共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、

を含む、方法に関する。

【0025】

第5の態様において、本発明は、

50

サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) 検体種を、少なくとも1つの、上記表面音響波(SAW)共振器ユニットの表面に固定化された第1の認識成分に接触させ、それにより、検体と第1の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 複合体を、酵素連結型の第2の認識成分に接触させる段階と、

(c) 共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、それにより、その基質は、(b)における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 沈殿物を、共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、
を含む、方法に関する。

【0026】

第6の態様において、本発明は、サンプル中の目標検体の検出における信号を測定するための、上記に従ったマイクロセンサの使用に関する。

【0027】

本発明は、テストサンプル溶液中における目標検体の存在を検出するためのマイクロセンサであって、少なくとも1つの、しかしながら好ましくは2以上の表面音響波(SAW)共振器ユニットを備え、その各々は、圧電性基板と、上記基板表面上の反射器と複数のインターデジタルトランスデューサ電極(IDTE)とを備え、上記電極と反射器との間には3次元マイクロチャンネルが形成されており、上記SAW共振器ユニットは、上記IDTE構造体と反射器構造体との間に形成されたマイクロチャンネル内に固定化された少なくとも1つの分子認識成分を含み、テストサンプル中の目標検体を、少なくとも1つの分子認識成分と反応させ、第2の酵素結合型分子認識成分、又は酵素結合型検体と、更に反応させ、上記電極と反射器構造体との間に形成されたマイクロチャンネル中に堆積する不溶性の沈殿物へと変換され、それによって上記マイクロチャンネルにおける固体/液体体積比を減少させるような基質と、更に反応させ、上記マイクロチャンネルにおける上記固体/液体体積比変化は周波数または位相の信号変化をもたらすような、マイクロセンサに関する。

【0028】

SAW共振器センサタイプに対して、IDTEと反射器構造体との間の3次元マイクロチャンネル中における生体膜の剛性変化は、併せて、設定に依存しつつSAW共振器ユニットの周波数を増加又は減少させる。ヒドロゲル技術を用いたこの現象は、こことは別に、本発明と同一の発明者による米国特許出願第20060024813号(特許文献6)において、説明されている。

【0029】

本発明は、サンプル溶液中における目標検体の存在を検出するためのマイクロセンサへと向けられている。マイクロセンサは、センサ表面上に3次元マイクロチャンネル構造を有する、SAW共振器センサを備える。マイクロチャンネル構造は、目標検体を結合させることができる、固定化された分子認識成分を、更に備える。マイクロチャンネル内で、目標検体は更に、第2の酵素結合型分子認識成分、又は酵素結合型目標検体と反応し、更に、上記電極と反射器構造体との間に形成されたマイクロチャンネル中に堆積する不溶性の沈殿物へと変換され、それによって上記マイクロチャンネルにおける固体/液体体積比を減少させるような基質と、反応するのであり、上記マイクロチャンネルにおける上記固体/液体体積比変化は、周波数または位相の信号変化をもたらす。

【0030】

マイクロセンサは、また、参照表面音響波共振器マイクロチャンネル構造を備えていてもよい。完全な実施形態において、参照マイクロチャンネルは、分子認識成分を含有しない。代わりに、その参照をもって、目標検体を含まないサンプル溶液の測定をなすことが可能となる。センサマイクロチャンネルと参照マイクロチャンネルの信号の間での差により、目標検体の存在が決定される。

【0031】

分子認識成分における非制限的な例としては、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、P

10

20

30

40

50

NA及びLNA分子のような核酸類似体、蛋白質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを含む抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害薬、レセプター、配位子、キナーゼ、プロテインA、ポリウラシル(Poly U)、ポリアデニン(Poly A)、ポリリジン、トリアジン色素、ボロン酸、チオール、ヘパリン、多糖類、クマシー・ブルー、アズールA、金属結合ペプチド、砂糖、炭水化物、キレート剤、原核細胞、及び真核細胞が含まれる。

【0032】

目標検体における非制限的な例としては、核酸、蛋白質、ペプチド、抗体、酵素、炭水化物、化学化合物、及びガスが含まれる。別の典型的な目標検体としては、トロポニンI、トロポニンT、アレルゲン、又はIgEのような免疫グロブリンが含まれる。特定の適用において、目標検体は、2以上の分子認識成分を結びつけることができる。

10

【0033】

本発明は、また、サンプル溶液中の目標検体を検出するための方法へと向けられている。分子認識成分は、表面音響波センサの表面上に配置されたマイクロチャンネル内に固定化されている。センサは、サンプル中の検体における認識成分への結合を促進するような条件下で、サンプルと接触している。表面音響波における周波数又は位相シフトの変化が、その後に検出される。その変化により、サンプル中に検体の存在することが決定される。

【0034】

SAW共振器ユニットの振幅は、少なくとも1つの分子認識成分がテストサンプル中の目標検体と反応するために最適な条件へと調整されるべきである、ということが述べられている。振幅が大きすぎる場合、分子認識成分/検体の相互作用のために最適ではない条件に起因して、整合しない結果を得る可能性がある。

20

【0035】

テストサンプル中の検体を検出するための方法は、テストサンプル中の検体を、第1の認識成分、及び、酵素結合型検体についての第2の酵素結合型認識成分と反応させる段階と、基質を加える段階であって、その基質は上記結合された酵素によって不溶性の沈殿物へと変換される段階と、を含み、上記2つの段階はSAW共振器ユニットから分離された反応容器内で実行され、得られた上記不溶性の沈殿物は、能動的に上記SAW共振器ユニットへと輸送され、そこにおいて上記電極と反射器構造体との間に形成されたSAWマイクロチャンネルと接触しているものが、上記マイクロチャンネルにおける固体/液体体積比を減少させ、上記マイクロチャンネルにおける上記固体/液体体積比の変化は、周波数又は位相の信号変化をもたらす、上記信号変化が検体固有信号を生じさせる。

30

【0036】

目標検体を、任意のサンプル内で検出することが可能である。典型的なサンプルとしては、血液、血清、血漿、腹水、排泄物、脊髄中心液、尿、スミア、唾液が含まれる。この方法を、診断目的のために用いることが可能である。

【0037】

図面を参照しながら、本発明を、以下に詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

40

【0038】

【図1】図1は、参照番号1及び2によって一般的に指示される、2つのSAW共振器ユニットを図解している。各々のSAW共振器ユニットは、1つのIDTE部分(7, 8)と、2つの反射器部分(9, 10)と、からなる。マイクロチャンネル(4, 5)は、IDTE(3, 6)の間に配置される。同一のマイクロチャンネルは、反射器構造体の間にも配置される(15, 16)。全体としてのSAW共振器ユニット(1)3次元表面上には分子認識成分が固定化される(3, 17)一方、SAW共振器ユニット(2)上には分子認識成分が存在しない。反応層(11)は、検体と第2の酵素連結型分子認識成分と基質とを表す。基質が不溶性の沈殿物へと変換する時、マイクロチャンネル(16)における固体/液体体積比変化に起因して、反射器構造体(12, 13)間のマイクロチャンネル

50

ルスペース(16)が減少する。併せて、幾つかの理由により、SAW共振器ユニット(1)におけるIDTE間のマイクロチャンネルが減少する。SAW共振器ユニット(2)上の構造(14, 18)間において、マイクロチャンネル(15)の固体/液体体積比に変化は見られない。

【図2】図2は、同じ基板上の2つのSAW共振器ユニット(1, 2)を図解しており、それ以外は図1と同一である。

【図3】図3は、例1において更に説明される、用量反応曲線を図解している。

【図4】図4は、図1の(9)において図解される反射器構造体のAFM像を示している。数字1は、基板を表している。数字2は、反射器構造体を表している。数字3と4とは、反射器構造体間マイクロチャンネルの寸法を表している。

【図5】図5は、図4において示されるAFM像からの計算スキームを示している。ここでは、IDTEと反射器との構造の寸法について、幾つかの例が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0039】

発明の詳細な説明

定義

本件において用いられる「結合イベント」とは、SAWセンサの3次元マイクロチャンネル構造表面内に固定化された分子認識成分に、目標検体を結合させることを意味する。

【0040】

図面を参照することによって、本発明を理解できるのであり、そこにおいて同様の参照数字は同様の要素を指示するために用いられる。

【0041】

図1を参照すると、参照数字1及び2によって一般的に指示される、2つのSAW共振器ユニットからなるマイクロセンサが示されている。各々のSAW共振器ユニットは、1つのIDTE部分(7, 8)と、2つの反射器部分(9, 10)と、からなる。マイクロチャンネル(4, 5)は、IDTE(3, 6)の間に配置される。同一のマイクロチャンネルは、反射器構造体(15, 16)の間にも配置される。全体としてのSAW共振器ユニット(1)3次元表面上には分子認識成分が固定化される(3, 17)一方、SAW共振器ユニット(2)上には分子認識成分が存在しない。反応層(11)は、検体と第2の酵素連結型分子認識成分と基質とを表す。基質が不溶性の沈殿物へと変換する時、マイクロチャンネル(16)における固体/液体体積比変化に起因して、反射器構造体(12, 13)間のマイクロチャンネルスペース(16)が減少する。併せて、幾つかの理由により、SAW共振器ユニット(1)におけるIDTE間のマイクロチャンネルが減少する。SAW共振器ユニット(2)上の構造(14, 18)間において、マイクロチャンネル(15)の固体/液体体積比に変化は見られない。

【0042】

マイクロチャンネル(16)中に堆積することが可能な不溶性生成物を生み出すことが可能である、酵素/基質システムの例としては、アルカリホスファターゼや、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩(BCIP)がある。酵素的に触媒作用を受けるBCIPの加水分解により不溶性のダイマーが生み出され、ダイマーはマイクロチャンネル内に沈殿する。ガラクトース、グルコース、脂肪酸、脂肪酸エステル、アミノ酸のような、加水分解により開裂可能な官能基によって一部が置き換えられたリン酸塩を含む、類似した他の基質を、それらの補酵素と共に用いることが可能である。

【0043】

他の酵素/基質システムとしては、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)又はミエロペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ酵素と、ベンジジン(benzidine)、ベンジジン二塩酸塩、ジアミノベンジジン、o-トルイジン(o-tolidene)、o-ジアニシジン、及び、テトラメチルベンジジン、カルバゾール、特に3-アミノ-9-エチルカルバゾールのうちの1つを含むものがある(それらは全て、ペルオキシダーゼとの反応で沈殿物を形成するということが報告されている)。併せて、アルファヒ

10

20

30

40

50

ドロキシ酸オキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、及びキサンチンオキシダーゼ、のようなオキシダーゼを、フェナジンメトサルフェート-ニトロプルテトラゾリウム混合物のような、酸化しやすい基質システムと共に用いることが可能である。

【0044】

図2を参照すると、この図2は同じ基板上の2つのSAW共振器ユニット(1,2)を図解しており、それ以外は図1と同一である。

【0045】

図3を参照する。この図3は、例1において更に説明される。

【0046】

図4は、図1の(9)において図解される反射器構造体のAFM像を描写している。数字1は、基板を表している。数字2は、反射器構造体を表している。数字3と4とは、反射器構造体間マイクロチャンネルの寸法を表している。

【0047】

図5は、図4において示されるAFM像からの計算スキームを描写している。

ここにおいては、反射器とIDTEとの構造の寸法について、幾つかの例が示されている。

【0048】

表面音響波センサ

本発明において開示されるマイクロセンサには、少なくとも1つの表面音響波センサが含まれる。表面音響波センサは、圧電層、又は圧電性基板と、入力及び出力トランスデューサとを備える。表面音響波は圧電層内で発生し、インターデジタル化された電極によって検出される。以下で更に詳細に説明されるとおり、表面音響波センサの表面を変える結合イベントは、伝播している表面音響波における性質の変化として、検出可能である。表面音響波センサは、米国特許第5,130,257号(特許文献7)、同5,283,037号(特許文献8)、及び同5,306,644号(特許文献9)、そして非特許文献5及び6によって説明されている。その各々は、参照により、その全てがここに明示的に組み入れられている。

【0049】

圧電性基板を通過しての、又はその上での波伝播モードによって、音響波デバイスを説明する。音響波は、主にその速度と変位方向とによって区別される。物質と境界条件とに依存して、多くの組み合わせを考慮することができる。各々のセンサにおけるインターデジタルトランスデューサ電極(IDTE)は、基板を変位させ、ひいては音響波を形成するために必要である電場を与える。その波は基板を通過して伝播し、対向する電極のIDTEにおいて、変換され電場へと戻される。横波、又はせん断波は、波伝播方向に垂直な粒子変位を有するのであって、粒子変位が検出表面に対して平行又は垂直となるよう、偏波させることが可能である。せん断水平な波動運動は、検出表面に対して平行に偏波した横の変位を意味する。せん断垂直な運動は、その表面に垂直な横変位を示す。

【0050】

本件において用いられる「表面音響波センサ」又は「表面音響波デバイス」とは、実質的には上述されたとおりの方法で動作するような、あらゆるデバイスを意味するものである。幾つかの実施形態において、「表面音響波センサ」とは、表面変位が伝播方向に垂直であってデバイス表面に平行であるような表面横断波デバイスと、表面変位の少なくとも一部分がデバイス表面に垂直であるような表面音響波センサと、の両方に言及するものである。表面横断波デバイスは、一般には流体中において、より良い感度を有するのであるが、表面変位の一部分が、そのデバイス表面に垂直である場合においても、また十分な感度を得ることが可能であるということが、示されている。例えば、非特許文献7及び8等を参照されたい。それら全ては、参照により、その全てがここに明示的に組み入れられている。

【0051】

10

20

30

40

50

センサは、フォトリソグラフィ過程によって作成される。製造は、圧電性基板を慎重に研磨し、洗浄することから始まる。その後、金やアルミニウムのような金属を、基板上に一様に堆積させる。デバイスはフォトレジストでスピコートされ、焼いて固められる。その後、最終デバイス上で金属化されるべき領域に対応する不透明な領域を有するマスクを通して、UV光に曝される。その曝される領域は、現像液を用いてその領域を除去することを可能とするような、化学変化を起こす。最後に、残っているフォトレジストが除去される。デバイス上に残っている金属のパターンは、インターデジタルトランスデューサ (IDT)、又はインターデジタル電極 (IDE) と呼ばれる。IDTの長さ、幅、位置、及び厚さを変えることにより、センサの性能を最大化することが可能である。

【0052】

有意なバックグラウンド信号を含むサンプルの分子認識においては、しばしば信号を増幅することが必要となる。本発明者は、公知の分子法が、例えば結合された酵素のような増幅要素を備えた第2の認識成分が含まれるようにして、共振ユニットに対し、及び本発明に従った方法に対し適用可能であることを発見した。SAWセンサは、酵素によって開裂された基質の沈殿におけるセンサ表面の質量増加に対して、非常に効率よく応答した。したがって、好ましい態様において、共振器ユニットは更に、検体への結合後に第2の分子認識成分を含む。この第2の分子認識成分は、酵素連結型抗体であることが好ましい。

結合された酵素は、アルカリホスファターゼ (ALP)、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) であることが好ましい。

【0053】

検体と分子認識要素との間の結合において変わる信号に関して最良の結果を得るために、共振器ユニットは、10nmから1micronの間の高さを有し、それらの間のマイクロチャンネルが100nmから10micronの間の幅を有するような、少なくとも2つの近接したIDTEを備えるべきである。

【0054】

検体と分子認識要素との間の結合において変わる信号に関して最良の結果を得るために、共振器ユニットは、10nmから1micronの間の高さを有し、それらの間のマイクロチャンネルが100nmから10micronの間の幅を有するような、少なくとも2つの近接した反射器を備えるべきである。

【0055】

検体と分子認識要素との間の結合において変わる信号に関して最良の結果を得るために、共振器ユニットは、10nmから1micronの間の高さを有し、それら隣接構造間のマイクロチャンネルが100nmから10micronの間の幅を有するような、少なくとも2つの近接したIDTE/反射器ジャンクションを備えるべきである。

【0056】

分子認識成分は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、PNA及びLNA分子のような核酸類似体、蛋白質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを含む抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害薬、レセプター、配位子、キナーゼ、プロテインA、ポリウラシル (Poly U)、ポリアデニン (Poly A)、ポリリジン、トリアジン色素、ボロン酸、チオール、ヘパリン、多糖類、クマシー・ブルー、アズールA、金属結合ペプチド、砂糖、炭水化物、キレート剤、原核細胞、及び真核細胞からなる一群より選択されることが好ましい。

【0057】

共振器ユニットは、追加の絶縁被膜を少なくとも1つ有していることが好ましい。そのような追加の絶縁被膜を、例えばチタニウム、SiO₂、誘電体薄膜、石英、又は、金 (Au)、銀 (Ag)、SiO₂、アルミニウム (Al) で構成される (ただし、これらに限定されるわけではない) 追加被膜を有する任意の種類の高分子材料、又は任意の種類の高分子材料により構成することができる。

【0058】

圧電性基板は、石英 (SiO₂) と、タンタル酸リチウム (LiTaO₃) と、そこまで

10

20

30

40

50

重要ではないものの、ニオブ酸リチウム (LiNbO_3) と、を含む一群から選択されることが好ましい。商業的可能性を有する他の物質としては、ガリウムヒ素 (GaAs)、炭化ケイ素 (SiC)、ランガサイト (LGS)、酸化亜鉛 (ZnO)、窒化アルミニウム (AlN)、チタン酸ジルコン酸鉛 (PZT)、及びポリフッ化ビニリデン (PVDF) が含まれる。圧電性基板は、石英、ニオブ酸リチウム (LiNbO_3)、又は他の任意の圧電材料から作成することができる。

【0059】

分子認識成分は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、PNA及びLNA分子のような核酸類似体、蛋白質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを含む抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害薬、レセプター、配位子、キナーゼ、プロテインA、ポリウラシル (Poly U)、ポリアデニン (Poly A)、ポリリジン、トリアジン色素、ボロン酸、チオール、ヘパリン、多糖類、クマシー・ブルー、アズールA、金属結合ペプチド、砂糖、炭水化物、キレート剤、原核細胞、及び真核細胞からなる一群より選択される。

10

【0060】

検体種は、血液、血清、血漿、排泄物、脊髄中心液、及び尿からなる一群より選択される、哺乳類流体サンプルより抽出することが好ましい。

【0061】

本発明に従った共振器ユニットを、サンプルからの検体種を検出するために適したマイクロセンサ内で用いることができる。

20

【0062】

マイクロセンサは、本発明に従った表面音響波 (SAW) 共振器ユニットのセットを少なくとも1つ備えることが好ましい。

【0063】

本発明の1実施形態において、そのセットユニットは同一の圧電性基板上に配置される。

【0064】

本発明の1実施形態において、そのセットユニットは別々の圧電性基板上に配置される。

【0065】

検体の量を計算するために用いることが可能であるような信号を得るためには、信号を参照 (バックグラウンド) 信号と比較せねばならない。したがって、好ましい実施形態においてマイクロセンサは、少なくとも1つの、固定化された分子認識成分を含まない参照表面音響波 (SAW) 共振器ユニットを、更に備える。マイクロセンサは、固定化された分子認識成分を含まない表面音響波 (SAW) 共振器ユニットのセットを、少なくとも1つ備えることが好ましい。

30

【0066】

SAWセンサは、手持ち型デバイス内で用いるために適した技術をもたらす、小型センサである。したがって、本発明は更に、上述したとおりのマイクロセンサを備えた、目標検体を検出するための手持ち型デバイスに関する。

40

【0067】

別の態様において、本発明は、サンプル中の検体を検出するための方法であって、
(a) 検体種を、請求項1乃至9のいずれかに記載された表面音響波 (SAW) 共振器ユニットの表面に固定化された、少なくとも1つの第1の認識成分に接触させ、それにより、検体と第1の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、
(b) 共振器ユニット上での検体の結合における質量増加を測定する段階と、を含む、方法に関する。

【0068】

別の態様において、本発明は、サンプル中の検体を検出するための方法であって、
(a) 検体種を、酵素連結型の第2の認識成分に接触させ、それにより、検体と酵素連

50

結型認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 複合体を、少なくとも1つの、本発明に従った表面音響波(SAW)共振器ユニットの表面に固定化された第1の認識成分に接触させる段階と、

(c) 上記(b)の共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、その基質は、(a)における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 沈殿物を、共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、
を含む、方法に関する。

【0069】

別の態様において、本発明は、サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) 検体種を、本発明に従った表面音響波(SAW)共振器ユニットの表面に固定化された、少なくとも1つの第1の認識成分に接触させ、それにより、検体と第1の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 複合体を、酵素連結型の第2の認識成分に接触させる段階と、

(c) 共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、それにより、その基質は、(b)における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 沈殿物を、共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、
を含む、方法に関する。

【0070】

別の態様において、本発明は、サンプル中の目標検体の検出における信号を測定するために、上述したとおりのマイクロセンサを使用することに関する。

【0071】

検体は、トロポニンI、トロポニンT、BNP、H-FABP、アレルゲン、及びIgEからなる一群より選択されることが好ましい。

【0072】

入力及び出力トランスデューサ

入力及び出力トランスデューサは、インターデジタル化されたトランスデューサであることが好ましい。一般的には、2つのインターデジタルトランスデューサが存在する。入力及び出力トランスデューサの各々は、インターデジタル化されたパターンに配列された、2つの電極を備える。入力トランスデューサにおける2つの電極間に印加される電位差は、結果として圧電性基板内に表面音響波を発生させる。一般に、電極は任意の導電性物質を含んでいてよく、アルミニウムや金は好ましい。

【0073】

電極は如何なる従来形状を有していてもよいが、支持体表面に沿った波の伝播方向を横断する細長い金属化領域として、フォトリソグラフィにより表面上で堆積されることが好ましい。細長い金属化領域は、同じ桁の幅と間隔とを有することが好ましい。幅は、典型的には1~40micronの間であって、好ましくは10~20micronの間である。特定の実施形態において、その幅は、100nm, 200nm, 300nm, 400nm, 500nm, 600nm, 700nm, 800nm, 900nm, 1micron, 2micron, 3micron, 4micron, 5micron, 7.5micron, 10micron, 15micron, 20micron, 25micron, 30micron, 35micron, 40micron, 45micron, 50micron, 60micron, 70micron, 80micron, 又は90micronであるか、またはそれらより大きい。別の実施形態において、電極間隔は、100micron, 90micron, 80micron, 70micron, 60micron, 50micron, 45micron, 40micron, 35micron, 30micron, 25micron, 20micron, 15micron, 10micron, 7.5micron, 5micron, 4micron, 3micron, 2micron, 1micron, 900nm, 800nm, 700nm, 600nm, 500nm, 400nm, 300nm, 200nm, 100nm, 又は75nmとするか、あるいはそれらより小さくすることができる。間隔は、デバイスの周波数と逆比例して変化する

10

20

30

40

50

ることに、注意すべきである。

【0074】

特定の実施形態において、電極の高さは電極の幅と同じである。他の実施形態において、電極の高さは、例えば、10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 75 nm, 100 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 又は900 nmであるか、又はそれらよりも大きい。別の実施形態において、電極間隔の深さは、1 micron, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 又は20 nmであるか、あるいはそれらよりも小さいものとすることができる。

10

【0075】

ある代替的实施形態において、存在するインターデジタルトランスデューサは1つである。この実施形態においては、単一のインターデジタルトランスデューサが入力及び出力トランスデューサの両方としての役目を果たす。入力及び出力トランスデューサの両方として振舞う単一のインターデジタルトランスデューサを採用する実施形態において、SAWセンサ内部で1以上の共振を起こすよう、一般的には反射器構造体が備えられる。反射器構造体は、例えば薄膜格子であってよい。格子は、アルミニウム、又は別の導電性物質を含んでいてよい。発生した共鳴は、例えば単一のトランスデューサにおいて消散した出力を測定することにより、検出可能である。薄型構造内での1以上の結合イベントによりこれら共振は変化するのであり、これにより結合イベントを検出することが可能となる。この実施形態に従ったセンサと技術とは、ここにおいて参照により組み入れられている米国特許第5,846,708号(特許文献10)において、一般的に説明されている。後述のとおり、1つだけのインターデジタルトランスデューサを備えたSAWセンサを採用する実施形態においては、別の電子機器、及び/または回路を同じように利用することができる。

20

【0076】

分子認識分子を、自己組織化した単分子層へと直接加えることができる。例えば、金のIDTEを採用した場合、当該技術分野において公知であり、例えば、その両方が参照によりここに組み入れられている非特許文献9及び10等において説明されているように、自己組織化した単分子層を用いて、DNAの5'上のSH基を用いて、DNAプローブ分子を加えることが可能である。

30

【0077】

本発明は、更に、

(1) サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) サンプル中の検体を、第1の認識成分及び第2の酵素結合型認識成分と反応させる段階と、

(b) 基質を加える段階であって、その基質は上記結合された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

を含み、

(c) 上記段階(a)及び(b)は測定チャンバから分離された反応容器内で実行され、段階(b)において得られる沈殿物は、能動的に測定チャンバへと輸送され、そこにおいてSAWセンサ表面と接触しているものが検体固有信号を生じさせる、

40

方法に関する。

【0078】

本発明の更なる実施形態は、以下のとおりである。

【0079】

(2) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、第1の認識成分は検体を反応容器内で表面に固定化させる、方法。

【0080】

(3) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、

50

上記表面は反応容器の裏地であるか、又は、容器空洞内に含まれる物質の表面であるか、又はそれらの組み合わせであってよい、方法。

【0081】

(4) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、認識成分は、蛋白質、蛋白質類似体、変性蛋白質、核酸、核酸類似体、及び変性核酸を含む一群から選択される、方法。

【0082】

(5) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、蛋白質は、抗体、抗体フラグメント、変性抗体、レセプター分子、及び配位子分子を含む一群から選択される、方法。

10

【0083】

(6) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、酵素は、アルカリホスファターゼ(AP)及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を含む一群から選択される、方法。

【0084】

(7) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従う方法であって、基質は、ジアミノベンジジン(DAP)、アミノエチルカルバゾール(AEC)、テトラメチルベンジジン(TMB)、又は5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩(BCIP)/ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を含む一群から選択される、方法。

20

【0085】

本発明は、更に、

(8) 上記(1)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つの方法に従ってサンプル中の検体を検出するためのデバイスであって、

(a) 注入口と排出口とを有する反応容器であって、酵素変換によって検体固有の沈殿物がその中に生じる反応容器を備え、

(b) 上記反応容器は、注入口と排出口とを有しSAWセンサを備えた測定チャンバに繋がれており、

(c) 液流は、上記沈殿物を、反応容器から測定チャンバへと能動的に輸送しており、そして上記沈殿物はSAWセンサ表面と接触し、検体固有信号を生じさせる、デバイスに関する。

30

【0086】

本発明の更なる実施形態は、以下のとおりである。

【0087】

(9) 上記(8)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従うデバイスであって、更に流量調整装置へと繋がれており、上記調整装置は、反応容器の前に配置されたポンプシステム、測定チャンバの後ろに配置された吸引システム、又はその両方である、デバイス。

【0088】

(10) 上記(8)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従うデバイスであって、上記反応容器は、チューブ、チューピングシステム、チャンバ及び接続されたチャンバのシステム、を含む一群より選択される、デバイス。

40

【0089】

(11) 上記(8)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従うデバイスであって、反応容器システム内に保持された、ビーズ及びゲルを含む一群より選択される物質を更に備えた、デバイス。

【0090】

(12) 上記(8)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従うデバイスであって、反応容器システムは、フィルター及びグリッドを含む一群より選択される1以上の材料を更に備えた、デバイス。

【0091】

50

(13) 上記(8)及び/又は後続の実施形態のうちいずれか1つに従うデバイスであって、SAWセンサはSAWフィルタユニットタイプである、デバイス。

【0092】

例

以下の非制限的な例は、上記説明された発明を使用する方法を、より完全に説明するために役立つ。これらの例は、決して本発明の範囲を制限するものではなく、むしろ例証目的のために与えられているということ、理解すべきである。

【0093】

例1 - 抗マウスIgG / 抗HFABP mAb - ALPの分析

手順は、図1に示されるモードに従って実行された。

10

【0094】

2つのSAW共振器ユニット(図1の1及び2)を備えたマイクロセンサを用いた。3次元表面を有するSAW共振器ユニット(図1の1)は、20nmの金で被覆されていた。3次元表面を有する同一のSAW共振器ユニット(図1の2)は、SiO₂で被覆されていた。図1の1におけるSAW共振器の金表面は、100µg/mlのヤギ抗マウスIgGを用いてインキュベートされ、一方で図1の2におけるSAW共振器のSiO₂表面は、100µg/mlのヤギIgGを用いてインキュベートされた。

【0095】

第1の段階は、金で被膜された3次元SAW表面上での、抗マウス抗体の吸着であった。これは、湿潤環境において2時間に亘り、PBSバッファ溶液中で100µg/ml抗体を2µl用いての金/SAW共振器ユニットの平衡により実行された。その後、両方のSAW共振器ユニットは、0.05%のTweenを含むPBSバッファを用いて3回洗浄された。この処置の後、2つのSAW共振器ユニット(図1の1及び2)は、湿潤環境において室温下で1時間に亘り、PBS中の1%BSAでインキュベートされた。その後、両方のSAW共振器ユニットは、TBSバッファ/0.05%Tweenを用いて3回洗浄された。その後、2つのSAW共振器ユニット(図1の1及び2)は、15分間に亘り、PBSバッファ中、アルカリホスファターゼ酵素(ALP)でラベルされた多様な濃度のマウス抗体(抗HFABP mAb - ALP)に曝された。TBS/0.05% Tweenを用いて3回洗浄された後、BCIP/NBT(SIGMA)が加えられ、SAW共振器(図1の1)及びSAW共振器ユニット(図2の2)間での差分周波数が10分後に測定された(実験I-VII)。

20

30

【0096】

対照(実験VIII) - ヤギIgGは、両方のSAW共振器ユニット(図1の1及び2)上でインキュベートされた。

【0097】

その後、2つのSAW共振器ユニット(図1の1及び2)は、15分間に亘り、PBSバッファ中、アルカリホスファターゼ酵素(ALP)でラベルされた100ng/mlのマウス抗体(抗HFABP mAb - ALP)に曝された。TBS/0.05% Tweenを用いて3回洗浄された後、BCIP/NBT(SIGMA)が加えられ、SAW共振器(図1の1)及びSAW共振器ユニット(図2の2)間での差分周波数が10分後に測定された(実験VIII)。

40

【表 1】

実験番号	抗HFABP mAb-ALP (ng/ml)	10分後の、SAW共振器ユニット (2) - (1) (kHz)	CV (%)
I	100	-2100	-
II	100	-2500	-
III	100	-2400	-
平均	100	-2333	9
IV	33.3	-1100	-
V	10	-350	-
VI	10	-325	-
VII	10	-175	-
平均	10	-283	33
VIII (対照)	対照 ヤギIgG	-1	-

10

【0098】

表1からのデータを用いて、用量反応曲線（図3に示されている）が生成された。R値は1.00である。

20

【0099】

例2 - 抗マウスIgG / 抗HFABP mAb - 2ALPの分析

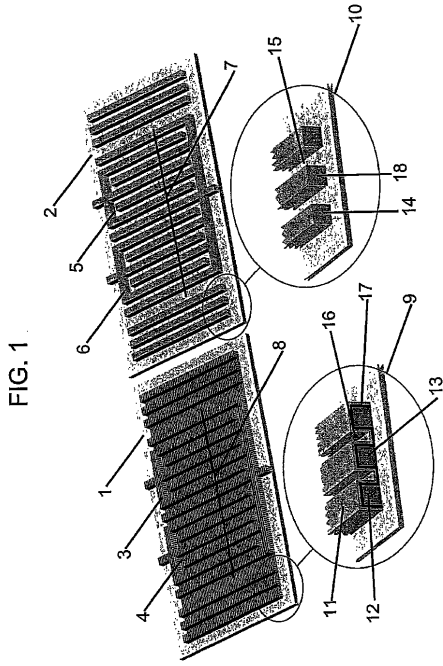
例1におけるものと同様の分析手順であるが、しかしながら、感度を更に高めるために、抗マウスIgG / 抗HFABP mAb - 2ALPを検体（抗体ごとに2ALP酵素でラベルされる）として用いた。

【表 2】

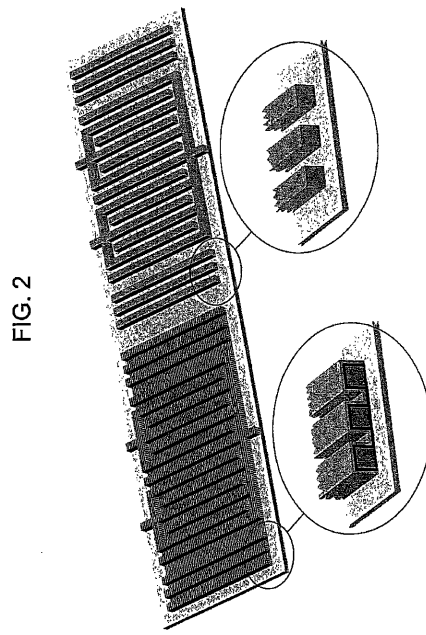
実験番号	抗HFABP mAb-ALP (ng/ml)	10分後の、SAW共振器ユニット (2) - (1) (kHz)	CV (%)
I	1	-294	-
II	1	-310	-
III	1	-317	-

30

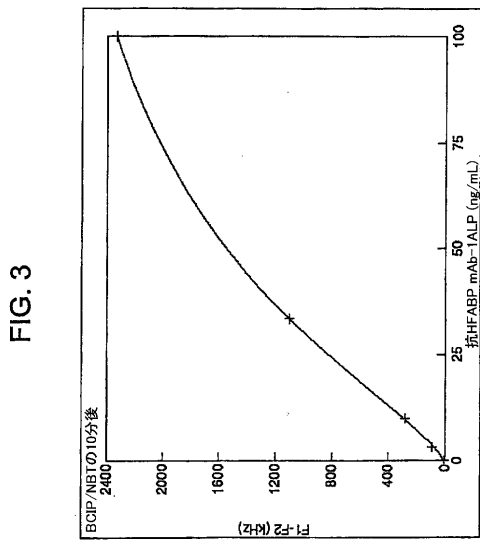
【 図 1 】



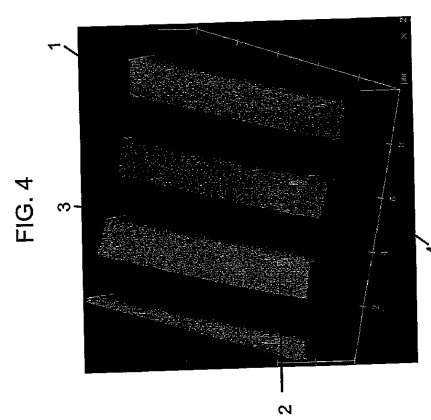
【 図 2 】



【 図 3 】

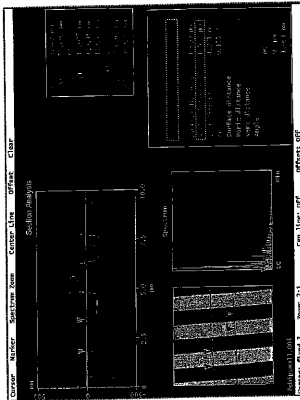


【 図 4 】



【 図 5 】

FIG. 5



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成21年4月23日 (2009.4.23)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

表面音響波 (S A W) 共振器ユニットであって、

(a) 圧電性基板と、

(b) 少なくとも 1 つのインターデジタルトランスデューサ電極 (I D T E) 構造体と

(c) 少なくとも 1 つの反射器構造体と、

を備え、

前記 (b) における I D T E 構造体内には 3 次元マイクロチャンネルが形成されており、

前記 (c) における反射器構造体内には 3 次元マイクロチャンネルが形成されており、
更に前記共振器ユニットが表面固定化された分子認識成分を含み、該固定化された分子認識成分は検体種と酵素結合型抗体とを含む目標種と結合することができる、

共振器ユニット。

【 請求項 2 】

少なくとも 2 つの近接した I D T E は 1 0 n m から 1 m i c r o n の間の高さを有し、
該近接した電極間のマイクロチャンネルは 1 0 0 n m から 1 0 m i c r o n の間の幅を有する、請求項 1 に記載の共振器ユニット。

【 請求項 3 】

少なくとも2つの近接した反射器は10nmから1micronの間の高さを有し、近接した電極間のマイクロチャンネルは100nmから10micronの間の幅を有する、請求項1又は2に記載の共振器ユニット。

【請求項4】

少なくとも2つの近接したIDTE/反射器ジャンクションは10nmから1micronの間の高さを有し、該近接した構造間のマイクロチャンネルは100nmから10micronの間の幅を有する、請求項1乃至3のいずれか1項に記載の共振器ユニット。

【請求項5】

基質は、ジアミノベンジジン(DAP)、アミノエチルカルバゾール(AEC)、テトラメチルベンジジン(TMB)、ないしは5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩(BCIP)/ニトロブルー-テトラゾリウム(NBT)、を含む一群より選択される、請求項1乃至4のいずれか1項に記載の共振器ユニット。

【請求項6】

追加の絶縁被膜を少なくとも1つ有する、請求項1乃至5のいずれか1項に記載の共振器ユニット。

【請求項7】

検体種は、血液、血清、血漿、排泄物、脊髄中心液、及び尿からなる一群より選択される哺乳類流体サンプルより抽出される、請求項1乃至6のいずれか1項に記載の共振器ユニット。

【請求項8】

請求項1乃至7のいずれかに記載の表面音響波(SAW)共振器ユニットを少なくとも1つ備えた、マイクロセンサ。

【請求項9】

請求項1乃至7のいずれかに記載の表面音響波(SAW)共振器ユニットのセットを少なくとも1つ備えた、請求項8に記載のマイクロセンサ。

【請求項10】

少なくとも1つの、固定化された分子認識成分を含まない参照表面音響波(SAW)共振器ユニットを更に備えた、請求項8又は9に記載のマイクロセンサ。

【請求項11】

固定化された分子認識成分を含まない参照表面音響波(SAW)共振器ユニットのセットを少なくとも1つ備えた、請求項10に記載のマイクロセンサ。

【請求項12】

請求項8乃至11のいずれかに記載のマイクロセンサを備えた、目標検体を検出するための、手持ち型デバイス。

【請求項13】

サンプル中の検体を検出するための方法であって、

(a) 検体種を、請求項1乃至7のいずれかに記載された表面音響波(SAW)共振器ユニットの表面に固定化された、少なくとも1つの第1の認識成分に接触させ、それにより、該検体と該第1の認識成分とを含む複合体を作成する段階と、

(b) 前記複合体を、酵素連結型の第2の認識成分に接触させる段階と、

(c) 前記共振器ユニットに対して基質を提供する段階であって、それにより、該基質は、(b)における連結された酵素によって沈殿物へと変換される段階と、

(d) 前記沈殿物を、前記共振器ユニット上の堆積物上で測定する段階と、

を含む、方法。

【請求項14】

前記沈殿物は、前記SAW共振器ユニットにおける前記電極と反射器構造体の間に形成されるマイクロチャンネル内に堆積し、それによって前記マイクロチャンネルにおける固体/液体体積比を減少させ、前記チャンネルにおける該固体/液体体積比の変化は、周波数、位相、又は振幅の信号変化をもたらす、

請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記検体は、トロポニン I、トロポニン T、BNP、H-FABP、アレルゲン、及び I g E よりなる一群より選択される、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

サンプル中の目標検体の検出における信号を測定するための、請求項 8 乃至 1 1 のいずれかに記載されたマイクロセンサの使用。

【請求項 1 7】

前記目標検体は、トロポニン I、トロポニン T、BNP、H-FABP、アレルゲン、及び I g E よりなる一群より選択される、請求項 8 乃至 1 1 のいずれかに記載のマイクロセンサの使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DK2007/000378

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N29/02 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/024813 A1 (WARTHOE PETER [DK]) 2 February 2006 (2006-02-02) cited in the application the whole document -----	1-15, 17-19
X	STUBBS D D ET AL: "Gas phase activity of anti-FITC antibodies immobilized on a surface acoustic wave resonator device" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 17, no. 6-7, June 2002 (2002-06), pages 471-477, XP002342142 ISSN: 0956-5663 abstract page 472, right-hand column, line 5 - page 475, left-hand column, line 5 ----- -/--	1,15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
7 November 2007	15/02/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Filipas, Alin	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DK2007/000378

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2005/083882 A (MICROTECHNOLOGY CT MAN LTD [AU]; KALANTAR-ZADEH KOUROSH [AU]) 9 September 2005 (2005-09-09) abstract page 2, line 25 - page 4, line 20 page 6, line 18 - page 7, line 11 page 8, line 14 - page 9, line 18; figures 1,2</p>	1,15
X	<p>US 5 478 756 A (GIZELI ELECTRA [GB] ET AL) 26 December 1995 (1995-12-26) cited in the application the whole document</p>	1,15
X	<p>US 5 306 644 A (MYERHOLTZ CARL A [US] ET AL) 26 April 1994 (1994-04-26) cited in the application abstract column 1, line 50 - column 2, line 66 column 3, lines 28-43 column 5, lines 3-21; figure 1</p>	1,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2007/000378**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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an 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.:

see Annex

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 Application No. PCT/DK2007 /000378

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15,17-19

- SAW resonator comprising:
- a piezoelectric substrate,
 - an IDTE structure with micro-channels,
 - a reflector structure with micro-channels, and
 - a first surface-immobilized molecular recognition component.
- Method for detecting an analyte by using said SAW resonator, by
- contacting an analyte species with the first recognition component, thereby creating a complex comprising the analyte and the first recognition component; and
 - measuring the mass increase upon binding of the analyte on the SAW resonator.
-

2. claims: 16,17

- Method for detecting an analyte by using the SAW resonator of the first invention, by:
- contacting an analyte species with the first recognition component of the first invention, thereby creating a complex comprising the analyte and the first recognition component;
 - contacting said complex with an enzyme-linked second recognition component;
 - providing a substrate to the SAW resonator of the first invention, which substrate is converted to a precipitate by said linked enzyme; and
 - measuring said precipitate upon deposit on the SAW resonator.
-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2007/000378

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2006024813	A1	02-02-2006	AU 2005245996 A1	01-12-2005
			CA 2566962 A1	01-12-2005
			WO 2005114166 A1	01-12-2005
			EP 1756562 A1	28-02-2007
			JP 2007538236 T	27-12-2007
WO 2005083882	A	09-09-2005	EP 1719247 A1	08-11-2006
			JP 2007524853 T	30-08-2007
			US 2007241637 A1	18-10-2007
US 5478756	A	26-12-1995	NONE	
US 5306644	A	26-04-1994	NONE	

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 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/543 5 4 5 A	
	G 0 1 N 33/543 5 9 3	
	G 0 1 N 37/00 1 0 1	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100158469

弁理士 大浦 博司

(72) 発明者 ヴァルトゥ ペーテル

デンマーク デーコー 2 1 0 0 コペンハーゲン エー ヴィレムスガーデ 5 4 3 テーホーム (参考) 2G047 AA04 BC03 BC04 BC15 CA01 CB03 EA05 GA02 GB21
5J097 BB02 DD05 DD14 DD28 DD29 KK01 LL03

专利名称(译)	用于检测目标分析物的生物表面声波 (SAW) 谐振器放大		
公开(公告)号	JP2010501067A	公开(公告)日	2010-01-14
申请号	JP2009524077	申请日	2007-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	ATONOMICS		
申请(专利权)人(译)	阿托卢武铉混合ACTY洛杉矶矶萝卜		
[标]发明人	ヴァルトウペーテル		
发明人	ヴァルトウペーテル		
IPC分类号	G01N29/02 H03H9/25 H03H9/145 G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N29/022 G01N29/222 G01N29/2437 G01N2291/02466 G01N2291/0255		
FI分类号	G01N29/02 H03H9/25.Z H03H9/145.C H03H9/145.D H03H9/145.Z G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.593 G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G047/AA04 2G047/BC03 2G047/BC04 2G047/BC15 2G047/CA01 2G047/CB03 2G047/EA05 2G047/GA02 2G047/GB21 5J097/BB02 5J097/DD05 5J097/DD14 5J097/DD28 5J097/DD29 5J097/KK01 5J097/LL03		
代理人(译)	西岛隆义 须田博之 上杉 浩		
优先权	200601073 2006-08-17 DK		
其他公开文献	JP5020324B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于SAW谐振器微传感器的信号放大方法技术领域本发明一般涉及用于SAW谐振器微传感器的信号放大方法，用于分析包含含有蛋白质或核酸的靶分析物的测试样品。本发明涉及至少一个表面声波谐振器单元，其包括布置在压电基板表面上的反射器微通道和多个三维叉指式换能器电极 (IDTE)。本发明还涉及所述三维微通道中固/液体积比的变化。可以检测与测试样品中的目标分析物浓度相关的液体/固体体积比的变化。点域1

