(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月2日(02.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/172591 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/566* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/007726

(22) 国際出願日： 2021年3月1日(01.03.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-031457 2020年2月27日(27.02.2020) JP
特願 2020-159008 2020年9月23日(23.09.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ Hyogo (JP).

(72) 発明者: 竹内 俊文 (**TAKEUCHI, Toshifumi**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 砂山 博文 (**SUNAYAMA, Hirobumi**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 高野 恵里(**TAKANO, Eri**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 田中 順也，外(**TANAKA, Junya** et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島６－２－４０ 中之島インテス２１階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** NANOPARTICLES FOR SENSING USE AND PRODUCTION METHOD FOR SAME

(54) 発明の名称： センシング用ナノ粒子及びその製造方法

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide: an artificial bio sensor that is easy to produce and that exhibits superior specificity; and a method for producing same. Nanoparticles according to the present invention for sensing use comprise a molecular imprint polymer having a molecular imprint space for biological matter. The molecular imprint polymer includes a structural unit derived from functional groups including an interaction group with respect to said biological matter and a signaling substance binding group different from said interaction group. The functional groups are present on the surface of the molecular imprint space. The nanoparticles are useful as an artificial biosensor that is easy to produce and exhibits superior specificity.

(57) 要約：本発明は、製造容易でありながら特異性にも優れる人工バイオセンサ、及びその製造方法を提供することを目的とする。生体物質の分子インプリント空間を有する分子インプリントポリマーを含み；前記分子インプリントポリマーが、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマー由来の構成単位を含み；前記機能性基が前記分子インプリント空間表面に存在している、センシング用ナノ粒子は、製造容易でありながら特異性にも優れる人工バイオセンサとして有用である。

WO 2021/172591 A1

明　細　書

発明の名称 ： センシング用ナノ粒子及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、センシング用ナノ粒子及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質等の生体物質は、代謝、シグナル伝達、免疫、生体構造の形成など多くの生命現象に携わっており、病気の診断等における有益な情報を提供する。そして、このような生体分子の利用価値を更に高めるべく、生体分子を認識する材料をバイオセンサへ応用する研究が行われている。

[0003] バイオセンサにおいて生体分子を認識するレセプタとして用いられる抗体は、その優れた特異性と親和性とにより、バイオセンサの性能に大きく寄与している。一方で、抗体は、生体分子であるがゆえに、熱及びｐＨなどの外部刺激に対して脆弱である点、並びに高コストである点等の生来的な課題を孕んでいる。

[0004] 抗体の生来的な課題に鑑み、抗体の特異性及び親和性を人工的に獲得すべく、分子インプリンティングの応用が試みられている。分子インプリンティングは、生体分子の鋳型を高分子内に型取る技術として確立されており、具体的には、鋳型となる生体分子と機能性モノマーの複合体を形成させ、架橋剤と共に共重合した後、鋳型を除去することで、鋳型に対して相補的な結合空間（分子インプリント空間）をもつ分子インプリントポリマー（ＭＩＰ）を得る。このようなＭＩＰの膜を基板上に製膜した様々な人工バイオセンサ基板が報告されている。

[0005] 例えば、非特許文献１には、分子インプリント空間に結合したバイオマーカーの検出感度を向上させることを可能とする人工バイオセンサ基板が報告されている。この人工バイオセンサ基板では、分子インプリント空間の作成により初期結合に抗体を使用する必要性を無くし、且つ、二次標識抗体を、静電容量に依存するバイオセンサに置き換えることで、複雑なサンプル中の

低濃度の生体分子を迅速かつ無標識で、高感度に検出及び定量する感度を向上させている。

[0006] また、非特許文献２には、分子インプリント空間の特異性及び親和性を向上させるとともに、結合情報を蛍光変化で読み出すことを可能とする人工バイオセンサ基板が報告されている。この人工バイオセンサ基板では、それぞれ異なる可逆結合（ジスルフィド基及びオキシイミノ基）を有する２種の機能性モノマーを、鋳型となるα－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に共有結合で導入しておき、分子インプリンティングによりＭＩＰの膜を形成した後、可逆結合を切断してＡＦＰを除去することで、分子インプリント空間内に、可逆結合に由来する２種類の官能基（チオール基及びオキシアミノ基）を局在させている。これら２種類の官能基のうち、一方にＡＦＰと相互作用する基を導入することで、分子インプリント空間に対するＡＦＰの特異性及び親和性を向上させ、他方に蛍光レポーター分子を導入することで、分子インプリント空間に対するＡＦＰの結合情報を蛍光変化で読み出している。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Journal of Visualized Experiments, 132, e57208, doi:10.3791/57208 (2018)

非特許文献2：Angewandte Chemie International Edition., 55, 13023-13027 (2016)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記のように、ＭＩＰの膜を基板上に製膜した人工バイオセンサ基板について、その性能を向上させる研究がなされているものの、未だ、改善の余地があると言わざるを得ない。

[0009] 非特許文献１の技術は、分子インプリント空間によって抗体を代替えするものであり、認識した分子の検出感度を上げることを主旨としている。しか

しながら、分子インプリント空間によって発揮される認識能は、対象分子表面の相補的形状に基づいて発揮される程度でしかなく、その特異性及び親和性については到底満足できるものではない。

[0010] 非特許文献２の技術は、分子インプリント空間内に対象分子との相互作用基を追加することで、分子インプリント空間と対象分子との親和性を、当該空間の形状だけでなく、相互作用基との相互作用を利用することで向上させている。また、相互作用基を分子インプリント空間内に局在させるための分子インプリンティングプロトコルにより、当該空間以外での非特異吸着を低減させている。しかしながら、これらの優れた性能を得ることと引き換えに、鋳型に予め２種の機能性モノマーを共有結合させる特殊な工程が必要であり、製法が複雑化する。

[0011] 本発明者は、非特許文献２の技術において、上記の特殊な工程を捨象することで製法を簡易化する検討を行った。具体的には、鋳型となる生体分子に非共有結合的に（非共有結合又はそれに類する弱い共有結合で）相互作用する官能基（相互作用基）を有する機能性モノマーを用いることにより、重合系中で当該機能性モノマーを鋳型表面に吸着させ、分子インプリント空間に相互作用基を局在させることを試みた。また、この試みでは、蛍光レポーター分子を導入する基（シグナル物質結合性基）も分子インプリント空間に局在させることを目的として、当該機能性モノマーを、相互作用基とシグナル物質結合性基との両方を有するように設計した。しかしながら、このような製造方法を用いても、得られる人工バイオセンサ基板は、特異性が乏しくなるという課題に直面した。

[0012] そこで本発明の目的は、製造容易でありながら特異性にも優れる人工バイオセンサ、及びその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者は鋭意検討の結果、相互作用基とシグナル物質結合性基との両方を有するモノマーを用い、ＭＩＰを粒子状となるように形成することで、鋳型に対する特殊な工程を行わない容易な製法であるにも関わらず、特異性に

も優れた人工バイオセンサが得られることを見出した。本発明は、この知見に基づき、さらに検討を重ねることにより完成された。

[0014] すなわち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

[0015] 項１． 生体物質の分子インプリント空間を有する分子インプリントポリマーを含み、

前記分子インプリントポリマーが、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマー由来の構成単位を含み、

前記機能性基が前記分子インプリント空間表面に存在している、センシング用ナノ粒子。

項２． 前記機能性基が下記式（１）で示される、項１に記載のセンシング用ナノ粒子。

[化1]

$$-R^2-L^1-R^1 \qquad (1)$$

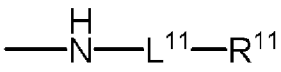
［R^1は前記生体物質との相互作用基を表し、R^2は前記シグナル物質結合性基を含む連結基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表す。］

項３． 前記相互作用基が、置換又は無置換のアミノ基、置換又は無置換の芳香族基、アミジノ基、グアニジノ基、カルボキシル基、スルホ基、ボロニル基、及び前記生体分子のリガンドからなる群より選択される、項１又は２に記載のセンシング用ナノ粒子。

項４． 前記シグナル物質結合性基が、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基、アミノオキシ基、アルデヒド基、及び水酸基からなる群より選択される、項１～３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項５． 前記機能性基が下記式（１１）又は（１２）で示される、項１～４のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

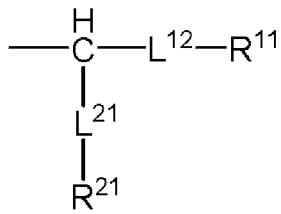
[化2]



(11)

［R^{11}は、カルボキシルアリール基又はスルホアリール基を表し、L^{11}は、炭素数１～４のアルキレン基を表す。］

[化3]



(12)

［R^{11}は、カルボキシルアリール基又はスルホアリール基を表し、L^{12}は２価連結基を表し、R^{21}は、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基、アミノオキシ基、アルデヒド基、又は水酸基を表し、L^{21}は、２価連結基を表す。］

項６．　前記シグナル物質結合性基に結合したシグナル基を含む、項１～５のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項７．　前記分子インプリントポリマーが、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド及び／又は生体適合性モノマー由来の構成単位を含む、項１～６のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項８．　前記生体物質が、タンパク質、糖鎖、脂質、及びこれらの２以上の複合分子からなる群より選択される、項１～７のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項９．　前記生体物質がアルブミンである、項１～８のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項１０．　前記生体物質の検出に用いられる、項１～９のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項１１．　生体物質が、膜構造体の生体膜に付着又は結合している物質、前記生体膜の露出している部分構造に相当する分子、若しくは、特定の生体分子の断片であり、前記相互作用基による前記生体分子の捕捉を介した、前記

膜構造体又は前記特定の生体分子の検出に用いられる、項１～９のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項１２．　前記膜構造体が、細胞、ウイルス、細胞外小胞又は細胞小器官であり、前記特定の生体分子が抗体である、項１１に記載のセンシング用ナノ粒子。

項１３．　前記生体物質がハラムに該当する動植物由来の生体物質であり、ハラルチェックに用いられる、項１～１２のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

項１４．　基板と、前記基板に固定された項１～１３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子とを含む、センシング用基板。

項１５．　項１～１３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子を含む、センシング用試薬。

項１６．　生体物質を鋳型として、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマーを含むモノマー成分を重合させることで、分子インプリントポリマーを合成する工程１と、

前記分子インプリントポリマーから前記鋳型を除去する工程２と、

を含む、センシング用ナノ粒子の製造方法。

項１７．　前記工程２の後、前記分子インプリントポリマーにおけるシグナル物質結合性基にシグナル物質を結合させる工程３を含む、項１６に記載のセンシング用ナノ粒子の製造方法。

発明の効果

[0016]　本発明によれば、製造容易でありながら特異性にも優れる人工バイオセンサ、及びその製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]本発明のセンシング用ナノ粒子の一例を模式的に示す。

[図2]本発明のセンシング用ナノ粒子の他の例を模式的に示す。

[図3]本発明のセンシング用ナノ粒子の使用態様の例を模式的に示す。

[図4]本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法の一例における工程１を模式的に示す。

[図5]本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法の一例における工程２及び３を模式的に示す。

[図6]本発明のセンシング用基板の一例を模式的に示す。

[図7]本発明のセンシング用基板の他の例を模式的に示す。

[図8]試験例５で得られた、実施例２（図７のセンシング用基板に相当）によるタンパク質吸着試験の結果を示す。

[図9]試験例５で得られた、比較例２（ＭＩＰ膜を設けた対比用のセンシング用基板）によるタンパク質吸着試験の結果を示す。

[図10]試験例６で得られた、ＢＣＰ法によるＨＳＡ濃度とセンシング用基板で測定されたＨＳＡ結合に基づく相対蛍光強度との相関を示す。

[図11]試験例７で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板について、得られた相対蛍光強度と、ＰＳＡ濃度との相関を示す。

[図12]試験例７で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板（図７のセンシング用基板に相当）によるタンパク質吸着試験の結果を示す。

[図13]試験例７で得られた、比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板によるタンパク質吸着試験の結果を示す。

[図14]試験例７で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板（図７のセンシング用基板に相当）による、ＰＳＡ混入牛肉抽出サンプル中のＰＳＡ吸着試験の結果を示す。

[図15]試験例７で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板（図７のセンシング用基板に相当）による、豚肉抽出サンプル混入牛肉抽出サンプル中の蛍光応答試験の結果を示す。

[図16]試験例８で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓの非固定（遊離）粒子に対する、ＰＳＡ添加時の蛍光スペクトル変化（λｅｘ＝６４

７ｎｍ）を示す。

[図17]試験例８で得られた、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓの非固定（遊離）粒子の、ＰＳＡ（センシング対象タンパク質）又はトランスフェリン（参照タンパク質）に対する選択性実験であり、各タンパク質を所定濃度で添加した時の６６７ｎｍの相対蛍光強度変化を示す。

[図18]試験例９で得られたＦｃドメインセンシング用（且つＦｃドメイン捕捉を介したＩｇＧセンシング用）基板に対してＦｃドメイン断片を添加した時の相対蛍光強度変化を示す。

[図19]試験例９で得られたＦｃドメインセンシング用（且つＦｃドメイン捕捉を介したＩｇＧセンシング用）基板に対して、Ｆｃドメイン断片、完全ＩｇＧ又はリソソームを添加した時の相対蛍光強度変化を示す。

[図20]試験例１０で得られた、ＨＥＲ２捕捉を介するエクソソームセンシング用基板による、相対蛍光強度とエクソソーム濃度との関係を示す。

[図21]試験例１０で得られた、ＨＥＲ２捕捉を介するエクソソームセンシング用基板と、抗ＨＥＲ２アフィボディの代わりに抗ＨＳＡアフィボディが導入されたセンシング用基板とについて、ＨＥＲ２過剰発現型乳がん細胞株由来のエクソソームを添加した場合の相対蛍光強度変化を示す。

発明を実施するための形態

[0018] ［１．センシング用ナノ粒子］

本発明のセンシング用ナノ粒子は、生体物質の分子インプリント空間を有する分子インプリントポリマーを含み；前記分子インプリントポリマーが、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマー由来の構成単位を含み；前記機能性基が前記分子インプリント空間表面に存在している。以下、本発明のセンシング用ナノ粒子について詳述する。

[0019] 図１に、本発明のセンシング用ナノ粒子の一例を模式的に示す。図１に示すように、センシング用ナノ粒子１０は、生体物質の分子インプリント空間２１を有する分子インプリントポリマー２０を含み；分子インプリントポリ

マー２０が、生体物質との相互作用基（図中、R^1で模式的に表される）及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基（図中、R^2で模式的に表される構造中に含まれる）を含む機能性基２２を有する機能性モノマー由来の構成単位を含み；機能性基２２が分子インプリント空間２１表面に存在している。センシング用ナノ粒子１０は、シグナル物質結合性基がフリーであり、シグナル物質結合性基にシグナル基を導入してセンシング用ナノ粒子１０ａの形態とすることで、生体物質の認識用センサとして用いることができる。センシング用ナノ粒子１０は、シグナル物質結合性基に導入すべきシグナル基を、ユーザが自由に選択してカスタマイズすることができる。

[0020] また、図２に、本発明のセンシング用ナノ粒子の他の例を模式的に示す。図２に示すセンシング用ナノ粒子１０ａは、図１に示したセンシング用ナノ粒子１０のシグナル物質結合性基に予めシグナル基３１が導入されている。このため、センシング用ナノ粒子１０ａは、それ自体、生体物質の認識用センサとして用いることができる。

[0021] 更に、図３に、本発明のセンシング用ナノ粒子の使用態様の例を模式的に示す。図３においては、図２に示すセンシング用ナノ粒子１０ａ（生体物質の認識用センサ）が、センシング対象である生体物質９０を認識し捕捉している様子を示している。

[0022] ［１－１．分子インプリントポリマー］

［１－１－１．形状］

分子インプリントポリマー２０は、粒子状であり、センシング対象となる生体物質（図３に示す生体物質９０）の分子インプリント空間（凹部）２１を有する。１個の分子インプリントポリマー分子２０に設けられているインプリント空間２１の数は、図示されているように１個であってもよいし、複数個（例えば２～３個、好ましくは２個）であってもよい。分子インプリント空間２１は、センシング対象となる生体物質を鋳型とした分子インプリンティングにより形成されたものであるため、当該生体物質の表面形状と相補的な形状を有している。

[0023] 分子インプリントポリマー２０が粒子状であることは、センシング用ナノ粒子１０ａの優れた特異性の発現に本質的に寄与する。分子インプリントポリマー２０と同じモノマー構成で基板上に平膜状の分子インプリントポリマー（ＭＩＰ膜）を製膜し、シグナル基を導入して作製された生体物質の認識用センサ基板では、本発明のセンシング用ナノ粒子ほどに優れた特異性を発現させることはできない。このような優れた特異性の発現を本発明特有の効果として得ることができる具体的なメカニズムとしては定かではないが、一考察として次の理由が考えられる。生体物質を鋳型とした膜形成（重合）時においては、鋳型がランダムに存在しやすいことで分子インプリント空間が非均一的に（分子インプリント空間の開口径の大きさのばらつきが大きい状態で）形成され、これによって、全ての分子インプリント空間に対して非特異吸着を生じ得る分子インプリント空間（たとえば、開口径が小さ過ぎることで十分な選択性を発揮しないもの）の割合が大きくなることに対し、生体物質を鋳型としたポリマー粒子形成（重合）時においては、ポリマーに対して相対的に親水性である生体物質鋳型がポリマーと重合反応液との界面近傍に存在しやすいことで分子インプリント空間を均一性高く（分子インプリント空間の開口径の大きさのばらつきが少ない状態で）形成でき、全ての分子インプリント空間に対して非特異吸着を生じ得る分子インプリント空間の割合が極めて小さくなると考えられる。

[0024] 更に、分子インプリントポリマー２０が粒子状であることは、具体的な生体物質の認識用センサの形状として基板形状に限定されないため、例えば、液体状のセンシング試薬として製剤することが出来、汎用性の点でも優れている。

[0025] 分子インプリントポリマー２０の平均粒子径としては、センシング対象となる生体物質のサイズ及び用途等に応じて異なるが、例えば、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定される体積平均粒子径（体積粒子径分布の累積５０％の値）で５～５００ｎｍが挙げられ、ＤＬＳによって測定されるＺ平均粒子径で５～５００ｎｍが挙げられる。より具体的には、生体内に投与して用

いる場合、及び細胞内を観察するｉｎ　ｖｉｔｒｏイメージングに用いる場合の分子インプリントポリマー２０の平均粒子径としては、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定される体積平均粒子径で５～１００ｎｍが挙げられ、ＤＬＳによって測定されるＺ平均粒子径で５～１００ｎｍが挙げられる。また、生体内に投与せずに用いる場合の分子インプリントポリマー２０の平均粒子径としては、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定される体積平均粒子径で５～５００ｎｍが挙げられ、ＤＬＳによって測定されるＺ平均粒子径で５～５００ｎｍが挙げられる。好ましくは、分子インプリントポリマー２０の平均粒子径は、体積平均粒子径で７～５０ｎｍ、８～４０ｎｍ、１５～３０ｎｍ、又は２０～２５ｎｍが挙げられ、Ｚ平均粒子径で７～５０ｎｍ、８～４０ｎｍ、１５～３０ｎｍ、又は２０～２５ｎｍが挙げられる。

[0026] ［１－１－２．分子インプリント空間内に配された機能性基］

分子インプリントポリマー２０には、分子インプリント空間２１に機能性基２２が存在している。機能性基２２は、センシング対象となる生体物質の認識、及びそれに基づくシグナル情報の提供に寄与する。本発明においては、分子インプリント空間２１に機能性基２２が存在している限り、分子インプリント空間２１以外の分子インプリントポリマー２０表面に機能性基２２が存在していることを許容するが、分子インプリント空間２１においては、センシング対象となるタンパク質を型取りした形状と、機能性基２２の存在とにより、センシング対象となる生体物質以外の分子による非特異吸着を抑制し、優れた特異性を発揮する。

[0027] ［１－１－３．機能性基の構造］

上述のとおり、機能性基２２は、センシング対象となる生体物質との相互作用基（図中、R^1で模式的に表される）と、シグナル物質結合性基（図中、R^2で模式的に表される構造中に含まれる）を含む。更に、相互作用基とシグナル物質結合性基とは互いに異なる基として設計されている。

[0028] ［１－１－３－１．相互作用基及びシグナル物質結合性基の機能］

相互作用基は、センシング対象となる生体物質と相互作用して非共有結合

的な結合を形成できる基である。図３に、相互作用基（R^1）がセンシング対象となる生体物質９０表面と相互作用している様子が参照される。非共有結合的な結合には、非共有結合、及び共有結合の中でも非共有結合程度に弱い結合を含む。非共有結合の種類としては、水素結合、静電相互作用による結合（イオン結合）、疎水性結合、ファンデルワールス結合が挙げられる。非共有結合程度に弱い共有結合としては、酸化剤又は還元剤等の強い酸化又は還元作用等を示す開裂用試薬を加えることなく、液性を変化させることのみによって開裂できる共有結合が挙げられ、具体的には、当該生体物質が糖タンパク質である場合に、糖タンパク質の糖基とボレート基との間で形成される共有結合が挙げられる。これによって、分子インプリンティングにおいて、分子インプリントポリマー粒子を合成した後に、鋳型となる生体物質を除去することが容易となる。

[0029] また、相互作用基は、当該タンパク質の表面形状と相補的な形状のインプリント空間２１表面において、当該生体物質の上記特定のアミノ酸残基及び／又は上記特定の疎水性領域と対応する位置に存在している。従って、分子インプリントポリマー２０は、分子インプリント空間２１が当該生体物質に特有の形状を有していることと、分子インプリント空間２１に存在する相互作用基が当該生体物質に特有の位置にあることとによって、当該生体物質に対して優れた認識能を発揮する。

[0030] シグナル物質結合性基は、シグナル物質と結合可能な基である。シグナル物質結合性基とシグナル物質とが結合することで、センシング用ナノ粒子１０ａのようにシグナル基３１が導入される。シグナル基３１は、センシング対象となる生体物質が相互作用基と非共有結合することで環境変化を受けるため、当該生体物質の結合前後でシグナル変化をもたらす。図３に、図２（生体物質９０認識前）で露出していたシグナル基３１が、センシング対象となる生体物質９０が相互作用基（R^1）と非共有結合することで、環境変化を受ける様子が参照される。つまり、センシング用ナノ粒子１０ａは、センシング対象となる生体物質の結合情報をシグナル変化で読み出すことができる

。

[0031] なお、センシング対象となる生体物質との相互作用によりシグナル基３１が受ける環境変化としては、センシング対象となる生体物質の近接によりシグナル変化をもたらすものであれば特に限定されない。例えば、当該環境変化の例として、（ｉ）センシング対象となる生体物質の極性基がシグナル基３１近傍へ近接することで、シグナル基３１の電子が当該極性基に引っ張られること；（ｉｉ）センシング対象となる生体物質の極性基がシグナル基３１近傍へ近接して、シグナル基３１近傍に存在していた水分子の排除されることで、近傍にあった水分子にシグナル基３１の電子が引っ張られていた状態から解放されること；（ｉｉｉ）センシング対象となる生体物質の極性基がシグナル基３１近傍へ近接することで、シグナル基３１側にあったエネルギーが結合したセンシング対象となる生体物質に移動すること；（ｉｖ）センシング対象となる生体物質の極性基がシグナル基３１近傍へ近接して、シグナル基３１を遮蔽することで、励起エネルギーがシグナル基３１に届かなくなること、等が挙げられる。

[0032] ［１－１－３－２．相互作用基及びシグナル物質結合性基の位置関係］

図示した態様では、相互作用基は機能性基２２の先端側に位置し、シグナル物質結合性基は機能性基２２の基端側に位置しているが、機能性基２２において、相互作用基とシグナル物質結合性基との位置関係は、センシング対象となる生体物質が相互作用基と非共有結合でき、且つ、非共有結合した時にシグナル基３１が環境変化を受けるような位置関係である限り、これに限定されるものではない。例えば、相互作用基とシグナル物質結合性基との位置関係が図示された態様と逆転していてもよい。しかしながら、当該生体物質と相互作用基との非共有結合をより容易とすることでより高い認識能を得る観点、及び／又は当該生体物質と相互作用基との非共有結合時により確実にシグナル基３１の環境を変化させることでシグナル変化をより感度高く得る観点から、図示された通り、相互作用基が機能性基２２の先端側に位置し、シグナル物質結合性基が機能性基２２の基端側に位置していることが好ま

しい。

[0033] ［１－１－３－３．機能性基の具体例］

（一般式）

機能性基の好ましい例は、下記式（１）で示される。

[0034] [化4]

$$-R^2-L^1-R^1 \qquad (1)$$

[0035] 式（１）中、R^1は相互作用基を表し、R^2はシグナル物質結合性基を含む連結基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表す。

[0036] （相互作用基R^1）

相互作用基R^1は、センシング対象となる生体物質の表面状態に応じて設計される。例えば、相互作用基R^1としては、当該生体物質を構成する特定の構造との間で相互作用により、水素結合、静電相互作用による結合（イオン結合）、疎水性結合、ファンデルワールス結合からなる群より選択される１又は２以上の結合を形成可能な基が挙げられる。相互作用基R^1の具体例としては、[1]置換又は無置換のアミノ基、[2]置換又は無置換の芳香族基、[3]アミジノ基（－Ｃ（＝ＮＨ）$ＮＨ_2$）、[4]グアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$ＮＨ_2$）、[5]カルボキシル基、[6]スルホ基、[7]ボロニル基（－Ｂ$（ＯＨ）_2$）、及び／又は、[8]リガンドが挙げられる。[2]置換又は無置換の芳香族基における芳香族基には、[21]置換又は無置換の含窒素芳香族基及び[22]置換又は無置換の非含窒素芳香族基が含まれ、また、[25]置換又は無置換のアリール基（[251]含窒素アリール基及び[252]非含窒素アリール基）及び[26]置換又は無置換のアリーレン基（[261]含窒素アリーレン基及び[262]非含窒素アリーレン基）が挙げられる。相互作用基R^1はこれらの基のいずれかからなる基であってもよいし、これらの基から選択される２種以上の組み合わせを含む基であってもよい。

[0037] 生体物質がタンパク質である場合、相互作用基R^1の具体例としては、当該タンパク質を構成する特定のアミノ酸残基との間で相互作用により水素結合

及び／又は静電相互作用を形成可能な基、及び当該タンパク質の特定の疎水性領域との間で疎水結合を形成可能な基等が挙げられる。アミノ酸残基又は疎水性領域と、相互作用基Ｒ[1]として選択される具体的な基と、それらの相互作用により形成される非共有結合的な結合の種類との組み合わせを、下記表に示す。

[0038] [表1]

分析対象となるタンパク質の相互作用部位	相互作用基Ｒ[1]	非共有結合的な結合の種類
酸性アミノ酸残基（カルボキシル基等）	塩基性基（置換又は無置換のアミノ基、置換又は無置換の含窒素芳香族基、アミジノ基、グアニジノ基等）	非共有結合（水素結合、静電相互作用）
塩基性アミノ酸残基（アミノ基等）	酸性基（カルボキシル基、スルホ基等）	非共有結合（水素結合、静電相互作用）
芳香族アミノ酸残基（フェニル基、インドール基、イミダゾイル基等）	置換又は無置換の芳香族基（置換又は無置換のアリール基、アリーレン基等）	非共有結合（疎水性相互作用）
疎水性領域	置換又は無置換の芳香族基（置換又は無置換のアリール基、アリーレン等）	非共有結合（疎水性相互作用）
糖基（cisジオール基）	ボロニル基	弱い共有結合（ボロン酸cisジオールエステル基）

[0039] [1]置換アミノ基における置換基としては、炭素数１～８の、直鎖又は分岐のアルキル基、置換又は無置換のアラルキル基；環状２級アミノ基を構成する炭素数４～６のアルケニル基；置換又は無置換のアリール基等が挙げられる。置換又は無置換のアリール基の具体例は、後述の[251]置換又は無置換の含窒素アリール基及び[252]置換又は無置換の非含窒素アリール基において挙げる基が挙げられる。[1]置換又は無置換のアミノ基の具体例としては、アミノ基（無置換）；Ｎ－メチルアミノ基、Ｎ－エチルアミノ基、Ｎ－ｎ－プロピルアミノ基、Ｎ－イソプロピルアミノ基、Ｎ－ｎ－ブチルアミノ基、Ｎ－イソブチルアミノ基、Ｎ－ｔｅｒｔ－ブチルアミノ基、Ｎ－ベンジルアミノ基、Ｎ－フェニルアミノ基、Ｎ－メシルアミノ基、Ｎ－トシルアミノ基など

の２級アミノ基；Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ基、Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノ基、Ｎ，Ｎ－ジベンジルアミノ基、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルアミノ基、Ｎ，Ｎ－ジ－ｎ－プロピルアミノ基、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルアミノ基、Ｎ，Ｎ－ジフェニルアミノ基、Ｎ－メチル－Ｎ－フェニルアミノ基、Ｎ－メチル－Ｎ－ベンジルアミノ基、Ｎ－メシル－Ｎ－メチルアミノ基等の二級アミノ基；ピペリジル基、ピロリジル基などの環状２級アミノ基等が挙げられる。

[0040] [2]置換又は無置換の芳香族基のうちの、[251]置換又は無置換の含窒素アリール基における含窒素アリール基としては、炭素数２～１２の含窒素アリール基が挙げられる。置換含窒素アリール基における置換基としては、炭素数１～８の、直鎖又は分岐のアルキル基等が挙げられる。[251]置換又は無置換の含窒素アリール基の具体例としては、ピリジル基、ピリミジル基、ピリダジル基、ピラジル基、イミダゾリル基、トリアゾリル基、メチルピリジル基（２－メチルピリジル基、３－メチルピリジル基、４－メチルピリジル基等）、ジメチルピリジル基（２，６－ジメチルピリジル基等）、メチルエチルピリジル基（２－メチル－６－エチルピリジル基等）、メチルイミダゾリル基（１－メチルイミダゾリル基等）、ジメチルイミダゾリル基（１，２－ジメチルイミダゾリル基等）、エチルイミダゾリル基（１－エチルイミダゾリル基等）、プロピルイミダゾリル基（１－ｎ－プロピルイミダゾリル基等）、ブリルイミダゾリル基（１－ｎ－ブチルイミダゾリル基等）、ペンチルイミダゾリル基（１－ｎ－ペンチルイミダゾリル基等）、ヘキシルイミダゾリル基（１－ｎ－ヘキシルイミダゾリル基等）等が挙げられる。

[0041] [2]置換又は無置換の芳香族基のうちの、[252]置換又は無置換の非含窒素アリール基における非含窒素アリール基としては、炭素数６～１６の、フェニル基、ナフチル基（１－ナフチル基、２－ナフチル基等）等が挙げられる。置換アリール基における置換基としては、炭素数１～８の、直鎖又は分岐のアルキル基、ニトロ基、ハロゲン基（フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等）等が挙げられる。[252]置換又は無置換のアリール基の具体例としては、フェニル基、ナフチル基、トリル基（ｏ－トリル基、ｍ－トリル基、ｐ－トリ

ル基等）、エチルフェニル基（４－エチルフェニル基、３－エチルフェイル基、２－エチルフェニル基等）、プロピルフェニル基（４－ｎ－プロピルフェニル基等）、イソプロピルフェニル基（４－イソプロピルフェニル基、２－イソプロピルフェニル基等）、ブチルフェニル基（４－ｎ－ブチルフェニル基、４－イソブチルフェニル基、４－ｔ－ブチルフェニル基、３－ｔ－ブチルフェニル基、２－ｔ－ブチルフェニル基等）、ペンチルフェニル基（４－ｎ－ペンチルフェニル基、４－イソペンチルフェニル基、２－ネオペンチルフェニル基、４－ｔ－ペンチルフェニル基等）、ヘキシルフェニル基（４－ｎ－ヘキシルフェニル基等）、４－（２－エチルブチル）フェニル基、４－ｎ－ヘプチルフェニル基、４－ｎ－オクチルフェニル基、４－（２－エチルヘキシル）フェニル基、４－ｔ－オクチルフェニル基、４－エチル－１－ナフチル基、６－ｎ－ブチル－２－ナフチル基、ジメチルフェニル基（２，４－ジメチルフェニル基、２，５－ジメチルフェニル基、３，４－ジメチルフェニル基、３，５－ジメチルフェニル基、２，６－ジメチルフェニル基等）、トリメチルフェニル基（２，３，５－トリメチルフェニル基、２，３，６－トリメチルフェニル基、３，４，５－トリメチルフェニル基等）、ジエチルフェニル基（２，４－ジエチルフェニル基、２，６－ジエチルフェニル基等）、２，５－ジイソプロピルフェニル基、２，６－ジイソブチルフェニル基、ジ－ｔ－ブチルフェニル基（２，４－ジ－ｔ－ブチルフェニル基、２，５－ジ－ｔ－ブチルフェニル基等）、４，６－ジ－ｔ－ブチル－２－メチルフェニル基、５－ｔ－ブチル－２－メチルフェニル基、４－ｔ－ブチル－２，６－ジメチルフェニル基、フルオロフェニル基（４－フルオロフェニル基、３－フルオロフェニル基、２－フルオロフェニル基等）、クロロフェニル基（４－クロロフェニル基、３－クロロフェニル基、２－クロロフェニル基等）、ブロモフェニル基（４－ブロモフェニル基、２－ブロモフェニル基等）、クロロナフチル基（４－クロロ－１－ナフチル基、４－クロロ－２－ナフチル基等）、６－ブロモ－２－ナフチル基、ジクロロフェニル基（２，３－ジクロロフェニル基、２，４－ジクロロフェニル基、２，５－ジクロロ

フェニル基、３，４－ジクロロフェニル基、３，５－ジクロロフェニル基等）、２，５－ジブロモフェニル基、２，４，６－トリクロロフェニル基、ジクロロナフチル基（２，４－ジクロロ－１－ナフチル基、１，６－ジクロロ－２－ナフチル基等）、クロロメチルフェニル基（２－クロロ－４－メチルフェニル基、２－クロロ－５－メチルフェニル基、２－クロロ－６－メチルフェニル基、３－クロロ－４－メチルフェニル基、２－メチル－３－クロロフェニル基、２－メチル－４－クロロフェニル基、３－メチル－４－クロロフェニル基等）、トリフルオロメチルフェニル基（４－トリフルオロメチルフェニル基等）、ニトロフェニル基（４－ニトロフェニル基等）等が挙げられる。

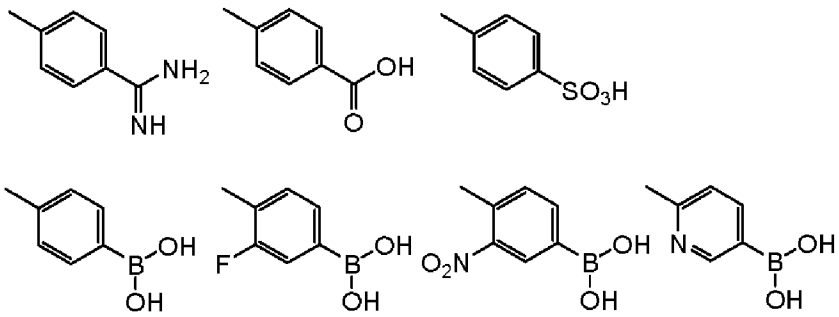
[0042] また、上記[1]～[7]の基から選択される２種以上の組み合わせを含む基としては、[1]～[7]の基のうちの１価の基である、[1]置換又は無置換のアミノ基、[251]含窒素アリール基、[252]非含窒素アリール基、[3]アミジノ基、[4]グアニジノ基、[5]カルボキシル基、[6]スルホ基、[7]ボロニル基と、[26]置換又は無置換のアリーレン基（[261]含窒素アリーレン基、[262]非含窒素アリーレン基）との組み合わせを含む基が挙げられる。

[0043] [26]置換又は無置換のアリーレン基のうちの、[261]含窒素アリーレン基は、上記の[251]置換又は無置換の含窒素アリール基として挙げた基から、芳香族環を構成している炭素に結合している水素が一個除去された基である。[26]置換又は無置換のアリーレン基のうちの、[262]非含窒素アリーレン基は、上記の[252]置換又は無置換の非含窒素アリール基として挙げた基から、芳香族環を構成している炭素に結合している水素が一個除去された基である。

[0044] 上記[1]～[7]の基から選択される２種以上の組み合わせを含む具体的な基としては、[3]アミジノ基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるアミジノアリール基、[5]カルボキシル基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるカルボキシアリール基、[6]スルホ基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるスルホアリール基、[7]ボロニル基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるボロ

ニルアリール基等が挙げられる。これらの基の中でも好ましい基を以下に示す。

[0045] [化5]



[0046] [8]リガンドとしては、センシング対象となる生体物質をアナライトとした場合の、当該アナライトに対応するリガンドとなるものであれば特に限定されない。例えば、当該生体物質が抗原である場合では抗体ミメティック（アフィボディ等）、ナノボディ等が挙げられ、当該生体物質が糖鎖である場合ではレクチン等が挙げられ、当該生体物質がリン脂質である場合ではリン脂質結合性タンパク質（エベクチン２、アネキシンＡ２、アネキシンＶ、Ｔｉｍ４）等が挙げられ、当該生体物質が酵素である場合は酵素基質又は酵素阻害剤が挙げられる。

[0047] （シグナル物質結合性基を含む連結基R^2）

シグナル物質結合性基を含む連結基R^2において、シグナル物質結合性基は、導入するシグナル基３１の由来となるシグナル物質（後述図５のシグナル物質３０）が有する結合性基（後述図６５の結合性基３２）に応じて設計される。シグナル物質結合性基の具体例としては、アミノ基（１価アミノ基及び２価アミノ基を含む）、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基（１価基）、アミノオキシ基、アルデヒド基、及び水酸基が挙げられる。

[0048] 連結基R^2は、非分岐状又は分岐状の２価基である。

[0049] 連結基R^2が非分岐状である場合、シグナル物質結合性基は、それ自体が連結基R^2を成す（つまり、連結基R^2が、シグナル物質結合性基からなる）。このような非分岐状の連結基R^2すなわちシグナル物質結合性基としては、下記

式（２）で示される２価アミノ基が挙げられる。

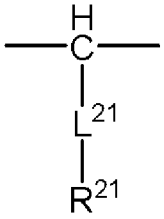
[0050] [化6]

$$-NR^3-\qquad(2)$$

[0051] 式（２）中、R^3は、水素、若しくは、炭素数１～８の直鎖又は分岐のアルキル基であり、好ましくは水素を表す。

[0052] 連結基R^2が分岐状である場合、シグナル物質結合性基は分岐に存在する１価基である。このような連結基R^2としては、下記式（３）で示される２価基が挙げられる。

[0053] [化7]



(3)

[0054] 式（３）中、R^{21}は、アミノ基（１価）、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基（１価基）、アミノオキシ基、アルデヒド基、又は水酸基を表し、好ましくは、チオール基又はジスルフィド基含有基を表す。アミノ基（１価）としては、上記の相互作用基R^1の一例である[1]置換又は無置換のアミノ基として挙げた基が挙げられる。

[0055] ジスルフィド基含有基（１価基）は、下記式（４）で表される。

[0056] [化8]

$$-S-S-R^{211}\qquad(4)$$

[0057] 式（４）中、R^{211}は、置換又は無置換のアルキル基を表す。置換又は無置換のアルキル基におけるアルキル基としては、炭素数１～８の直鎖又は分岐のアルキル基が挙げられる。置換アルキル基における置換基としては、相互作用基R^1と鋳型となる生体物質との相互作用に干渉せず、また、ジスルフィド結合とシグナル物質との反応に干渉せず、化合物全体として水溶性が担保される任意の官能基を、当業者が適宜選択することができ、具体的には、水酸

基、アミノ基（具体的には、上記の相互作用基R^1の一例である[1]置換又は無置換のアミノ基として挙げた基が挙げられる）、カルボキシ基、アルコキシ基（例えば、炭素数１～４、好ましくは１～３、より好ましくは１～２、さらに好ましくは１のアルコキシ基）、ポリエチレングリコール基(エチレンオキシド付加数として、１～６が挙げられる)、アルキル基（例えば、炭素数１～４のアルキル基が挙げられる）、アミド基、スルホ基、グアニジノ基、アミジノ基等が挙げられる。置換アルキル基における置換基の位置としては、連結基R^2の分岐の末端が挙げられる。

[0058] 式（３）中、L^{21}は、直接結合又は連結基を表す。当該連結基としては、アルキレン基、カルボニル基、エステル結合（－ＣＯＯ－又は－ＯＣＯ－）、アミド結合（－ＣＯＮＨ－又は－ＮＨＣＯ－）、及びそれらの任意の組み合わせからなる基が挙げられ、好ましくはアルキレン基が挙げられる。アルキレン基としては、炭素数１～４、好ましくは１～３、より好ましくは１～２、さらに好ましくは１のアルキレン基が挙げられる。

[0059] （直接結合又は連結基L^1）

直接結合又は連結基L^1は、相互作用基R^1とシグナル物質結合性基を含む連結基R^2との間に介在する。センシング用ナノ粒子１０ａがセンシング対象となる生体物質９０を認識する時に、連結基R^2のシグナル物質結合性基に導入されるシグナル基３１と、生体物質の相互作用基R^1への結合との干渉をより効果的に抑制する観点から、L^1は、連結基であることがより好ましい。

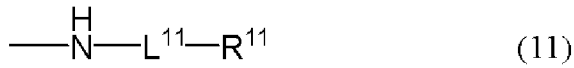
[0060] 当該連結基としては、アルキレン基、カルボニル基、エステル結合（－ＣＯＯ－又は－ＯＣＯ－）、アミド結合（－ＣＯＮＨ－又は－ＮＨＣＯ－）、及びそれらの任意の組み合わせからなる基が挙げられる。アルキレン基としては、炭素数１～４のアルキレン基が挙げられる。

[0061] （より具体的な例）

機能性基２２のより具体的な構造としては、下記式（１１）又は（１２）が挙げられる。

[0062]

[化9]

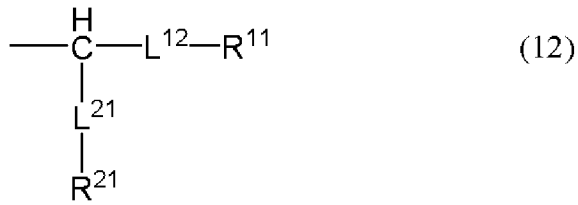


(11)

[0063] 式（１１）において、R^{11}が式（１）の相互作用基R^1に相当し、２価のアミノ基（－ＮＨ－）が式（１）のシグナル物質結合性基を含む連結基R^2（これ自体がシグナル物質結合性基を構成する）に相当し、L^{11}が式（１）の直接結合又は連結基L^1に相当する。

[0064] 式（１１）において、R^{11}はカルボキシアリール基又はスルホアリール基を示し、具体的には、上述の[5]カルボキシル基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるカルボキシアリール基、[6]スルホ基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるスルホアリール基として述べた通りである。また、式（１１）において、L^{11}は、炭素数１～４のアルキレン基を表す。式（１１）で示される機能性基においては、相互作用基R^1であるR^{11}とシグナル物質結合性基である２価のアミノ基（－ＮＨ－）との距離が近い程、センシング用ナノ粒子１０ａがセンシング対象となる生体物質９０を認識した時にシグナル変化をより感度高く得ることができる。この観点から、L^{11}としては、好ましくは炭素数１～３、より好ましくは１～２、さらに好ましくは１のアルキレン基が挙げられる。

[0065] [化10]



(12)

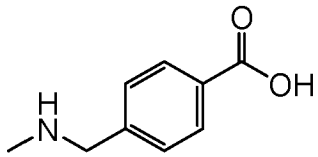
[0066] 式（１２）において、R^{11}が式（１）の相互作用基R^1に相当し、２価の基（－ＣＨ（L^{21}－R^{21}）－）が式（１）のシグナル物質結合性基を含む連結基R^2に相当し、L^{12}が式（１）の直接結合又は連結基L^1に相当する。

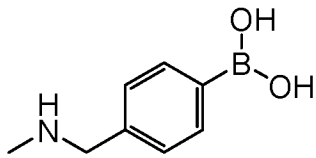
[0067] 式（１２）において、R^{11}はカルボキシアリール基又はスルホアリール基を示し、具体的には、上述の[5]カルボキシル基と[26]置換又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるカルボキシアリール基、[6]スルホ基と[26]置換

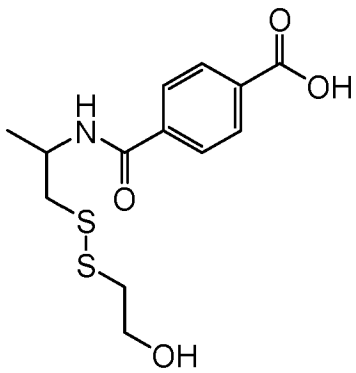
又は無置換のアリーレン基との組み合わせであるスルホアリール基として述べた通りである。また、式（１２）において、２価の基（－ＣＨ（Ｌ^{21}－Ｒ^{21}）－）は、上記式（３）として述べた通りである。さらに、式（１２）において、Ｌ^{12}は２価連結基を表す、当該２価連結基としては、アルキレン基、カルボニル基、エステル結合（－ＣＯＯ－又は－ＯＣＯ－）、アミド結合（－ＣＯＮＨ－又は－ＮＨＣＯ－）、及びそれらの任意の組み合わせからなる基が挙げられ、好ましくはアミド結合が挙げられる。

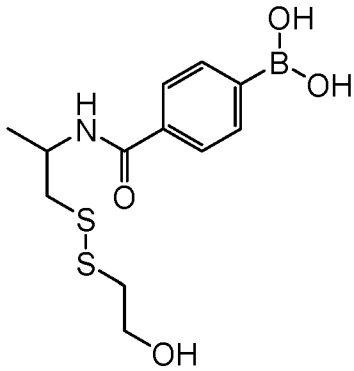
[0068] 下記式（１１）及び（１２）で示した基の更なる具体例を、それぞれ、下記式（１１ａ），（１１ｂ）、及び下記式（１２ａ），（１２ｂ）に示す。

[0069] [化11]


(11a)


(11b)


(12a)


(12b)

[0070] これらの機能性基２２は、１個のセンシング用ナノ粒子あたり、１種のみが存在していても複数種が存在していてもよく、１個のみが存在していても複数個が存在していてもよい。また、これらの機能性基２２は、１個の分子プリント空間あたり、１種のみが存在していても複数種が存在していてもよく、１個のみが存在していても複数個が存在していてもよい。

[0071] ［１－１－４．分子インプリントポリマーの構成モノマー］

分子インプリントポリマー２０を構成するポリマーは、少なくとも、機能性基２２を有する機能性モノマー由来の構成単位を含む。また、分子インプリントポリマー２０を構成するポリマーは、機能性モノマー由来の構成単位

と共に、Ｎ－置換又は無置換のアクリルアミド及び／又は生体適合性モノマー由来の構成単位を含むことができる。好ましくは、分子インプリントポリマー２０を構成するポリマーは、機能性モノマー由来の構成単位と共に、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド及び生体適合性モノマー由来の構成単位を含む。なお、分子インプリントポリマー２０を構成するポリマーは機能性モノマー、Ｎ－置換又は無置換のアクリルアミド、生体適合性モノマーとは異なるモノマー由来の構成単位を含んでいてもよい。

[0072] （機能性モノマー）

機能性基２２を有する機能性モノマーは、機能性基とエチレン性不飽和基とを含むモノマーであれば特に限定されず、例えば下記式（５）で示される。

[0073] [化12]

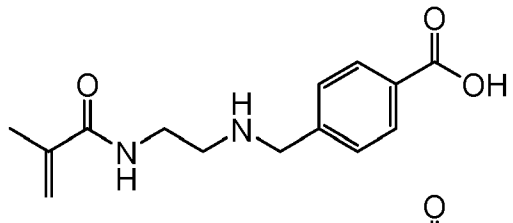
$$X-L^5-R^2-L^1-R^1 \qquad (5)$$

[0074] 式（５）中、Ｘはエチレン性不飽和基を表し、L^5は連結基を表し、$-R^2-L^1-R^1$は、機能性基を表す。エチレン性不飽和基としては、アクリル基及びメタクリル基が挙げられる。連結基としては、アルキレン基、カルボニル基、エステル結合（－ＣＯＯ－又は－ＯＣＯ－）、アミド結合（－ＣＯＮＨ－又は－ＮＨＣＯ－）、及びそれらの任意の組み合わせからなる基が挙げられ、好ましくはアルキレン基及びアミド結合がそれぞれ任意の数で結合した基が挙げられる。機能性基としては、上記の「１－１－３．機能性基の構造」で詳述した通りである。

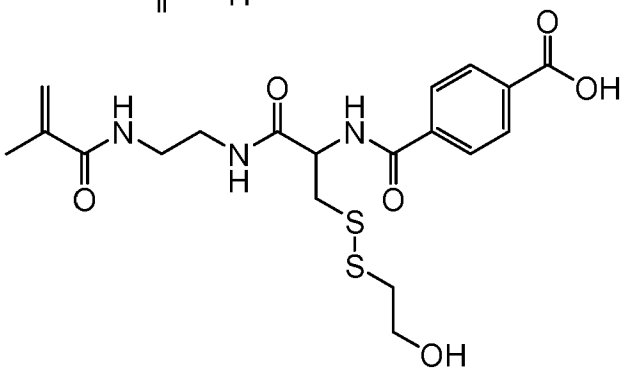
[0075] 式（５）で表される機能性モノマーの具体例としては、下記式（５１ａ）、（５２ａ）、（５１ｂ）、（５２ｂ）に示される機能性モノマーが挙げられる。

[0076]

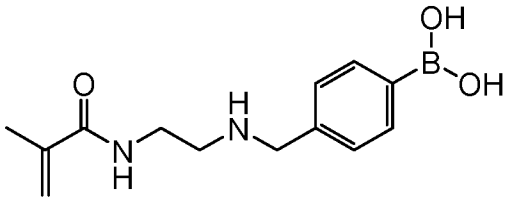
[化13]



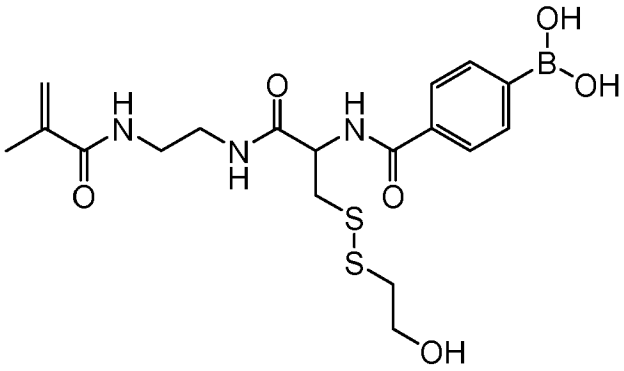
(51a)



(52a)



(51b)

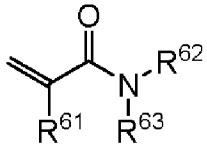


(52b)

[0077] （Ｎ－置換又は無置換のアクリルアミド）

Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドについて、Ｎ－置換（メタ）アクリルアミドは、下記式（６）で示される。

[0078] [化14]



(6)

[0079] 式（６）中、R^{61}は、水素又はメチル基、好ましくは水素を表し、R^{62}及びR^{63}は、それぞれ独立に、水素；炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のアルキ

ル基；炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のヒドロキシアルキル基；若しくは炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のアミノアルキル基を表し、これらは互いに同じ又は異なっていてよく（但し、R^{62}及びR^{63}がいずれも水素である場合を除く。）；また、R^{62}及びR^{63}が、それらを担持する窒素原子と共に酸素原子を含む飽和５～７員環を形成していてもよい。

[0080] 炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ｎ－ペンチル基、ｎ－ヘキシル基等が挙げられる。炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、１－ヒドロキシエチル基、２－ヒドロキシエチル基、１－ヒドロキシ－ｎ－プロピル基、２－ヒドロキシ－ｎ－プロピル基、３－ヒドロキシ－ｎ－プロピル基、１－ヒドロキシイソプロピル基、２－ヒドロキシイソプロピル基、１－ヒドロキシ－ｎ－ブチル基、１－ヒドロキシ－ｎ－ペンチル基、１－ヒドロキシ－ｎ－ヘキシル基等が挙げられる。炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のアミノアルキル基としては、アミノメチル基、１－アミノエチル基、２－アミノエチル基、１－アミノ－ｎ－プロピル基、２－アミノ－ｎ－プロピル基、３－アミノ－ｎ－プロピル基、１－アミノイソプロピル基、２－アミノイソプロピル基、１－アミノ－ｎ－ブチル基、１－アミノ－ｎ－ペンチル基、１－アミノ－ｎ－ヘキシル基等が挙げられる。窒素原子と共に酸素原子を含む飽和５～７員環としては、モルホリン環等が挙げられる。

[0081] これらのＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドの中でも、好ましくはＮ－置換の（メタ）アクリルアミドが挙げられ、より好ましくはＮ－モノ置換（メタ）アクリルアミドが挙げられ、さらに好ましくはＮ－アルキル（メタ）アクリルアミド（アルキル基は、上記の炭素数１～６の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基）が挙げられ、一層好ましくはＮ－イソプロピル（メタ）アクリルアミドが挙げられ、特に好ましくはＮ－イソプロピルアクリルアミドが挙げられる。

[0082] （生体適合性モノマー）

生体適合性とは、生体物質の接着を誘起しない性質をいう。分子インプリントポリマー２０を構成するポリマー生体適合性モノマーに由来する成分を含むことにより、非特異的吸着を一層抑制することができる。生体適合性モノマーとしては、好ましくは親水性モノマーが挙げられ、より好ましくは双性イオンモノマーが挙げられる。

[0083] 双性イオンモノマーは、酸性官能基（たとえば、リン酸基、硫酸基、およびカルボキシル基等）に由来するアニオン基と、塩基性官能基（たとえば、１級アミノ基、２級アミノ基、３級アミノ基および４級アンモニウム基等）に由来するカチオン基との両方を１分子中に含む。双性イオンモノマーの種類としては、ホスホベタイン、スルホベタイン、およびカルボキシベタイン等が挙げられる。

[0084] ホスホベタインとしては、ホスホリルコリン基を側鎖に有する分子が挙げられ、好ましくは、２－メタクリロイロキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）等が挙げられる。スルホベタインとしては、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－（３－スルホプロピル）－３’－メタクリロイルアミノプロパンアミニウムインナーソルト（ＳＰＢ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－（４－スルホブチル）－３’－メタクリロイルアミノプロパンアミニウムインナーソルト（ＳＢＢ）等が挙げられる。カルボキシベタインとしては、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－（１－カルボキシメチル）－２’－メタクリロイロキシエタンアミニウムインナーソルト（ＣＭＢ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－２’－メタクリロイロキシエタンアミニウムインナーソルト（ＣＥＢ）等が挙げられる。

[0085] これらの生体適合性モノマーの中でも、好ましくはホスホベタインが挙げられ、より好ましくはホスホリルコリン基を側鎖に有する分子が挙げられ、さらに好ましくは２－メタクリロイロキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）が挙げられる。

[0086] ［１－２．シグナル基］

シグナル基３１は、センシング対象となる生体物質９０と、分子インプリント空間２１における相互作用基R^1との結合情報を与えるものとして機能する。シグナル基３１としては、センシング対象となる生体物質９０と相互作用基R^1との結合により環境変化を受けることでシグナルが変化するものであれば特に限定されない。シグナルの変化の態様としては、シグナル強度の変化、及びスペクトルの変化（例えばピークのシフト）が挙げられる。

[0087] シグナル基３１の例としては、蛍光基、放射性元素含有基、磁性基等が挙げられる。検出容易性等の観点から、シグナル基３１としては蛍光基であることが好ましい。蛍光基としては、非生体物質系の基であることが好ましく、例えば、フルオレセイン系色素、インドシアニン色素などのシアニン系色素、ローダミン系色素などの蛍光色素等が挙げられる。放射性元素含有基としては、^{18}Ｆ等の放射性同位体でラベルした、糖、アミノ酸、核酸、^{19}ＦでラベルしたMRIプローブ等が挙げられる。磁性基としては、フェリクロームなどの磁性体を有する基等が挙げられる。

[0088] ［１－３．他の構造］

上記「１－１－２．分子インプリント空間内に配された機能性基」で述べたとおり、本発明においては、分子インプリント空間２１に機能性基２２が存在している限り、分子インプリント空間２１以外の分子インプリントポリマー２０表面に機能性基２２が存在していることを許容する。本発明のセンシング用ナノ粒子には、分子インプリント空間２１以外の分子インプリントポリマー２０表面に機能性基２２が存在する場合、分子インプリント空間２１以外の分子インプリントポリマー２０表面に存在する機能性基２２に、キャッピング修飾基が結合していてもよい。

[0089] キャッピング修飾基とは、機能性モノマーの機能を阻害する化合物により導入された基である。機能性モノマーの機能を阻害する化合物（キャッピング化合物）としては、非シグナル物質であって、生体物質の吸着抑制等に用いられる化合物（例えば、オリゴエチレングリコール鎖を有する化合物）及び糖鎖構造を有する化合物等が挙げられる。キャッピング修飾基の結合位置

としては、機能性基２２の相互作用基Ｒ'及び／又はシグナル物質結合性基が挙げられる。このようなキャッピング修飾基は、機能性基２２を外部から遮蔽するため、非特異的な結合及びバックグラウンドシグナルの抑制効果をより一層高く得ることができる。

[0090] ［１－４．センシング対象となる生体物質］

本発明のセンシング用ナノ粒子のセンシング対象は、生体物質である。本発明において、生体物質とは、生体を構成する基本材料となる分子に分類される分子種をいい、一般的には、炭素及び水素を含み、さらに、窒素、酸素、リン、及び／又は硫黄等を構成元素として含み、生物学的機能又は生物学的意義を有する分子である。生体物質の具体例としては、タンパク質（ペプチドも含む。以下において同様。）、糖鎖、脂質（例えばリン脂質等）、これらの２以上の複合分子、及びタンパク質と補因子（例えば補酵素及び補欠分子族が挙げられ、具体的には、タンパク質以外の有機分子及び金属イオンが挙げられる）とを含む複合分子等が挙げられる。本発明において、生体物質としては、天然物及び人工物を問わない。図３においては、便宜上、センシング対象となる生体物質９０としてヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）を例示しているが、この生体物質９０は、本発明がセンシング対象とするあらゆる生体物質を意図している。

[0091] 生体物質の好ましい例としては、タンパク質が挙げられる。以下の説明において、タンパク質には、糖、脂質、補因子のいずれも有さない通常のタンパク質と、糖、脂質、補因子の少なくともいずれを含む複合タンパク（例えば、糖タンパク質、リポタンパク質、金属タンパク質等）のいずれをも包含する。タンパク質としては、天然タンパク質及び人工タンパク質を問わない。天然タンパク質は、自然選択の結果生成したタンパク質である。人工タンパク質としては、天然タンパク質のアミノ配列の一部を人為的に改変したもの、天然タンパク質に対して人為的に修飾基を導入又は除外したもの等が挙げられる。

[0092] 生体物質９０としては、生体内での存在形態の観点から、体液中に分泌さ

れる遊離分子（例えば、遊離タンパク質、遊離糖鎖等）、膜構造体（例えば、細胞、ウイルス、細胞外小胞（エクソソーム等）又は細胞小器官等）の生体膜に付着又は結合している物質（例えば、膜タンパク質、膜糖鎖）、及び生体膜の露出している部分構造に相当する分子（例えば、ホスファチジルセリン等のリン脂質等）が挙げられる。また、生体物質９０としては、特定の生体分子の断片であってもよい。このような断片としては、特定の生体分子（例えば、抗体等）から特定の領域（例えばドメイン）を切り出して得られる分子、人為的に当該領域部分のみを作製して得られる分子が挙げられる。さらに、生体物質９０としては、その機能の観点から、血漿タンパク質、バイオマーカー、ドメイン、酵素、ホルモン等が挙げられる。血漿タンパク質としては、アルブミン、γ－グロブリン、フィブリノゲン等が挙げられる。バイオマーカーとしては、腎機能マーカー、肝機能マーカー、炎症マーカー、腫瘍マーカー等が挙げられ、より具体的には、尿中アルブミン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、トランスフェリン、セルロプラスミン、乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）、アルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）、γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（γ－ＧＴＰ）、Ｃ反応性蛋白（ＣＲＰ）、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、各種抗原（例えば、糖鎖抗原１９－９（ＣＡ１９－９）癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、エクソソーム特異的抗原（ＣＤ６３、ＣＤ９、ＣＤ８１、ＣＤ３７、ＣＤ５３、ＣＤ８２、ＣＤ１３、ＣＤ１１、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、Ｒａｂ５、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ、ＬＡＭＰ１等）等）が挙げられる。生体物質９０としては、由来生物の観点から、ヒト由来生体物質及びヒト以外の生物由来生体物質等が挙げられる。ヒト以外の生物としては特に限定されず、魚類、両生類、爬虫類、哺乳類等の脊椎動物；刺胞動物、甲殻類等の無脊椎動物；種子・裸子植物、藻類等の植物等のあらゆる生物が挙げられ、好ましくは哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ハムスター、ウサギ、及びヤギ等が挙げられる。さらに、生体物質９０としては、イスラ

ム教の戒律の観点から、ハラムに該当する動植物由来の生体物質も挙げられる。

[0093] ［１－５．用途］

本発明のセンシング用ナノ粒子は、上記の生体物質を検出する用途で使用することができる。なお、当該生体物質が、膜構造体（例えば、細胞、ウイルス、細胞外小胞又は細胞小器官等）の生体膜に付着又は結合している物質（例えば、膜タンパク質、膜糖鎖）、及び生体膜の露出している部分構造に相当する分子（例えば、ホスファチジルセリン等のリン脂質等）である場合、若しくは特定の生体分子の断片（例えば、ドメイン等の特定の領域）である場合、本発明のセンシング用ナノ粒子は、上記生体物質を介して、当該生体物質を有する膜構造体（細胞、ウイルス、細胞外小胞（例えば、エクソソーム等）又は細胞小器官等）若しくは当該断片（例えば、ドメイン等の特定の領域）を部分構造に持つ特定の生体分子（例えば、抗体等）を検出する用途で使用することができる。

[0094] 本発明のセンシング用ナノ粒子のより具体的な用途としては、生体物質の種類により異なるが、例えば、本発明のセンシング用ナノ粒子が、腎機能マーカー、肝機能マーカー、炎症マーカー、腫瘍マーカー等のバイオマーカーのセンシング用に設計される場合、腎機能、肝機能、炎症の有無又は程度、腫瘍の有無又は程度等に基づく診断用途等が挙げられる。

[0095] また、本発明のセンシング用ナノ粒子は優れた特異性により、異種生物間の同種生体物質を識別することができるため、本発明のセンシング用ナノ粒子のより具体的な用途としては、前記生体物質がハラムに該当する動植物由来の生体物質である場合、食品中にハラムに該当する動植物由来の生体物質（例えば、ブタ血清アルブミン等）の混在の有無を確認するハラルチェックの用途も挙げられる。

[0096] ［２．センシング用ナノ粒子の製造方法］

［２－１．製造方法１］

本発明は、上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べた本発明のセンシン

グ用ナノ粒子の製造方法も提供する。本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法は、生体物質を鋳型として、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマーを含むモノマー成分を重合させることで、分子インプリントポリマーを合成する工程１と；前記分子インプリントポリマーから前記鋳型を除去する工程２と、を含む。また、本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法は、前記工程２の後、前記分子インプリントポリマーにおけるシグナル物質結合性基にシグナル物質を結合させる工程３を含むことができる。本発明の製造方法においては、工程１におけるモノマー成分に、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド及び／又は生体適合性モノマーが更に含まれていてもよい。

[0097] なお、この製造方法１においては、工程１に先立って、鋳型となる生体物質に対して、共有結合による表面修飾（例えば、分子インプリント空間に相互作用基及びシグナル物質結合性基を局在させることを目的として行われる処置）等を行う必要が無い。また、この製造方法１は、上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べた本発明のセンシング用ナノ粒子のいずれについても適用できるが、前記相互作用基が、置換又は無置換のアミノ基、置換又は無置換の芳香族基、アミジノ基、グアニジノ基、カルボキシル基、スルホ基、ボロニル基からなる群より選択される場合に適用されることが好ましい。

[0098] 図４に、本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法の一例における工程１を模式的に示す。又、図５に、本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法の一例における工程２及び３を模式的に示す。以下、これらの図を参照して本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法について詳述する。

[0099] ［２－１－１．工程１］

工程１では、図４に示すように、生体物質９０’を鋳型として、生体物質９０’との相互作用基R^1及び相互作用基R^1とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基２２を有する機能性モノマーＭ２２を含むモノマー成分を重合させることで、分子インプリントポリマーを合成する。図４の例において

は、モノマー成分は、機能性モノマーＭ２２とともに、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３及び生体適合性モノマーＭ２４を含む。

[0100] 鋳型となる生体物質９０’は、センシング対象となる生体物質９０と同種の生体物質である。例えば、センシング対象となる生体物質９０がＨＳＡであれば、鋳型となる生体物質９０’としてもＨＳＡを用いることができる。従って、鋳型となる生体物質９０’はとしては、上記「１－４．センシング対象となる生体物質」で挙げたものが挙げられる。

[0101] 重合反応液中の鋳型となる生体物質９０’の濃度としては特に限定されないが、例えば０．５～５μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１～３μｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１．５～２．５μｍｏｌ／Ｌが挙げられる。

[0102] 機能性モノマーＭ２２としては、上記「１－１－４．分子インプリントポリマーの構成モノマー」の「（機能性モノマー）」で述べた通りである。

[0103] 重合反応液中の機能性モノマーＭ２２の濃度としては特に限定されないが、例えば、１～６ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは２～４ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは２．５～３．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型となる生体物質９０’に対する機能性モノマーＭ２２の使用量としては、鋳型となる生体物質９０’の１μｍｏｌ当たりの機能性モノマーＭ２２の使用量として、好ましくは０．５～４ｍｍｏｌ、より好ましくは１～２ｍｍｏｌ、さらに好ましくは１．３～１．７ｍｍｏｌが挙げられる。

[0104] Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３としては、上記「１－１－４．分子インプリントポリマーの構成モノマー」の「（Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド）」で述べた通りである。

[0105] 重合反応液中のＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３の濃度としては特に限定されないが、例えば、２０～６０ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは３０～５０ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは３５～４０ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型となる生体物質９０’に対するＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３の使用量としては、鋳型となる生体物質９０’の１μｍｏｌ当たりのＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２

３の使用量として、好ましくは５～４０ｍｍｏｌ、より好ましくは１０～３３ｍｍｏｌ、さらに好ましくは１５～２０ｍｍｏｌが挙げられる。さらに、機能性モノマーＭ２２に対するＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３の使用量としては、機能性モノマーＭ２２の１モル当たりのＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドＭ２３の使用量として、好ましくは５～３０モル、より好ましくは８～２０モル、さらに好ましくは１０～１５モルが挙げられる。

[0106] 生体適合性モノマーＭ２４としては、上記「１－１－４．分子インプリントポリマーの構成モノマー」の「（生体適合性モノマー）」で述べた通りである。

[0107] 重合反応液中の生体適合性モノマーＭ２４の濃度としては特に限定されないが、例えば、０．５～５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１～３．５ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１．５～２．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型となる生体物質９０’に対する生体適合性モノマーＭ２４の使用量としては、鋳型となる生体物質９０’の１μｍｏｌ当たりの生体適合性モノマーＭ２４の使用量として、好ましくは０．３～３．５ｍｍｏｌ、より好ましくは０．５～２ｍｍｏｌ、さらに好ましくは０．８～１．２ｍｍｏｌが挙げられる。さらに、機能性モノマーＭ２２に対する生体適合性モノマーＭ２４の使用量としては、機能性モノマーＭ２２の１モル当たりの生体適合性モノマーＭ２４の使用量として、好ましくは０．１～１．５モル、より好ましくは０．２～１モル、さらに好ましくは０．４～０．８モルが挙げられる。

[0108] 重合反応液中には、適宜、架橋剤、開始剤、及び溶剤が含まれる。

[0109] 架橋剤としては、２以上のエチレン性不飽和基がリンカー基により結合された化合物を挙げることができる。具体的な架橋剤の例としては、下記式（７）で示されるものが挙げられる。

[0110] [化15]



(7)

[0111] 式（７）中、Ｗは互いに同じ又は異なっていてよいエチレン性不飽和基を表し、Ｚはリンカー基を表す。エチレン性不飽和基としてはアクリル基及びメタクリル基が挙げられる。リンカー基としては、リンカー基としては、例えば、炭素数１～６、好ましくは２～６のアルキレン基、アミノ基（－ＮＨ－）、エーテル基、カルボニル基、エステル結合（－ＣＯＯ－又は－ＯＣＯ－）、アミド結合（（－ＣＯＮＨ－又は－ＮＨＣＯ－））、スルホキシド基（－ＳＯ－）、スルホニル基（－SO_2－）、及びこれら２以上が結合した基が挙げられる。２以上の上記基が結合して上記リンカー基が構成されている場合、当該結合数としては、５以下または４以下が好ましく、３以下または２がより好ましい。より具体的な架橋剤の例としては、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド、エチレングリコールジメタクリレート等の低分子架橋剤が挙げられ、好ましくはＮ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミドが挙げられる。

[0112] 重合反応液中の架橋剤の濃度としては特に限定されないが、例えば、０．５～５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１～３．５ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１．５～２．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。

[0113] 開始剤としては、過硫酸アンモニウム及び過硫酸カリウム等の過酸化物、アゾビスイソブチロニトリル、２，２’－アゾビス（２－メチルプロピオンアミジン）２塩酸塩等のアゾ系重合開始剤が挙げられ、好ましくはアゾ系重合開始剤が挙げられ、より好ましくは２，２’－アゾビス（２－メチルプロピオンアミジン）２塩酸塩が挙げられる。

[0114] 重合反応液中の開始剤の濃度としては特に限定されないが、例えば、１～１５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは３～１２ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは５～１０ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。

[0115] 溶剤としては、緩衝液等の水系の溶媒が用いられ、好ましくは、リン酸緩衝液が挙げられる。また、溶剤には、ＮａＣｌを含んでいることが好ましく、ＮａＣｌの濃度としては、例えば１００～２００ｍＭ、好ましくは１２０～１６０ｍＭが挙げられる。また、溶剤のｐＨとしては、鋳型９０’の変性

を生じないｐＨが適宜選択され、例えば６～８、好ましくは６．８～７．８、より好ましくは７．２～７．６が挙げられる。

[0116] 工程１の重合反応系においては、図４に示すように、モノマー成分のうちの機能性モノマーＭ２２が、相互作用基Ｒ[1]を介して鋳型９０’の所定の部位と特異的に相互作用することで、機能性モノマーＭ２２－鋳型９０’の複合体が形成される。このような複合体が形成されている状態で重合反応が進行することで、鋳型９０’の表面形状と相補的な分子インプリント空間（凹部）が形成されるとともに、機能性基２２を分子インプリント空間（凹部）表面に存在させることができる。また、鋳型９０’がポリマー界面近傍に存在しやすいことで効率的に分子インプリント空間が形成される。

[0117] 分子インプリントポリマーのナノ粒子を得るための具体的な重合方法としては、無乳化剤沈殿重合法、分散重合法、乳化重合法、シード乳化重合法などが挙げられ、好ましくは無乳化剤沈殿重合法が挙げられる。

[0118] 工程１では、重合反応液を、重合反応を進行させる温度条件に供する前に、機能性モノマーＭ２２－鋳型９０’の複合体を十分形成させるために、１～１５℃、好ましくは１～１０℃、より好ましくは２～６℃の低温条件に供することが好ましい。低温条件に供する時間としては、例えば２０～３０時間が挙げられる。重合反応を進行させる温度条件としては、例えば４０～７６℃、好ましくは５０～７４℃、より好ましくは６０～７２℃が挙げられる。重合反応を進行させる温度条件に供する時間としては、例えば１０～１５時間が挙げられる。なお、重合反応が加熱条件で行われても、鋳型は、分子インプリント空間の特異性を失わせる変性を来さない程度にその形状が保持されるため、分子インプリント空間の特異性を効果的に獲得することができる。

[0119] このようにして、分子インプリントポリマー２０部分が合成され、分子インプリントポリマー２０と鋳型９０’との複合体を得る。分子インプリントポリマー２０と鋳型９０’との複合体は、相互作用基Ｒ[1]と鋳型９０’との間の非共有結合的な結合（非共有結合、及び共有結合の中でも非共有結合程度

に弱い結合を含む）により形成されている。

[0120] ［２－１－２．工程２］

工程２では、図５に示すように、分子インプリントポリマー２０と鋳型９０’との複合体から鋳型９０’を除去する。分子インプリントポリマー２０と鋳型９０’との複合体において、相互作用基R^1と鋳型９０’との結合が非共有結合的な弱い結合であるため、酸化剤又は還元剤等の強い酸化又は還元作用等を示す開裂用試薬を加えることなく、容易に鋳型９０’を乖離して除去することができる。

[0121] ここで、本発明の製造方法とは異なり、鋳型に対して、可逆結合（ジスルフィド基、オキシイミノ基等の共有結合）を有する機能性モノマーを予め導入しておき、分子インプリンティング重合によりナノ粒子を形成した後、開裂用試薬で可逆結合を切断して鋳型を除去し、可逆結合に由来する官能基（チオール基、オキシアミノ基等の、シグナル物質結合性基及び／又は相互作用基として機能する基）を分子インプリント空間内に局在させようとした場合、鋳型と分子インプリントポリマーとの間が共有結合であるため、開裂用試薬をもってしても、鋳型は容易には除去できない。この場合において鋳型をより確実に除去するためには、予め、鋳型に機能性モノマーを導入しておくだけでなく、このような鋳型をシリカのような担体に担持させておき、分子インプリンティング重合後の鋳型除去において、担体ごと除去する必要がある。一方で、本発明の製造方法は、分子インプリンティング重合に先立って鋳型９０’に機能性モノマーを導入する工程も、鋳型９０’を担体に担持させる工程も不要であるうえに、分子インプリントポリマー２０と鋳型９０’との複合体からの鋳型９０’の除去も容易であるため、製造容易性の点でも優れている。

[0122] 鋳型９０’の除去は、相互作用基R^1と鋳型９０’との結合様式に基づいて、当業者が適宜決定することができる。好ましくは、工程１を終えた反応液をクロマトグラフィ（好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィ）に供し、この時に用いられる移動相を、鋳型分子の溶離液としても用いることで、

鋳型９０’を除去することができる。除去された鋳型９０’は、クロマトグラフィによって、分子インプリントポリマー２０から分離され、分子インプリントポリマー２０が精製される。

[0123] 移動相としては、好ましくはトリス塩酸緩衝液が挙げられる。また、移動相には、ＮａＣｌを含んでいることが好ましく、ＮａＣｌの濃度としては、工程１で用いた溶剤における濃度と同じであってよく、例えば１００～２００ｍＭ、好ましくは１２０～１６０ｍＭが挙げられる。また、移動相のｐＨとしては、工程１で用いた溶剤のｐＨと同じであってよく、例えば６～８、好ましくは６．８～７．８、より好ましくは７．２～７．６が挙げられる。

[0124] このようにして、センシング用ナノ粒子１０が合成される。

[0125] ［２－１－３．工程３］

工程３では、図５に示すように、分子インプリントポリマー２０におけるシグナル物質結合性基にシグナル物質３０を結合させる。

[0126] シグナル物質３０は、シグナル基３１と、結合性基３２とを含む。シグナル基３１としては、上述「１－２．シグナル基」で述べた通りである。結合性基３２は、シグナル物質結合性基と共有結合可能な基であり、具体的には、シグナル物質結合性基の種類（アミノ基（１価アミノ基及び２価アミノ基を含む）、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基（１価基）、アミノオキシ基、アルデヒド基、又は水酸基）に応じて当業者が適宜決定することができる。

[0127] シグナル物質３０を分子インプリントポリマー２０に導入する具体的な条件は、結合性基３２の種類とグナル物質結合性基の種類とに基づいて、両者が化学反応して共有結合を形成できる条件を当業者が適宜決定することができる。

[0128] このようにして、センシング用ナノ粒子１０ａが合成される。

[0129] ［２－１－４．他の工程］

上記「１－３．他の構造」で述べたキャッピング修飾基を有するセンシング用ナノ粒子を得る場合、合成したセンシング用ナノ粒子１０に対して、以

下の工程を行うことができる。またこの場合、キャッピング修飾基を導入した後に、シグナル基の導入を行うことが好ましい。

[0130] まず、センシング用ナノ粒子１０に対して、ごく少量の生体物質（センシング対象となる生体物質９０及び鋳型となる生体物質９０’と同種の生体物質）を添加し、分子インプリント空間２１を当該生体物質で塞いで保護する（保護工程）。次に、機能性モノマーの機能を阻害する化合物（キャッピング化合物）を反応させて、分子インプリント空間２１以外の分子インプリントポリマー２０表面に存在する機能性基２２の、相互作用基R^1及び／又はシグナル物質結合性基に、キャッピング修飾基を結合させる（キャッピング修飾工程）。機能性モノマーの機能を阻害する化合物（キャッピング化合物）としては、非シグナル物質であって、一般的な生体物質の吸着抑制等に用いられる化合物（例えば、オリゴエチレングリコール鎖を有する化合物）及び糖鎖構造を有する化合物等が挙げられる。次に、結合させていた当該生体物質を除去することで分子インプリント空間２１を再生する（脱保護工程）。

[0131] ［２－２．製造方法２］

上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べた本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法は、上記「２－１．製造方法１」で述べた方法に限定されない。本発明のセンシング用ナノ粒子の製造方法は、生体物質の表面が可逆的連結基を介して重合性官能基で修飾された、分子インプリントの鋳型を用意する工程１１と；前記重合性官能基を基質とし、前記鋳型の前記表面の一部に対する分子インプリントポリマーを合成する工程１２と；前記可逆的連結基を開裂させて前記分子インプリントポリマーから前記鋳型を除去する工程１３と；前記生体物質との相互作用基を結合させるための基及びシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する分子を、可逆的連結基を介して導入する工程１４と、を含むことができる。さらに、この製造方法２は、上記工程１１～１４を行う工程に加え；前記生体物質との相互作用基を結合させるための基に、前記生体物質との相互作用基を与える分子を結合する工程と；前記シグナル物質結合性基にシグナル物質を結合する工程と、を含むことができる

。

[0132] この製造方法２は、上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べた本発明のセンシング用ナノ粒子のいずれについても適用できるが、前記相互作用基が前記生体分子のリガンドである場合に適用されることが好ましい。

[0133] ［３．センシング用基板及びセンシング用試薬］

上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べた本発明のセンシング用ナノ粒子の適用例としては、センシング用基板及びセンシング用試薬が挙げられる。

[0134] ［３－１．センシング用基板］

センシング用基板は、基板と、前記基板に固定されたセンシング用ナノ粒子とを含む。図６に、センシング用基板の一例を模式的に示す。また、図７に、センシング用基板の他の例を模式的に示す。図６に示すセンシング用基板１は、基板４０と、基板４０に固定されたセンシング用ナノ粒子１０とを含む。図７に示すセンシング用基板１ａは、基板４０と、基板４０に固定されたセンシング用ナノ粒子１０ａとを含む。

[0135] 基板４０の材料としては、金属、ガラス、及び樹脂からなる群から選択される材料が挙げられる。金属としては、金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン等が挙げられる。樹脂としては、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリスチレン、ＡＢＳ（アクリロニトリル－ブタジエン－スチレン共重合体）、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリウレタン、シリコーン樹脂、フッ素樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂等が挙げられる。

[0136] 基板４０は、上述の材料から選ばれる複数の材料が組み合わされて形成されたものであってもよい。例えば、基板４０は、ガラス又は樹脂の表面に、金属膜が設けられたものであってもよい。

[0137] 基板４０は、シグナル基３１のセンシング手段に適合したものを用いることができる。例えば、基板４０として、表面プラズモン（ＳＰＲ）基板、表

面増強ラマン散乱（SERS）基板等が挙げられる。

[0138] 基板４０に固定されたセンシング用基板１としては、上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べたセンシング用ナノ粒子１０として述べた通りである。図示された態様では、便宜上、センシング用ナノ粒子１０の向きが統一されているが、センシング用ナノ粒子１０の向きはランダムであってもよい。

[0139] 図６に示すセンシング用基板１は、上記「１．センシング用ナノ粒子」で述べたセンシング用ナノ粒子１０を、基板４０表面に固定することで得られる。

[0140] センシング用ナノ粒子１０を基板４０表面へ固定する方法としては特に限定されず、ポリマーナノ粒子を基板表面へ固定する一般的な方法を、当業者が適宜決定することができる。このような方法は、例えば、基板４０表面に、結合性官能基を表面に有する分子膜を形成する分子膜形成工程と、形成された分子膜表面の結合性官能基に、センシング用ナノ粒子１０を結合させる工程とによって行うことができる。なお、分子膜表面の結合性官能基と結合するセンシング用ナノ粒子１０表面の官能基としては、例えば、当該表面に残存する機能性モノマー由来の相互作用基及び／又はシグナル物質結合性基、並びに／若しくは、センシング用ナノ粒子１０を構成するポリマーの末端に残存する開始剤由来の官能基等が挙げられる。

[0141] 図示された態様では、基板４０表面に、結合性官能基としてカルボキシル基を表面に有する分子膜を形成し、当該カルボキシル基とセンシング用ナノ粒子１０表面のアミノ基との間でアミド結合を形成することによって、センシング用ナノ粒子１０を結合させた例を示している。

[0142] また、図７に示すセンシング用基板１ａは、上記のセンシング用基板１に対してシグナル基を導入することによって得ることができる。シグナル基の導入方法としては、上記「２－３．工程３」において述べた通りである。また、図７に示すセンシング用基板１ａは、基板４０に固定するセンシング用ナノ粒子として、センシング用ナノ粒子１０に代えてセンシング用ナノ粒子１０ａを用い、上記のセンシング用基板１の製造方法と同様にして得ること

もできる。

[0143] センシング用基板は、上記項目１－４に示した生体物質を検出する用途で使用することができる。なお、当該生体物質が、膜構造体（例えば、細胞、ウイルス、細胞外小胞又は細胞小器官等）の生体膜に付着又は結合している物質（例えば、膜タンパク質、膜糖鎖）、及び生体膜の露出している部分構造に相当する分子（例えば、ホスファチジルセリン等のリン脂質等）である場合、若しくは特定の生体分子の断片（例えば、ドメイン等の特定の領域）である場合、センシング用基板は、上記生体物質を介して、当該生体物質を有する膜構造体（細胞、ウイルス、細胞外小胞（例えば、エクソソーム等）又は細胞小器官等）若しくは当該断片（例えば、ドメイン等の特定の領域）を部分構造に持つ特定の生体分子（例えば、抗体等）を検出する用途で使用することができる。より具体的な用途としては、センシング対象となる生体物質の種類により異なるが、例えば、腎機能マーカー、肝機能マーカー、炎症マーカー、腫瘍マーカー等のバイオマーカーのセンシング用に設計されたセンシング用基板は、腎機能、肝機能、炎症の有無又は程度、腫瘍の有無又は程度等に基づく診断用途等が挙げられる。また、本発明のセンシング用基板のより具体的な用途としては、前記生体物質がハラムに該当する動植物由来の生体物質である場合、食品中にハラムに該当する動植物由来の生体物質（例えば、ブタ血清アルブミン等）の混在の有無を確認するハラルチェックの用途も挙げられる。

[0144] ［３－２．センシング用試薬］

センシング用試薬は、センシング用ナノ粒子を含む。センシング用試薬におけるセンシング用ナノ粒子は、基板などのバルクな基材に固定されていない。

[0145] センシング用試薬は液状又は固形状（例えば粉末状）に製剤されている。センシング用試薬は、薬学的に許容される他の成分を含む。他の成分としては、センシング用試薬の安定性及び認識能に影響を与えない固体及び／又は液体が適宜選択され、例えば、水、ＮａＣｌ等の塩、緩衝剤、安定剤、酸化

防止剤、防腐剤、ｐＨ調整剤、界面活性剤、賦形剤、結合剤等が挙げられる。

[0146] センシング用試薬は、センシング用ナノ粒子１０又はセンシング用ナノ粒子１０ａと、上記の他の成分とを用いて、通常の製剤方法に基づいて製剤することで得られる。

[0147] センシング用試薬の用途の一例としては、上記のセンシング用基板の用途として挙げたのと同じ用途が挙げられる。センシング用試薬の用途の他の例としては、センシング用粒子が基板に固定されていない特徴を利用したｉｎ　ｖｉｔｒｏイメージング及びｉｎ　ｖｉｖｏイメージングが挙げられる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏイメージングの一例として、細胞内又は表面の生体物質をセンシング対象としたセンシング用ナノ粒子１０ａを作製し、当該細胞に対して添加することで、細胞内又は表面の生体物質９０の動態を蛍光顕微鏡などのシグナル検出手段でイメージングする方法が挙げられる。ｉｎ　ｖｉｖｏイメージングの一例として、体内に存在する生体物質をセンシング対象としたセンシング用ナノ粒子１０ａを作製し、実験動物などの動物の循環器、例えば血液に投与し、生体物質９０の体内動態をシグナル検出手段でイメージングする方法が挙げられる。

実施例

[0148] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0149] ［試験例１：センシング用ナノ粒子の合成－１］

本試験例では、図１のセンシング用ナノ粒子１０に相当するヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）センシング用ナノ粒子（以下において、「ＭＩＰ－ＮＧｓ」とも記載する。）を合成した。対比として、分子インプリントを行わなかったことを除いて同様にしてナノ粒子（以下において、「ＮＩＰ－ＮＧｓ」とも記載する。）も合成した。

[0150] １－１．分子インプリントポリマーの合成（工程１）

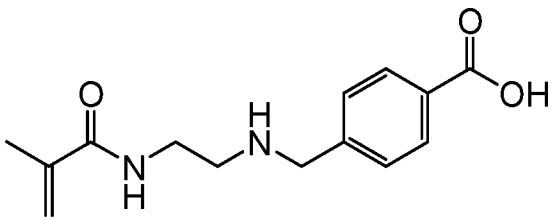
下記表に示した成分の混合物（プレポリマー溶液）をシュレンクフラスコ

５０　ｍＬ中に用意し、機能性モノマーとＨＡＳと十分に相互作用させるために、４℃で２４時間インキュベートした後、窒素雰囲気下、７０℃で１２時間、無乳化剤沈殿重合を行った。一方、対比用のＮＩＰ－ＮＧｓについては、プレポリマー溶液にＨＳＡを含まないことを除いて同様の条件で無乳化剤沈殿重合を行った。

[0151] [表2]

		実施例１ MIP-NGs	比較例１ NIP-NGs
鋳型タンパク質	ヒト血清アルブミン(HSA)	6.70 mg (0.101 μmol)	—
機能性モノマー	式(51a)に示す機能性モノマー	39.3 mg (0.15 mmol)	39.3 mg (0.15 mmol)
N-置換又は無置換の(メタ)アクリルアミド	N-Isopropylacrylamide (NIPAm)	204 mg (1.81 mmol)	6.70 mg (0.101 μmol)
生体適合性モノマー	2-Metacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)	29.5 mg (0.100 mmol)	29.5 mg (0.100 mmol)
架橋剤	N,N'-Methylenbisacrylamide (MBAA)	16.5 mg (0.108 mmol)	16.5 mg (0.108 mmol)
開始剤	2-2'-Azobis(2-methyl propion amide) dihydrochloride (V-50)	109 mg (0.400 mmol)	109 mg (0.400 mmol)
溶媒	10mM PBS buffer pH 7.4 (含140 mM NaCl)	50 mL	50 mL

[0152] [化16]



(51a)

[0153]　なお、式５１ａに示す機能性モノマーは、ベンゼン環、カルボキシル基、及び２級アミノ基を有しており、ＭＩＰ－ＮＧｓにおいて、ベンゼン環がＨＳＡの疎水ポケットと相互作用し、カルボキシル基がＨＳＡのリジン残基に代表される正に帯電した部位と相互作用すると考えられ、さらに、２級アミ

ノ基は、後述のポストインプリンティング修飾（工程３）において蛍光分子の導入に用いる。

[0154] １－２．鋳型の除去（工程２）

以下のようにして、陰イオン交換クロマトグラフィを用いて、粒子の精製を行った。本工程では、陰イオン交換クロマトグラフィ担体とＨＳＡとの強い相互作用を利用することで、分子インプリントポリマーから鋳型を除去した。

[0155] 重合反応後の溶液を、アミコンウルトラ－４、１０ｋＤａの透析チューブを使用して３回限外濾過（２５℃，７５００×ｇ，２０分）を行い、未反応モノマーの除去と、ＰＢＳから１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含有する１０ｍＭトリス塩酸バッファーｐＨ７．４への溶媒置換とを行い、未精製試料を得た。

[0156] 陰イオン交換クロマトグラフィ用クロマト充填剤ＤＥＡＥ－Ｓｅｐｈａｄｅｘ　１．０ｇを、１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含有するトリス塩酸バッファー（ｐＨ７．４）３５ｍＬに加えて２４時間膨潤させ、ポリプロピレン製Ｂｉｇ　ＬｉｂｒａＴｕｂｅ(R)に高さ５．５ｃｍ程度まで充填させた。これに、未精製試料を１ｍＬ添加し、１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含む１０ｍＭトリス塩酸バッファー（ｐＨ７．４）を移動相に用い、溶出液を１．５ｍＬずつ分画した。分画したフラクションの機能性モノマー（機能性基）由来の蛍光（励起波長２８０ｎｍにおける４００ｎｍ）とＨＳＡ由来の蛍光（励起波長２８０ｎｍにおける３４０ｎｍ）を、日立ハイテクノロジー社製　Ｆ－２５００を後いて測定し、ＨＡＳが除去されたことを確認した。２～７番目のフラクションを全て混合し、１０ｋＤａの透析チューブを用いて溶媒をＰＢＳに置換し、５ｍＬまで濃縮した。これにより、ＭＩＰ－ＮＧｓ又はＮＩＰ－ＮＧｓの精製試料液を得た。

[0157] １－３．粒子径の測定

得られたＭＩＰ－ＮＧｓ及びＮＩＰ－ＮＧｓの粒子径を、以下のようにしてＤＬＳ測定（Ｍａｌｖｅｒｎ社製　ＺＥＴＡＳＩＺＥＲ　ＮＡＮＯ－ＺＳ　ＭＡＬ５００７３５）にて評価した。

[0158] 精製試料液を１．５ｍＬマイクロチューブに５００μＬ添加し、９０℃で一晩乾燥させた。乾燥前後の質量から、下記式（式中、w_0は、１．５ｍＬマイクロチューブの重量（ｇ）、w_1は、乾燥前の重量（ｇ）、w_2は、乾燥後の重量（ｇ）を表す。）に基づいて固形分濃度を算出した。結果を下記表に示す。

[0159] [数1]

$$固形分濃度(\%) = \frac{w_2 - w_0}{w_1 - w_0} \times 100$$

[0160] [表3]

	体積平均粒径	固形分濃度
実施例１ MIP-NGs	8.07 nm	0.0429 wt%
比較例１ NIP-NGs	7.90 nm	0.166 wt%

[0161] 表３に示される通り、ＭＩＰ－ＮＧｓ及びＮＩＰ－ＮＧｓについてナノメートルオーダーの粒子の存在が確認された。

[0162] ［試験例２：センシング用基板の作製－１］

本試験例では、以下のようにして、試験例１で得られたＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例１）及びＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例１）を基板上に固定した。具体的には、試験例１で得られたＭＩＰ－ＮＧｓを基板上に固定し、図６のセンシング用基板１に相当するヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）センシング用基板を作製した。また、ＮＩＰ－ＮＧｓについても同様にして基板上に固定した。

[0163] ２－１．基板への粒子の固定

ＳＰＲ金基板（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製 ＳＩＡ Ｋｉｔ Ａｕ）を、エタノール及び純水で洗浄後、１ｍＭの１１－Ｍｅｒｃａｐｔｏｕｎｄｅｃａｎｏｉｃ ａｃｉｄエタノール溶液に浸漬させ、２５℃で２４時間インキュベートした。反応後の基板をエタノール及び純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。

[0164] ＳＰＲによる分子間相互作用解析装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製

Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００）を用いて、０．１MのＮ－Ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）と０．４Mの１－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）－３－ｅｔｈｙｌｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＥＤＣ）の１：１の混合溶液を流速２０μＬ／分で７分インジェクトして分子膜を形成した後、試験例１の工程２で得た精製試料（４６６μｇ／ｍＬ）を流速２０μＬ／分で７分インジェクトし、基板への粒子の固定化を行った。この固定化においては、分子膜表面のＮＨＳエステルと粒子表面の官能基（この官能基としては、機能性モノマー由来のアミノ基、及び／又は粒子を構成するポリマーの末端に残存する開始剤由来のアミジノ基が考えられる。）とが反応することで、粒子が基板に固定化される。続いて、１Mの２－アミノエタノール（ｐＨ８．５）を流速２０μＬ／分で７分インジェクトすることで、分子膜表面の未反応ＮＨＳエステルをブロッキングした。

[0165] ２－２．タンパク質吸着試験

基板に固定された粒子に対して、ＰＢＳ（１０mM，ｐＨ７．４，含１４０mM　ＮａＣｌ）に溶解したヒト血清アルブミン（ＨＳＡ；Ｍｗ：６６．５ｋＤａ，ｐｌ：４．６）、シトクロムＣ（Ｃｙｔ　ｃ；Ｍｗ：１１．７ｋＤａ，ｐｌ：１０．３）又はトランスフェリン（Ｔｒｆ；８０ｋＤａ，ｐｌ：６．１）を以下の条件でインジェクトし、吸着実験を行った。

[0166] [表4]

フローレート	20 μL/min
インジェクション体積	100 μL
温度	25℃
データポイント	6 min after injection
ランニングバッファ	PBS
吸着試験用タンパク質 (濃度)	HSA, Cyt c, Trf (0, 1.5, 3, 6.02, 12.0, 24.1, 48.1, 96.2, 192 nM)

[0167] また、得られた吸着等温線から、カーブフィッティングにより結合定数を

算出した。ーティングは、ＤｅｌｔａＧｒａｐｈ　５．４．５ｖ（日本ポラデジタル社製）を用い、下記式（式中、Ｋは結合定数、Ｇはタンパク質濃度、ＤはＳＰＲシグナル強度の最大変化量、及びＨは独立変数を表す。）に基づいて行った。結果を下記表に示す。

[0168] [数2]

$$y = \frac{D}{2KG}\left\{(1 + \mathrm{K} \times \mathrm{G} + \mathrm{K} \times \mathrm{H}) - ((1 + \mathrm{K} \times \mathrm{G} + \mathrm{K} \times \mathrm{H})^2 - 4 \times K \times K \times H \times G)^{1/2}\right\}$$

[0169] [表5]

	結合定数M^{-1} (vs HSA)
実施例１ MIP-NGs	4.98×10^{7}
比較例１ NIP-NGs	6.00×10^{6}

[0170] [表6]

	タンパク質	結合定数M^{-1}
実施例１ MIP-NGs	HSA (センシング対象)	4.98×10^{7}
	Cyt c	6.28×10^{6}
	Trf	5.63×10^{6}

[0171] 表５に示すように、ＭＩＰ－ＮＧｓはＮＩＰ－ＮＧｓと比較して結合定数が顕著に大きくなっていることから、分子インプリント効果によりＨＳＡに対して高い親和性を示すことが確認された。また、表６に示すように、３種類のタンパク質の中ではＨＳＡの結合定数が顕著に大きくなっていることから、ＭＩＰ－ＮＧｓがＨＳＡに対して特異的な結合空間を有することが推認される。

[0172] ［試験例３：ＭＩＰ膜を設けた対比用のセンシング用基板の作製］

後述の試験例５での対比試験のため、試験例１で用いられたモノマーと同じモノマーを用いて、基板上に平膜状のＭＩＰ膜を形成し、対比用のＨＳＡセンシング用基板を作製した。

[0173] ３－１．重合性官能基固定化基板の作製

金コートガラス基板（５×１０ｍｍ）を、エタノール及び純水で洗浄後、ＵＶ－O_3処理を３０分間行った。処理後の基板を１ｍＭの１１－ｍｅｒｃａｐｔｏ－１－ｕｎｄｅｃａｎｏｌエタノール溶液に浸漬し、２５℃で２４時間インキュベーションを行った。その後、基板をエタノール及び純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。得られた基板を、１０ｍＭ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌｏｙｌ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ及び１０ｍＭ　ｔｒｉｅｔｈｙｌａｍｉｎｅを溶解させたCH_2Cl_2溶液に浸漬し、２５℃で２４時間インキュベーションを行った。その後、基板をエタノール及び純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。これによって、重合性官能基固定化基板を得た。

[0174] ３－２．ＭＩＰ膜の合成

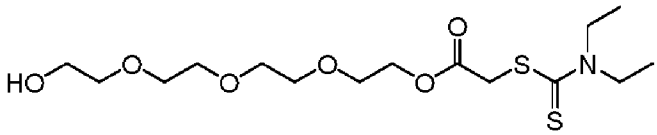
下記表に示す成分を混合してプレポリマー溶液を調製した、重合官能基固定化基板に半径３ｍｍ孔が穿設されたシリコンゴムシート（厚み：０．５ｍｍ）を被せ、その孔内における金基板表面の露出部分にプレポリマー溶液を滴下し、上からカバーガラスを被せた。これを光反応装置（ＫｅｙＣｈｅｍ－Ｌｕｍｉｎｏ，ＹＭＣ　Ｃｏ．，　Ｌｔｄ．）にセットし光重合反応を行い（λ_{em}＝３６５ｎｍ、４℃、１０分）、これによってＭＩＰ膜（比較例２）を得た。

[0175]

[表7]

		比較例２ MIP膜
鋳型タンパク質	ヒト血清アルブミン(HSA)	0.134 mg (0.02 μmol)
機能性モノマー	式(51a)に示す機能性モノマー	0.79mg (3.0 μmol)
N-置換又は無置換の(メタ)アクリルアミド	N-Isopropylacrylamide (NIPAm)	4.08 mg (36 μmol)
生体適合性モノマー	2-Metacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)	0.59 mg (2 μmol)
架橋剤	N,N'-Methylenbisacrylamide (MBAA)	0.33 mg (2.1 μmol)
開始剤	式(8)に示すPhoto-initiator	3.07 mg (8.0 μmol)
溶媒	10mM PBS buffer pH 7.4 (含140 mM NaCl)	1 mL

[0176] [化17]



(8)

[0177] ３－３．鋳型除去

ＭＩＰ膜（比較例２）が設けられた基板を純水で洗浄後、１ＭのＮａＣｌ水溶液、及び０．５ｗｔ％のＳＤＳ水溶液に浸漬（それぞれ２時間）させ、ＨＳＡの除去を行った。

[0178] ３－４．蛍光導入

洗浄後の基板のＭＩＰ膜部分に、５０μｇ／ｍＬのＡＴＴＯ６４７Ｎ　ＮＨＳ溶液（１０ｍＭ　ＰＢＳを含む０．５％ＤＭＳＯ中）１０μＬを滴下し、１時間室温で静置した。その後、基板を純水で洗浄した。

[0179] これによって、対比用のＨＳＡセンシング用ＭＩＰ膜基板を得た。この対比用のＨＳＡセンシング用ＭＩＰ膜基板は、基板上に設けられたＭＩＰ膜表

面に、ＨＳＡの分子インプリント空間（凹部）を有しており、少なくとも分子インプリント空間（凹部）内に、機能性モノマーに由来する機能性基と蛍光基とが配設されている。なお、当該蛍光基は、インプリント空間（凹部）がセンシング対象を吸着する時の環境変化により増蛍光する。

[0180] ［試験例４：センシング用ナノ粒子の合成－２］

本試験例では、図２のセンシング用ナノ粒子１０ａに相当するＨＳＡセンシング用ナノ粒子を合成した。

[0181] シグナル物質（蛍光物質）の導入（工程３）

試験例１の工程２で得たＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例１）の精製試料（４６６μｇ／ｍＬ）１ｍＬに、１０ｍｇ／ｍＬの蛍光物質（ＡＴＴＯ６４７Ｎ　ＮＨＳ、励起波長６４６ｎｍ、蛍光波長６６４ｎｍ）の１０ｍＭ　ＰＢＳを含む０．５ｗｔ％ＤＭＳＯ溶液を５μＬ加え、２５℃で２時間インキュベートした。その後、アミコンウルトラ－４　１０ｋＤａを用いて限外濾過（２５℃，７５００×ｇ，２０分，３回）を行うことでＭＩＰ－ＮＧｓをＰＢＳで洗浄することで、蛍光基が導入されたＭＩＰ－ＮＧｓを得た。

[0182] ［試験例５：センシング用基板の作製－２］

本試験例では、図７のセンシング用基板１ａに相当するＨＳＡセンシング用基板を作製した。

[0183] ５－１．基板への蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓの固定

金コートガラス基板（５ｍｍ×１０ｍｍ）を、エタノール及び純水で洗浄後、１ｍＭの１１－Ｍｅｒｃａｐｔｏｕｎｄｅｃａｎｏｉｃ　ａｃｉｄエタノール溶液に浸漬させ、２５℃で２４時間インキュベートした。反応後の基板をエタノール及び純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。

[0184] ０．２ＭのＥＤＣ及び５０ｍＭのＮＨＳを含む水溶液を１００μＬ滴下し、室温で１時間インキュベートした。純水で洗浄後、試験例４で得られた蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ（４７μｇ／ｍＬ）を１００μＬ滴下し、室温で２時間反応させて固定化した。純水で洗浄した後、１Ｍの２－アミノエタノール（ｐＨ８．５）を１００μＬ滴下して３０分反応させることによるブロッ

キングを行った。これによって、蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが基板に固定されたＨＳＡセンシング基板を得た。

[0185] ５－２．タンパク質吸着試験－１

得られた蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ固定ＨＳＡセンシング用基板について、試験例２と同様にして、タンパク質吸着試験を行った。結果を下記表に示す。

[0186] [表8]

	タンパク質	結合定数M^{-1}
実施例２蛍光導入MIP-NGs	HSA (センシング対象)	3.17×10^{8}
	Cyt c	3.00×10^{7}
	Trf	7.10×10^{6}

[0187] 表８に示すように、蛍光基を導入することで、ＨＳＡの結合定数がさらに向上した。これは、導入された蛍光基が、分子インプリント空間において、センシング対象であるＨＳＡと相互作用基との結合を阻害しないだけでなく、導入された蛍光基が疎水性であるために、相互作用基におけるベンゼン環とＨＳＡの疎水性領域との相互作用に、疎水性である蛍光基とＨＳＡの疎水性領域との相互作用も加わったことが推認される。

[0188] ５－３．タンパク質吸着試験－２

得られた蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ固定ＨＳＡセンシング用基板と、試験例３で得られたＭＩＰ膜を設けた対比用のＨＳＡセンシング用基板とについて、Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒに基づくタンパク質吸着試験を行った。対比したそれぞれのＨＳＡセンシング用基板の特徴は下記表に示す通りである。

[表9]

	基板に固定されたMIPの形状	構成モノマー	鋳型，センシング対象	蛍光基
実施例２	粒子状	式(51a)に示す機能性モノマー NIPAm MPC	HSA	ATTO647N
比較例２	平膜状			

[0189] センシング用基板に対して、ＰＢＳ（１０ｍＭ，ｐＨ７．４，含１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）に溶解したヒト血清アルブミン（ＨＳＡ；Ｍｗ：６６．５ｋＤａ，ｐｌ：４．６）、シトクロムＣ（Ｃｙｔ　ｃ；Ｍｗ：１１．７　ｋＤａ，ｐｌ：１０．３）又はトランスフェリン（Ｔｒｆ；８０ｋＤａ，ｐｌ：６．１）を、２５℃１０分間インキュベーションし、ＳＩＣ　自動分注装置付き蛍光顕微鏡を用いて以下の条件で測定を行った。

[0190] （ＳＩＣ自動分注装置付蛍光顕微鏡　測定条件）

・蛍光顕微鏡

フィルター：Ｃｙ５

対物レンズ：×５

露光時間：０．１秒

光量：１２％

光源：水銀ランプ

・ＳＩＣ自動分注装置シーケンス

１．チップ取り付け

２．サンプル吸引（１５０μＬ）

３．インキュベーション（２５℃、１０分）

４．測定位置ｋｅｅｐ（測定ポート）

※２→４の手順を、タンパク質毎に繰り返した。

[0191] センシング基板への各タンパク質添加前後における蛍光強度の変化率を、センシング対象であるＨＳＡの蛍光強度変化率で割ることで、Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒを算出した。具体的には、Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒは下記式で表される。式中、F_0は、上記緩衝液中での基板

表面の蛍光強度を表し、F_{sample}は、各タンパク質を含むサンプルでの基板表面の蛍光強度を表し、F_{HSA}は、センシング対象であるＨＳＡを含むサンプルでの基板表面の蛍光強度を表す。

[0192] [数3]

$$\text{Selectivity factor} = \frac{(F_{sample}-F_0)/F_0}{(F_{HSA}-F_0)/F_0}$$

[0193] 蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ（粒子）固定ＨＳＡセンシング用基板（実施例２）についての結果を図８に示し、試験例３で得られたＭＩＰ膜を設けた対比用のＨＳＡセンシング用ＭＩＰ膜基板（比較例２）についての結果を図９に示す。

[0194] Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ ｆａｃｔｏｒの値は、１より小さければＨＳＡに対する認識能があることを示す。図８及び図９に示すように、いずれのセンシング基板も、ＨＳＡに対する認識能が認められた。しかしながら、図９に示すように、ＭＩＰ膜を設けた対比用のＨＳＡセンシング用基板（比較例２）については、センシング対象であるＨＳＡだけでなく、センシング対象ではないＣｙｔ ｃ及びＴｒｆに対しても大きな蛍光変化を示すことが観察されており、特異性に乏しいことが分かった。これに対して、図８に示すように、粒子状のＭＩＰを基板に固定したＨＳＡセンシング用基板（実施例２）では、センシング対象であるＨＳＡに対する特異的が高いことが認められた。

[0195] ［試験例６：血清サンプル中のＨＳＡの測定］

本試験例では、試験例５で作製された図７のセンシング用基板１ａに相当するＨＳＡセンシング用基板（実施例２）を用い、血清サンプル中のＨＳＡの測定を行った。

[0196] 神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委会の受付番号１８０１２８にて承認されているヒト血清サンプル８検体を用いた。まず、これらのサンプルそれぞれのＨＳＡの濃度を、ブロモクレゾールパープル（ＢＣＰ法）にて測定することで確認した。確認したＨＳＡ濃度を下記表に示す。

[0197] [表10]

検体番号	1	2	3	4	5	6	7	8
HSA濃度(g/dL)	3.6	4.2	4	3	4.8	4.2	4.4	4.2

[0198] 次に、それぞれの検体を、緩衝液（ＰＢＳ（１０ｍＭ，ｐＨ７．４，含１４０ｍＭ　ＮａＣｌ））で１０００倍希釈し、試験例５で作製された図７のセンシング用基板１ａに相当するＨＳＡセンシング用基板を用いて、試験例５のタンパク質吸着試験－２と同様にして相対蛍光強度を求めた。

[0199] 得られた相対蛍光強度と、ＢＣＰ法によって得られた濃度との相関を図１０に示す。なお、相対蛍光強度は、$F-F_0/F_0$（F_0は、上記緩衝液中での基板表面の蛍光強度を表し、Ｆは、検体中での基板表面の蛍光強度を表す。）で表した。図１０に示されるとおり、ＢＣＰ法によるＨＳＡ濃度と、ＨＳＡセンシング用基板で測定されたＨＳＡ結合に基づく相対蛍光強度との間に、高い相関関係が見られた。このことから、ＨＳＡセンシング用基板はヒト血清中からでもＨＳＡを検出及び定量可能であることが示された。

[0200] ［試験例７：ＰＳＡセンシング用基板を用いたハラルチェック］

本試験例では、センシング対象をブタ血清アルブミン（ＰＳＡ）とする粒子を基板に固定化したＰＳＡセンシング用基板を作製し、ＰＳＡがハラルフード中のブタ由来成分混入のマーカーとして用いられることに基づき、この基板を用いてハラルチェックを行った。

[0201] ７－１．センシング用ナノ粒子の合成－３

まず、図１のセンシング用ナノ粒子１０に相当するＰＳＡセンシング用ナノ粒子を合成した。具体的には、鋳型タンパク質としてＰＳＡを用いたことを除いて、下記表に示した成分の混合物（プレポリマー溶液）を用い、試験例１と同様にしてＭＩＰ－ＮＧｓを合成した（実施例３）。

[0202]

[表11]

		実施例３ MIP-NGs	比較例１ NIP-NGs
鋳型タンパク質	ブタ血清アルブミン(PSA)	6.70 mg (0.101 μmol)	—
機能性モノマー	式(51a)に示す機能性モノマー	39.3 mg (0.15 mmol)	39.3 mg (0.15 mmol)
N-置換又は無置換の(メタ)アクリルアミド	N-Isopropylacrylamide (NIPAm)	204 mg (1.81 mmol)	6.70 mg (0.101 μmol)
生体適合性モノマー	2-Metacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)	29.5 mg (0.100 mmol)	29.5 mg (0.100 mmol)
架橋剤	N,N'-Methylenbisacrylamide (MBAA)	16.5 mg (0.108 mmol)	16.5 mg (0.108 mmol)
開始剤	2-2'-Azobis(2-methyl propion amide) dihydrochloride (V-50)	109 mg (0.400 mmol)	109 mg (0.400 mmol)
溶媒	10mM PBS buffer pH 7.4 (含140 mM NaCl)	50 mL	50 mL

[0203] ７－２．粒子径の測定

得られたＭＩＰ－ＮＧｓ及びＮＩＰ－ＮＧｓについて、試験例１と同様にして粒子径を測定したところ、ナノメートルオーダーの粒子の存在が確認された。

[0204] [表12]

	体積平均粒径
実施例３ MIP-NGs	24.55 nm
比較例１ NIP-NGs	20.7 nm

[0205] ７－３．センシング用ナノ粒子の合成－４

次に、図２のセンシング用ナノ粒子１０ａに相当するＰＳＡセンシング用ナノ粒子を合成した。具体的には、実施例３のＭＩＰ－ＮＧｓに対して、試験例４と同様にして蛍光物質ＡＴＴＯ６４７Ｎ　ＮＨＳを導入することで、蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例４）を得た。

[0206] ７－４．センシング用基板－３

次に、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓを、以下のようにして基板に固定した。

[0207] 金コートガラスＳＰＲ基板（５ｍｍ×１０ｍｍ）を、エタノール及び純水で洗浄後、ＵＶ－Ｏ３クリーナーで２０分処理し、１ｍＭの１１－ａｍｉｎｏ－１－ｕｎｄｅｃａｎｅｏｃｔａｎｅｔｈｉｏｌ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅエタノール溶液に浸漬させ、２５℃で２４時間インキュベートした。反応後の基板をエタノール及び純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。これによって、表面に分子膜が形成された基板を得た。さらに、基板上の分子膜に、ＥＤＣ（０．４Ｍ）とＮＨＳ（０．１Ｍ）とを溶解させた水溶液（１００μＬ）を滴下し、１時間静置した。そこに実施例３の蛍光基が導入されたＭＩＰ－ＮＧｓを１００μＬ（３００μｇ／ｍＬ）滴下し、２時間反応させることで、基板への粒子の固定化を行った。この固定化においては、分子膜表面のアミノ基と粒子表面の官能基（機能性モノマー由来のカルボキシル基）とが反応することで、粒子が基板に固定化される。１０ｍＭのｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ　ａｃｅｔａｔｅ水溶液１００μＬを滴下し、３０分反応させることで表面のアミノ基のブロッキングを行った。

[0208] ７－５．サンプル中のＰＳＡの測定

比較例１のＮＩＰ－ＮＧｓに対しても、上記と同様に蛍光物質の導入を行い、蛍光導入ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例３）を得た。比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓについて同様に基板への固定化を行い、比較用のセンシング用基板を作製した。実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたＰＳＡセンシング用基板と、比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板とを用い、緩衝液（ＰＢＳ（１０ｍＭ，ｐＨ７．４，含１４０ｍＭ　ＮａＣｌ））中のＰＳＡ濃度が０～２０ｎＭであるサンプルに含まれるＰＳＡ濃度について、試験例６と同様にして測定を行った。検出限界は１２ｎｇ／ｍＬであった。

[0209] 実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたＰＳＡセンシング用基

板について、得られた相対蛍光強度と、ＰＳＡ濃度との相関を図１１に示す。なお、相対蛍光強度については試験例６と同様である。図１１に示されるとおり、ＰＳＡ濃度と当該ＰＳＡセンシング用基板で測定されたＰＳＡ結合に基づく相対蛍光強度との間に、高い相関関係が見られた。このことから、インプリント凹部の鋳型を変更すれば、ヒト血清アルブミンＨＳＡだけでなく、ブタ血清アルブミンＰＳＡを検出及び定量可能であることが示された。一方で、比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板について同様に蛍光測定を行ったが、ほとんど蛍光変化を観察することはできなかった。さらに、得られた蛍光変化率から見掛けの結合定数を算出した結果を下記表に示す。

[0210] [表13]

	結合定数M^{-1} (vs PSA)
実施例４ MIP-NGs	1.87×10^{8}
比較例３ NIP-NGs	9.00×10^{7}

[0211] 表１３に示すように、ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例４）はＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例３）と比較して結合定数が顕著に大きくなっていることから、分子インプリント効果によりＰＳＡに対して高い親和性を示すことが確認された。

[0212] ７－６．ＰＳＡに対する特異性

ブタ血清アルブミン（ＰＳＡ）、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、リゾチーム（ＬｙＺ）、又はトランスフェリン（Ｔｒｆ）を４０ｎＭの濃度で緩衝液（ＰＢＳ（１０ｍＭ，ｐＨ７．４，含１４０ｍＭ　ＮａＣｌ））中に溶解させたサンプルを調製した。これらサンプルについて、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板又は比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板を用いて、試験例６と同様にして測定を行った。なお、Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒは、４０ｎＭのＰＳＡでの蛍光変化に対するサンプルでの蛍光変化の比率であり、下記式で表される。式中、F_0は、上記緩衝液

中での基板表面の蛍光強度を表し、F_{sample}は、サンプルでの基板表面の蛍光強度を表し、F_{PSA}は、４０ｎＭのＰＳＡでの基板表面の蛍光強度を表す。

[0213] [数4]

$$\text{Selectivity factor} = \frac{(F_{sample}-F_0)/F_0}{(F_{PSA}-F_0)/F_0}$$

[0214] 実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板についての結果を図１２に示し、比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板についての結果を図１３に示す。

[0215] Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ ｆａｃｔｏｒの値は、１より小さければＰＳＡに対する認識能があることを示す。図１２及び図１３に示すように、いずれのセンシング基板も、ＰＳＡに対する認識能が認められた。しかしながら、図１３に示すように、比較例３の蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板では、センシング対象であるＰＳＡだけでなく、センシング対象ではないタンパク質に対しても大きな蛍光変化を示すことが観察されており、特異性に乏しいことが分かった。これに対して、図１２に示すように、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板では、センシング対象であるＰＳＡに対する特異的が高いことが認められた。

[0216] ７－７．ハラルチェック－１

牛肉の細切物１ｇを４ｍＬのリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）に添加し、ホモジナイザーを用いて１０，０００ｒｐｍで１分間、牛肉をホモジナイズした。遠心分離（１６，０００×ｇ、３０分、４℃）にて得られた上清を、０．２μｍフィルターで３回濾過し、リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）で５００倍希釈して、牛肉抽出サンプルを得た。

[0217] 得られた牛肉抽出サンプルに、様々な濃度でＰＳＡを添加し、ＰＳＡ混入牛肉抽出サンプルを調製した。別途、リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）に、同様の濃度でＰＳＡを添加し、ＰＳＡサンプルを調製した。ＰＳＡ混入牛肉抽出サンプル及びＰＳＡサンプルについて、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板を用いて蛍光変化を測定し、上述と同様に

相対蛍光強度変化を導出した。結果を図１４に示す。

[0218] 図１４に示されるとおり、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板は、牛肉抽出サンプル中（ｉｎ ５００× ｂｅｅｆ ｅｘｔｒａｃｔ）に混入したＰＳＡについても、リン酸緩衝液中（ｉｎ ＰＢＳ ｂｕｆｆｅｒ）のＰＳＡと同様に定量できることが認められた。

[0219] ７－８．ハラルチェック－２

豚抽出サンプルが混入した牛肉抽出サンプルを作製した。まず、上述と同様にして、５００倍希釈の牛肉抽出サンプルを得た。また、牛肉の代わりに豚肉を用いたことを除いて同様にして、５００倍希釈の豚肉抽出サンプルを得た。牛肉抽出サンプルの含有率及び豚肉抽出サンプルの混入率が下記表に示す比率となるように、両抽出サンプルを混合し、豚抽出サンプルが混入した牛肉抽出サンプルを得た。なお、表中に示す比率は、抽出サンプル中のタンパク質量（重量ベース）相当の量を示す。

[0220] [表14]

	豚肉抽出サンプル混入率(wt%)	牛肉抽出サンプル含有率(wt%)
entry 1 (negative control)	0	100
entry 2	0.1	99.9
entry 3	1	99

[0221] これらの豚抽出サンプルが混入した牛肉抽出サンプルについて、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板を用いて蛍光変化を測定し、上述と同様に相対蛍光強度を導出した。結果を図１５に示す。図１５では、横軸に豚肉抽出サンプル混入率を示し、縦軸に相対蛍光強度を示す。

[0222] 図１５から明らかなとおり、豚肉抽出サンプルが混入していない牛肉抽出サンプル１００％のネガティブコントロールでは、ＰＢＳ緩衝液と同様に、蛍光変化はほぼ観察されなかった。これに対し、豚抽出サンプルが混入した牛肉抽出サンプルでは、豚抽出サンプルに含まれていたＰＳＡを検出できた。特に、豚抽出サンプル混入率が０．１ｗｔ％であってもＰＳＡを検出でき

たことから、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓが固定されたセンシング用基板が、高感度のハラルチェックに好適であることが認められた。

[0223] ［試験例８：ＰＳＡ用センシング用粒子（非固定）を用いた免疫応答］

本試験例では、センシング対象をブタ血清アルブミン（ＰＳＡ）とする粒子を、基板に固定化しない遊離状態で用い、ＰＳＡ及びトランスフェリンそれぞれに対する免疫応答を試験した。

[0224] センシング対象をＰＳＡとする粒子（蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ；実施例４）は、試験例７の「センシング用ナノ粒子の合成－３」及び「センシング用ナノ粒子の合成－４」と同じ方法で作製した。

[0225] ８０μｇ／ｍＬの蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓに、タンパク質（ＰＳＡ又はトランスフェリン）の最終濃度が５，１０，５０，１００，５００，１０００μｇ／ｍＬになるように、タンパク質溶液（１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）中）を添加し（最終溶液量５００μＬ）、２５℃で１５分間インキュベーションした。その後、蛍光分光光度計（Ｆ－２５００，日立ハイテクノロジーズ）で溶液の蛍光スペクトルを測定した（励起波長λｅｘ：６４７ｎｍ，λｅｍ：６５８－６９０ｎｍ）。その結果を図１６に示す。また、ＰＳＡ及びトランスフェリンそれぞれのタンパク質濃度（ＰＳＡ：５，１０，５０，１００，５００，１０００μｇ／ｍＬ、トランスフェリン：１０，５０，１００，５００，１０００μｇ／ｍＬ）に対する蛍光波長６６７ｎｍの相対蛍光強度をプロットした。その結果を図１７に示す。

[0226] 図１６に示すとおり、遊離状態の実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓにＰＳＡ溶液を添加した場合は、濃度増加に伴って蛍光強度の増加が観察された。実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓを基板に固定化した場合においても同様の現象が確認されている（試験例７）ことから、図１６に示される蛍光強度の増加は、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓへのＰＳＡ結合に伴う蛍光強度変化であることが示唆された。また、図１７に示すように、参照タンパク質であるトランスフェリンを添加した場合の蛍光変化と比較して、

ＰＳＡを添加した場合の方が大きな蛍光強度変化を示した。このことから、実施例４の蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓは、基板に固定されていない遊離状態であっても、ＰＳＡを選択的に吸着し、その結合情報を蛍光シグナルとして発信できることが示された。

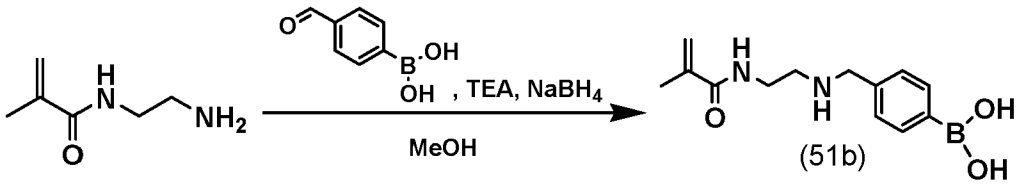
[0227] ［実施例９：センシング用ナノ粒子の合成－５］

本試験例では、図２のセンシング用ナノ粒子１０ａに相当する、Ｆｃドメインセンシング用（且つＦｃドメイン捕捉を介したＩｇＧセンシング用）ナノ粒子を合成した。

[0228] ９－１．機能性モノマーの合成

式５１ｂに示す機能性モノマーを設計し、以下のスキームに従って合成した。なお、式５１ｂに示す機能性モノマーは、ボロニルアリール基と二価アミノ基とを有しており、ＭＩＰ－ＮＧｓにおいて、ボロニルアリール基はＩｇＧのＦｃドメインの糖鎖との相互作用し、２級アミノ基はポストインプリンティング修飾において蛍光分子の導入に用いられる。

[0229] [化18]



[0230] エチレンジアミンモノメタクリルアミド塩酸塩（ｃａ．１．５７ｍｍｏｌ）と４－ホルミルフェニルボロン酸（２１５ｍｇ，１．５ｍｍｏｌ）及びトリエチルアミン（２１０μＬ，１．５ｍｍｏｌ）をメタノール（１０ｍＬ）に溶解させ、室温で撹拌した（０．５ｈ）。反応追跡はＴＬＣ（ＭｅＯＨ→ＵＶ@２５４ｎｍ及びニンヒドリン）にて行い、ＵＶ吸収及びニンヒドリンで染色されるスポット（Ｒｆ：０．５５，紫）の出現を確認したことから、シッフ塩基が形成されていると判断し、そこに$NaBH_4$（１２０ｍｇ，９．０ｍｍｏｌ）を加えた。添加後更に室温で一晩（８ｈ）撹拌した。ＴＬＣ（ＭｅＯＨ→ＵＶ@２５４ｎｍ及びニンヒドリン）で目的物スポット（Ｒｆ：０．２５，黄）を確認したことから反応を終了し、溶媒をロータリーエバポ

レーターにて減圧留去した。残渣をオートカラム（シリカ：ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ｐｒｅｍｉｕｍ，ＭｅＯＨ／ＤＣＭ＝７０／３０→１００／０，ＧＲ）を用いて精製し、目的物を得た。

収量: 175 mg (0.668 mmol, 42.5 %)

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ=7.62 (d, 2H, phenyl), 7.30 (d, 2H, phenyl), 5.69 (s, 1H, vinyl), 5.44 (s, 1H, vinyl), 3.97 (s, 2H, N-CH_2-), 3.47 (t, 2H, -CH_2-), 2.99 (br, 2H, -CH_2-), 1.89 (s, 3H, -Me)

[0231] ９－２．Ｆｃドメインの調製

１０ｍｇのＩｇＧを１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）（５ｍＬ）に溶解させ、抗体溶液を調製した。１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）に０．０２Ｍ　Ｌ－システイン，０．００２Ｍ　ＥＤＴＡ，０．１ｍｇ／ｍＬパパインを溶解させ、酵素溶液を調製した。抗体溶液と酵素溶液とを同量混合し、３７℃で２４時間反応させた。その後、反応液を１０ｋＤａの限外ろ過膜（７５００ｇ，２０分×３）を用いて溶媒を２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に置換した。続いて１００ｋＤａの限外ろ過膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ）（７５００ｇ，２０分×３）を用いて未反応のＩｇＧを分離した。得られた溶液（１ｍＬ）についてＰｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（Ｈｉｔｒａｐ™ Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＨＰ，Ｃｙｔｉｖａ）を用いて精製を行った。結合バッファーとして２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を用い、溶出バッファーとして０．１Ｍ　クエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）を用い、シリンジ（流速：約１ｍＬ／分）にて精製行った。精製後の溶液について、１０ｋＤａの限外ろ過膜（７５００ｇ，２０分×３）を用いて溶媒を１０ｍＭ炭酸緩衝液（ｐＨ９．２）に置換した。Ｆｃドメインの精製はＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した。

[0232] ９－３．センシング用ナノ粒子の合成－５

下記表に示した成分の混合物（プレポリマー溶液）を、５０℃で１２時間、無乳化剤沈殿重合に供し、ポリマーナノゲルを合成した（工程１）。なお、プレポリマー溶液に含ませるモノマーには、粒子の精製作業を容易化する

ために、標識モノマーも用いた。重合後の溶液（２ｍＬ）を、限外ろ過膜（１０ｋＤａ，７５００×ｇ，２０分×３）にて１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）に置換した。得られた溶液（２ｍＬ）をサイズ排除クロマトグラフィー（Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－１００）を通し、未反応のモノマーを除去した。これによって得られた溶液（１ｍＬ）と４０ｍｇ／ｍＬ　ＳＤＳ水溶液（１ｍＬ）とを混合し、５分間インキュベーションし、その後、陰イオン交換樹脂（ＤＥＡＥ－Ｓｅｐｈａｄｅｘ，１０ｃｍ，１．５ｃｍ　ｉ．ｄ．）に添加し、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）を溶出液として溶出を行った（工程２）。その後、ＳＤＳを除去するために脱塩カラム（ＰＤ－１０）（溶出液：１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）を通すことで精製を行った。

[0233] [表15]

		実施例５ MIP-NGs	比較例４ NIP-NGs
鋳型タンパク質	Fcドメイン（IgG断片）	2.50 mg (0.050 μmol)	—
N-置換又は無置換の(メタ)アクリルアミド	N-Isopropylacrylamide (NIPAm)	102 mg (0.90 mmol)	
生体適合性モノマー	2-Metacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)	3.69 mg (0.0125 mmol)	
架橋剤	N,N'-Methylenbisacrylamide (MBAA)	7.71 mg (0.050 mmol)	
標識モノマー	Methacryloxyethyl Thiocarbamoyl Rhodamine B (MTRB)	0.42 mg (0.625 μmol)	
機能性モノマー	式(51b)に示す機能性モノマー	15.73 mg (0.060 mmol)	
開始剤	2-2'-Azobis(2-methyl propion amide) dihydrochloride (V-50)	54.2 mg (0.20 mmol)	
溶媒	10 mM Carbonate buffer 2% DMSO (pH 9.2)	25 mL	

[0234]　得られたＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）及びＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）に

ついて、試験例１と同様にして粒子径を測定したところ、ナノメートルオーダーの粒子の存在が確認された。具体的には、Ｚ平均粒子径で、ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）で２１ｎｍ、ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）で１８ｎｍであった。Ｚ電位は、ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）で１９ｍＶ、ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）で２．９ｍＶで正に帯電していることが示された。これの電荷は、機能性モノマーの２級アミノ基（及び重合開始剤）に由来するものと考えられる。これらのことから機能性モノマー部位が組み込まれた粒子が合成されたことが示唆された。また、精製前後での粒子溶液の蛍光測定（λ_{ex}＝２８０ｎｍ）の結果から、精製前に認められていた３４０ｎｍ付近のＦｃ領域に含まれるトリプトファン由来の蛍光が消失していたため、ほとんどのＦｃドメイン断片の洗浄除去が行えたことも確認した。

[0235] さらに、精製後のＭＩＰ－ＮＧｓ（０．５ｍｇ／ｍＬ，１ｍＬ）に５μＬのＡＴＴＯ６４７Ｎ　ＮＨＳ（１０ｍｇ／ｍＬ）ＤＭＳＯ溶液を加え２５℃で２時間インキュベーションした（工程３）。反応後の溶液を限外ろ過（１０ｋＤａ，７５００×ｇ，２０分×３）することで、未反応の蛍光分子を取り除き、蛍光基導入ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）を得た。なお、蛍光分子（ＡＴＴＯ６４７Ｎ）導入操作前後での蛍光測定（励起波長：６４７ｎｍ）から、導入前には見られなかった６７０ｎｍ付近の蛍光ピークが観察されたことをもって、蛍光導入を確認した。ＮＩＰ－ＮＧｓについても同様の操作を行い、蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）を得た。

[0236] ９－４．センシング用基板－４

金スパッタガラス基板（４．３×９．８ｍｍ）を、純水及びＥｔＯＨで洗浄し、ＵＶ－Ｏ３洗浄（２０分）を行った。洗浄後の基板を１ｍＭ　１１－メルカプトウンデカン酸のＥｔＯＨ溶液に浸漬させることで自己組織化単分子膜形成を利用して表面にカルボキシ基を導入した（２５℃，２４時間）。基板をＥｔＯＨで洗浄した後、基板を０．２Ｍ　ＥＤＣ及び０．０５Ｍ　ＮＨＳを溶解させた水溶液中に浸漬させることで、表面カルボキシ基の活性化を行った（２５℃，１時間）。反応後の基板上に５０μＬの蛍光基導入ＭＩ

Ｐ－ＮＧｓ（実施例５）又は蛍光基導入ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）の溶液（ＰＢＳ中、０．５ｍｇ／ｍＬ）を添加し、アミンカップリングによりナノ粒子の固定化を行った（２５℃，１時間）。その後、未反応能活性エステルに対して１Ｍアミノエタノール水溶液（５０μＬ）を滴下することで不活性化を行った（２５℃，０．５時間）。最後にＰｒｏｔｅｉｎ　ｆｒｅｅ　ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒ（５０μＬ）を滴下し表面のブロッキングを行った（２５℃，０．５時間）。なお、固定化前後での表面での蛍光強度を測定し、固定化後の基板で蛍光強度の増加が観察されたことから、粒子の固定を確認した。

[0237] ９－５．蛍光測定

作製したセンシング用基板のタンパク質の蛍光検出能について、自動液体ハンドリングロボット付き蛍光顕微鏡を用いて検討を行った。測定シーケンス条件は次の通りである。

蛍光顕微鏡

フィルタ：　Ｃｙ５　対物レンズ：×５　露光時間：０．１秒

光量：　１２％　　光源：水銀ランプ

ＲＯＩ：基板中心部３×５の１５か所

自動分注装置のシークエンス

１．チップ取り付け

２．サンプル吸引　１５０μＬ

３．反応５分（２５℃）

４．測定位置　ｋｅｅｐ　　２→４の繰り返し

[0238] 作製したセンシング用基板に対して、鋳型タンパク質であるＦｃドメイン断片（０－１６００ｎＭ）を添加した時の相対蛍光強度変化を図１８に示した。ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）を固定化した基板と対比して、ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）を固定化した基板で大きな蛍光変化を示したことから、ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）でＦｃドメイン断片の結合空間が分子インプリンティングにより形成されており、かつその空間内に、機能性モノマーが組み

込まれ、ポストインプリンティング修飾によって蛍光標識されることで、Ｆｃドメイン断片の結合を蛍光シグナル変換できたことが示唆された。また、得られた蛍光の変化率から見かけの結合定数（K_d）は９．８×１０$^{-9}$Ｍと算出された。

[0239] Ｆｃドメイン断片と、参照タンパク質としての完全ＩｇＧ及びＬｙｓｏｚｙｍｅ（Ｌｙｚ）とを用い、作製したセンシング用基板のタンパク質選択性を試験した。Ｆｃドメイン断片（１００ｎＭ）添加時の相対蛍光強度変化を１として、各参照タンパク質（１００　ｎＭ）添加時の蛍光応答を図１９に示す。ＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）ではＦｃドメイン断片添加時に最も大きな蛍光変化を示した。またＦｃドメイン断片をその部分構造として有する完全ＩｇＧも７割程度レスポンスしていることから、ＩｇＧのＦｃ部位を認識可能であることを示唆している。つまり、Ｆｃドメイン断片を鋳型に用いて作製したＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）が、Ｆｃドメインの捕捉を介してＩｇＧを検出することも可能であることが示された。一方、ＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）では完全ＩｇＧ及びＬｙｚがいずれもＦｃドメイン断片より大きな蛍光応答を示した。これはＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）表面にランダムに存在している機能性モノマー残基およびそこに導入された蛍光分子と非特異的に結合したものと推察される。Ｗｈｏｌｅ　ＩｇＧのｐＩは～８．５　、Ｌｙｚは１１．２とされ、中性溶液中では正に帯電している。このことから、機能性モノマーのボロニルアリール基との静電相互作用、アミド結合部位との水素結合などが結合に寄与していると考えられる。

[0240] ［試験例１０］

本試験例では、ＨＥＲ２（生体物質）をセンシング対象とする分子インプリント凹部を有し、分子インプリント凹部に、ＨＥＲ２と相互作用する抗ＨＥＲ２アフィボディ（生体物質との相互作用基）と、シグナル物質ＡＴＴＯ６４７Ｎとを有する機能性基を有する粒子を、ＨＥＲ２の捕捉を介するエクソソーム（ＨＥＲ２過剰発現型乳がん細胞株であるＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソーム）センシング用ナノ粒子として作製した。

[0241] １０－１．鋳型の修飾（工程１１）

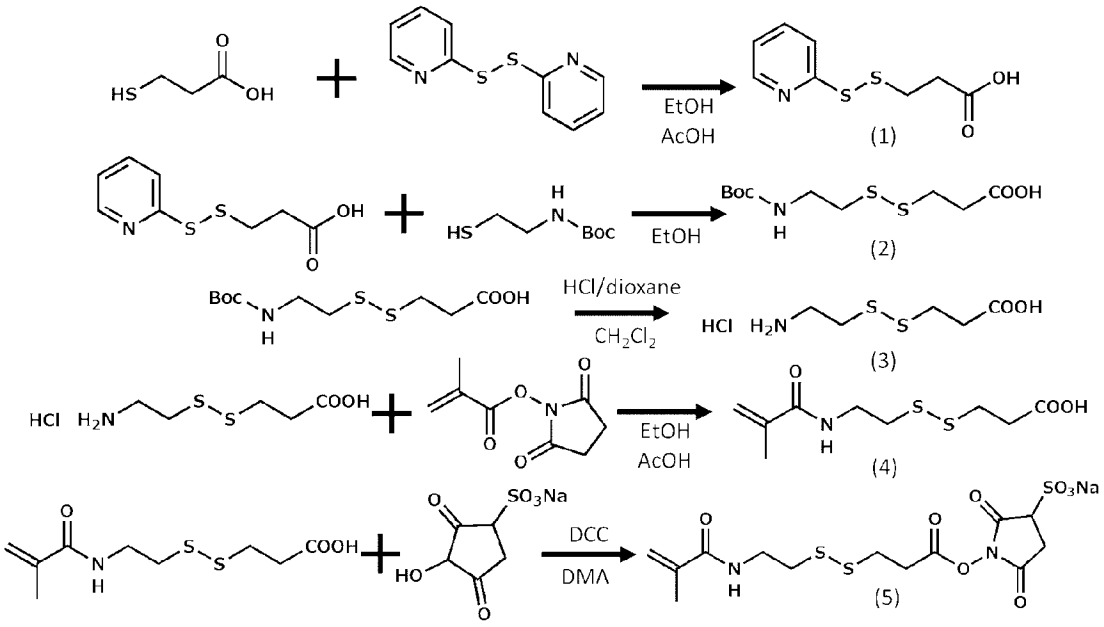
以下のようにして、ジスルフィド結合（可逆的連結基）を介してメタクリロイル基（重合性官能基）で修飾された鋳型ＨＳＡの作製を行った。

[0242] １０－１－１．試薬

・Albumin, from Human Serum （ＨＳＡ；ヒト血清アルブミン）（和光純薬工業）

・以下の方法で合成した化合物（５）

[0243] [化19]



[0244] 3-mercaptopropionic acid (0.900g ,8.50 mmol) をethanol 20 mLに溶解させ、1.6 mL のacetic acidを加えた。そこに30mlのethanolに溶解させた2,2-dipyridyl disulfide (3.75g ,17 mmol) を室温で攪拌しながら滴下した。25 ℃で3時間反応させることで、化合物（１）を得た。

[0245] 精製した化合物（１）(1.43 g,3.97 mmol)をエタノール15 mLに溶解させ、その後2-(Boc-amino) ethanethiol (1.69 mL,9.99mmol, 2eq) をエタノール20 mLに溶解させたものを加えた。3時間室温で反応させたることで、化合物（２）を得た。

[0246] $CH_2Cl_2$10 mLに溶解した4N HCl dioxane (6.60mL, 25.5 mmol, 5 eq)を、$CH_2Cl_2$5mLに溶解した精製化合物（２）(1.43g, 5.10mmol)に対して、氷冷下で攪拌

しながら滴下した。その後、室温にて一晩反応させることで、化合物（３）を得た。

[0247] 精製した化合物（３）(531.6mg, 2.45mmol)を$CH_2Cl_2$5 mLに分散させDIEA (1.28mL, 7.35mmol, 3 eq)を加えた。これにN-succinimidyl methacrylate (670 mg, 3.68mmol, 1.5eq)を溶解した$CH_2Cl_2$3.5mLを窒素雰囲気下で滴下し、室温で一晩反応させることで、化合物（４）を得た。

[0248] 精製した化合物（４）(290mg,1.16mmol, 1.1eq) とsulfo-NHS (230mg, 1.1 mmol)とDCC (304.5mg, 1.54mmol, 1.4 eq)をDMA 5 mLに溶解し室温で24時間反応させた。反応後、溶液を4℃で冷却し沈殿物をろ過して除去した。その後、ろ液を減圧留去することでDMAを除いた。得られた白色個体をAcOEtに溶解させ、これにHexaneを加えることで再度沈殿させ、化合物（５）を得た。（^{1}H-NMR chart 7 (500MHz,CD_3OD):δ=8.1 (t,1H, -CO-NH-C-) , 5.7-5.3 (s,2H, CH3-C=CH_2) , 4.0-3.8 (d,1H ,-CO-CH-SO_3Na) , 3.4-3.3 (m, 2H,$NaSO_3$-CH-CH_2-) , 3.3-2.7 (m,8H, -NH-CH_2-CH_2-S-S-CH_2-CH_2-), 1.85 (s, 3H, CH_3-C=CH_2))

[0249] １０－１－２．実験手順

ＨＳＡ (100mg, 2.23 μmol) を溶解した10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) 2 mL と、化合物（５） (20 mg, 44.6 μmol, 20eq) を溶解した10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)1 mL とを混合し、4 ℃で一晩反応させた。その後、アミコンウルトラ-4 10 kDa (4 ℃, 7500 G, 20 min) で 3 回洗浄を行い、ジスルフィド結合（可逆的連結基）を介してメタクリロイル基（重合性官能基）で修飾された鋳型ＨＳＡを得た。

[0250] １０－２．分子インプリントポリマーの合成（工程１２）

以下のようにして分子インプリントポリマーの粒子を合成した。

[0251] 具体的には、下記表の重合レシピに従い、シュレンクフラスコ５０ｍＬ中で窒素雰囲気下、７０℃で１６時間無乳化剤沈殿重合を行うことで、分子インプリントポリマーの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを合成した。

[表16]

試薬	使用量
メタクリロイル基修飾 HSA	18.3 mg (0.30 μmol)
N-Isopropylacrylamide (NIPAm)	610 mg (5.40 mmol)
2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC)	88.5 mg (0.30 mmol)
N,N'-Methylenebisacrylamide (MBAA)	46.2 mg (0.30 mmol)
2-2'-Azobis(2-methyl propionamide) dihydrochloride (V-50)	316 mg (1.20 mmol)
PBS (10 mM phosphate,140 mM NaCl, pH7.4)	50 mL

[0252] １０－３．鋳型の除去（工程１３）

分子インプリントポリマーから鋳型を除去した。

[0253] 分子インプリントポリマーの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓと鋳型ＨＳＡとの複合体を含むPBS液について、アミコンウルトラ-4（10 kDa）の透析チューブを用いた限外濾過(25℃, 7500 g, 20 分, 3 回)により溶媒の純水置換を行った。この複合体に 20 mM となるように Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride（TCEP）を加えて 25℃で一晩反応させた。これにより、鋳型ＨＳＡとＭＩＰ－ＮＧｓとの間のジスルフィド結合（可逆的連結基）を還元して切断し、チオール基を露出させた。

[0254] さらに、サイズ排除クロマトグラフィー用クロマト充填剤Sephadex G-100を用いたふるい分け、アミコンウルトラ-4 10 kDa の透析チューブを使用した限外濾過（25 ℃, 7500 g, 20 min, 3 回)によりTCEP の除去及び140 mM NaCl 10 mM トリス塩酸バッファーpH 7.4 への溶媒置換を行った。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーにより鋳型ＨＳＡを除去した。これによって、分子インプリントポリマーの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを得た。

[0255] １０－４．基板への粒子の固定

得られた分子インプリントポリマーの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを、以下のようにして基板に固定した。

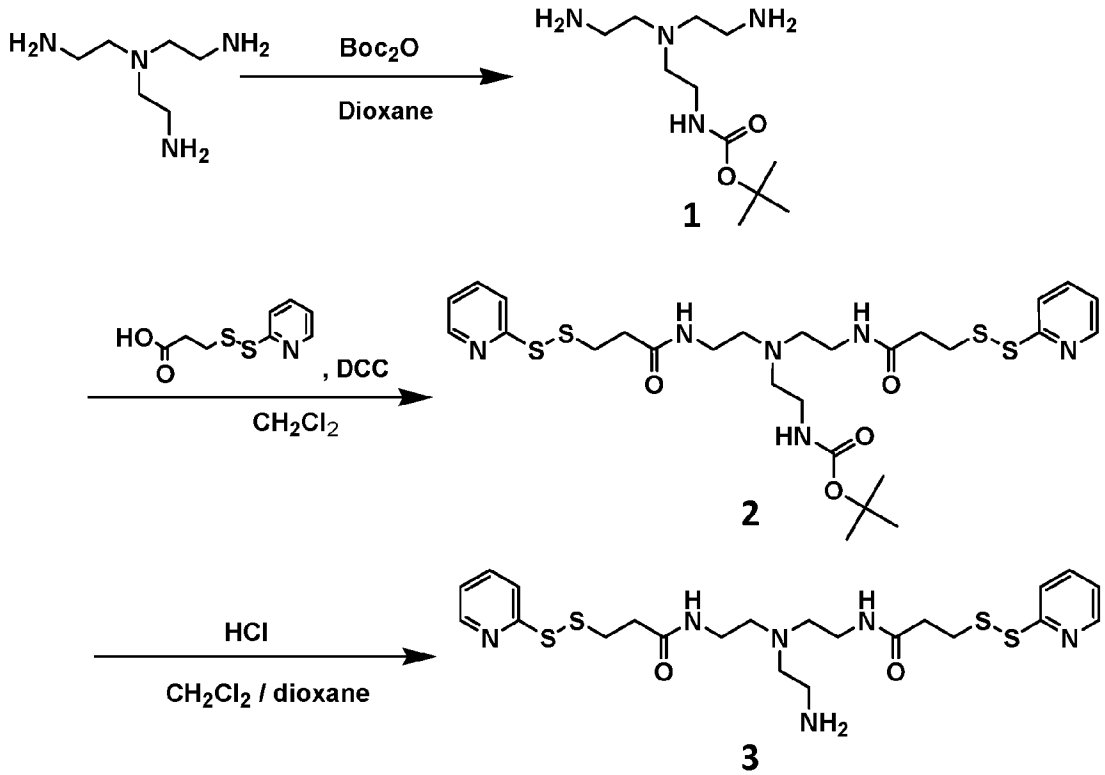
[0256] ＳＰＲ金基板を純粋及びエタノールで洗浄後、11-Mercaptoundecanoic acidを１ｍＭになるように調製したエタノール溶液に浸漬させ、２５℃で一晩インキュベートした。反応後の基板をエタノール、純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた後、Biacore3000 を用いて、0.1 M N-Hydroxysuccinimide(NHS),

0.4 M 1-(3-dimethylaminopropyl)-3- ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)のＰＢＳ溶液をインジェクションし、２５℃で１０分インキュベートした。得られた基板（基板表面が結合性基としてのカルボン酸活性エステル基で改質されたもの）を４００μｇ／ｍＬのＭＩＰ－ＮＧｓ溶液をインジェクションし、２５℃で１０分インキュベートさせることで、ＭＩＰ－ＮＧｓが固定化された基板を得た。

[0257] １０－５．機能性分子の合成

下記スキームに従って、後述の項目１０－６で用いる、生体物質との相互作用基を結合させるための基及びシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性分子（下記化合物（３））を合成した。

[0258] [化20]



[0259] Tris(2-aminoethyl)amine 1800 μL (12 mmol)をDioxane (4 mL)に溶解させ、氷冷下で撹拌した。そこにBoc_2O 440 mg (2. 0 mmol)を溶解させたdioxane (10 mL)をゆっくり滴下し、さらに一晩撹拌した(0℃→室温)。反応後の溶媒を減圧留去し、残渣をMilli-Q水に溶解させ、CH_2Cl_2 (15 mL)で抽出した(×

4)。有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、溶媒をロータリーエバポレーターで減圧留去、真空乾燥させ透明オイル状の目的物(１)を得た。（収量：364 mg, 74 %）

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 5.29 (br, 1H, carbamide), 3.18 (t, 2H, -CH_2-NH-Boc), 2.75 (t, 4H, H_2N-CH_2-), 2.53 (m, 6H, -CH_2-), 1.45 (s, 9H, Boc)

[0260] (3-Pyridyldithio)propionic acid 323 mg (1.5 mmol)、DCC 330 mg (1.6 mmol)をCH_2Cl_2 (10 mL)に溶解させ、氷冷下で撹拌した。そこに化合物（１)130 mg (0.53 mmol)を加えさらに1時間撹拌した。反応後、析出物をろ過にて取り除き、溶媒をロータリーエバポレーターで減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(EA/Hx=45/55→100/0, EA/MeOH=99/1→80/20)にて精製し化合物（２）を得た。（収量: 230 mg , 68 %）

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ= 8.44 (d, 2H, pyridyl), 7.70-7.60 (m, 4H, pyridyl), 7.18 (br, 2H, amide), 7.12-7.07 (m, 2H, pyridyl), 5.01 (br, 1H, carbamide), 3.34-3.29 (m, 4H, H_2N-CH_2-), 3.14-3.07 (m, 6H, -CH_2-NH-Boc, -CH_2-), 2.68 (t, 4H, -CH_2-), 2.61-2.51 (m, 6H, -CH_2-), 1.43 (s, 9H, Boc)

[0261] 化合物（２）230 mg (0.36 mmol)をCH_2Cl_2 (5 mL)に溶解させ、そこに4 N HCl in dioxane 0.5 mLを添加し、氷冷下で撹拌した。一晩撹拌(0 ℃→室温)した後、過剰量のジエチルエーテルを添加し、沈殿物をデカンテーションにて分離した。得られた固体をジエチルエーテルで洗浄、真空乾燥し目的物(化合物（３）)を得た。(収量: 255 mg, quant.)

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) δ= 8.51 (d, 2H, pyridyl), 8.14(t, 2H, pyridyl), 8.01 (d, 2H, pyridyl), 7.56 (m, 2H, pyridyl), 3.67-3.3.56 (m, 6H, HN-CH_2-), 3.43 (t, 6H, -CH_2-N), 3.09 (t, 4H, -CH_2-), 2.74 (t, 4H, -CH_2-)

[0262] １０－６．機能性基の導入（工程１４）

機能性分子を、以下のようにして、ジスルフィド結合（可逆的連結基）を介して分子インプリント凹部の結合性基に導入した。

[0263] 上記１０－４で得られた分子インプリントポリマーの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓ

が固定された基板を、上記１０－５で得られた機能性分子（化合物（３））の９００μｇ／ｍＬＰＢＳ溶液に浸漬し、室温℃で２時間反応させることで、機能性分子のピリジルジスルフィド基と分子インプリントポリマーのチオール基とを、ジスルフィド結合（可逆的連結基）に変換した。

[0264] １０－７．アフィボディ及び蛍光物質の導入

上記１０－６で得られた基板に、以下のようにして抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子（生体物質との相互作用基を与える分子）と蛍光物質（シグナル物質）とを導入した。

[0265] Anti-Her2 Affibody(R) Molecule （抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子、アブカム株式会社）の１ｍｇ／ｍＬ溶液（10 mM PB, 137 mM NaCl, 0.05vol% Tween20（pH 7.4）；ＰＢＳＴ）１０μＬを、２０ｍＭのＤＴＴ溶液（50 mM PB, 137 mM NaCl（pH7.5））４０μＬに加え、２５℃、２時間で反応後、Amicon Ultra-0.5（MWCO: 10 kDa)を用いて限外濾過（４℃，１４０００×ｇ，１５分）を３回行い、ＰＢＳＴにて精製した。これにより、抗Ｈｅｒ２アフィボディを与える分子を得た。

[0266] 抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子（生体物質との相互作用基を与える分子）の１０μｇ／ｍＬＰＢＳ溶液を、上記１０－６で得られた基板と反応させ（室温、２時間）、ピリジルジスルフィド基（生体物質との相互作用基を結合させるための基）に抗Ｈｅｒ２アフィボディ基（生体物質との相互作用基）の導入を行った。その後、100μMの２－メルカプトエタノール溶液を反応させることで、残存したピリジルジスルフィド基のキャッピングを行った。次いで、基板をAtto647N-NHS溶液と反応させ(室温、２時間)、アミノ基（シグナル物質結合性基）にAtto647N（シグナル基）を導入した。これによって、ＨＥＲ２を鋳型とした分子インプリント凹部を有し、分子インプリント凹部に、ＨＥＲ２と相互作用する抗ＨＥＲ２アフィボディと、シグナル物質ＡＴＴＯ６４７Ｎとを有する機能性基を有する粒子が固定されたセンシング用基板を得た。

[0267] １０－８．蛍光測定による検出対象の分析

上記１０－７で得られたセンシング用基板を用い、SIC 自動分注装置付き蛍光顕微鏡によるエクソソーム捕捉試験を行った。

[0268] １０－８－１．実験手順

ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームを、ＰＢＳ（１０ｍＭ phosphate，１４０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）中に、０～１．０×１０$^{-13}$Ｍの濃度で溶解させたエクソソーム溶液を調製した。調製されたエクソソーム溶液を、上記１０－７で得られた検出対象の分析用センサに滴下した。

[0269] 蛍光顕微鏡の測定条件については、測定地点は基板上の３ポイント、フィルタはＣｙ５、対物レンズは５倍、露光時間は０．１秒、光量は１００％、光源は水銀ランプとした。

[0270] １０－８－２．結果

相対蛍光強度を算出し、相対蛍光強度とエクソソーム濃度との関係を調べた。結果を図２０に示す。

[0271] 図２０に示すように、上記１０－７で得られたセンシング用基板では、エクソソームの濃度依存的に消光の程度が増加することが確認された。つまり、ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームに対する認識能が示された。また、カーブフィッティングによる解離定数K_dを算出したその結果、解離定数K_dは１．０×１０$^{-17}$（Ｍ）であった。

[0272] また、抗ＨＥＲ２アフィボディの代わりに抗ＨＳＡアフィボディを用いたことを除いて上記と同様にして別のセンシング用基板を得た。抗ＨＥＲ２アフィボディが導入されたセンシング用基板と、抗ＨＳＡアフィボディが導入された別のセンシング用基板とに対し、ＨＥＲ２過剰発現型乳がん細胞株であるＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソーム（５×１０$^{-17}$Ｍ）を添加した場合の相対蛍光強度変化を図２１に示す。

[0273] 図２１に示す通り、ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームは、抗ＨＥＲ２アフィボディが導入された、ＨＥＲ２捕捉を介するエクソソームセンシング用基板によって特異的に検出された。

符号の説明

[0274] １，１ａ…センシング用基板

１０，１０ａ…センシング用ナノ粒子

２０…分子インプリントポリマー

２１…分子インプリント空間

R^1…相互作用基

R^2…シグナル物質結合性基を含む連結基

２２…機能性基

Ｆ２２…機能性モノマー

Ｆ２３…アクリルアミド

Ｆ２４…生体適合性モノマー

３０…シグナル物質

３１…シグナル基

４０…基板

９０…生体物質（センシング対象）

９０’…生体物質（鋳型）

請求の範囲

[請求項1] 生体物質の分子インプリント空間を有する分子インプリントポリマーを含み、

前記分子インプリントポリマーが、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマー由来の構成単位を含み、

前記機能性基が前記分子インプリント空間表面に存在している、センシング用ナノ粒子。

[請求項2] 前記機能性基が下記式（１）で示される、請求項１に記載のセンシング用ナノ粒子。

[化1]

$$-R^2-L^1-R^1 \qquad (1)$$

［R^1は前記生体物質との相互作用基を表し、R^2は前記シグナル物質結合性基を含む連結基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表す。］

[請求項3] 前記相互作用基が、置換又は無置換のアミノ基、置換又は無置換の芳香族基、アミジノ基、グアニジノ基、カルボキシル基、スルホ基、ボロニル基、及び前記生体分子のリガンドからなる群より選択される、請求項１又は２に記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項4] 前記シグナル物質結合性基が、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基、アミノオキシ基、アルデヒド基、及び水酸基からなる群より選択される、請求項１～３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項5] 前記機能性基が下記式（１１）又は（１２）で示される、請求項１～４のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

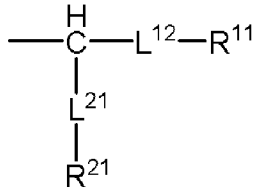
[化2]

$$\text{—}\overset{\overset{H}{|}}{N}\text{—}L^{11}\text{—}R^{11} \qquad (11)$$

［R^{11}は、カルボキシルアリール基又はスルホアリール基を表し、L^1

[1]は、炭素数１～４のアルキレン基を表す。]

[化3]



(12)

[R^{11}は、カルボキシルアリール基又はスルホアリール基を表し、L^{12}は２価連結基を表し、R^{21}は、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、ジスルフィド基含有基、アミノオキシ基、アルデヒド基、又は水酸基を表し、L^{21}は、２価連結基を表す。]

[請求項6] 前記シグナル物質結合性基に結合したシグナル基を含む、請求項１～５のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項7] 前記分子インプリントポリマーが、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド及び／又は生体適合性モノマー由来の構成単位を含む、請求項１～６のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項8] 前記生体物質が、タンパク質、糖鎖、脂質、及びこれらの２以上の複合分子からなる群より選択される、請求項１～７のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項9] 前記生体物質がアルブミンである、請求項１～８のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項10] 前記生体物質の検出に用いられる、請求項１～９のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項11] 生体物質が、膜構造体の生体膜に付着又は結合している物質、前記生体膜の露出している部分構造に相当する分子、若しくは、特定の生体分子の断片であり、前記相互作用基による前記生体分子の捕捉を介した、前記膜構造体又は前記特定の生体分子の検出に用いられる、請求項１～９のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項12] 前記膜構造体が、細胞、ウイルス、細胞外小胞又は細胞小器官であり、前記特定の生体分子が抗体である、請求項１１に記載のセンシン

グ用ナノ粒子。

[請求項13] 前記生体物質がハラムに該当する動植物由来の生体物質であり、ハラルチェックに用いられる、請求項１～１２のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子。

[請求項14] 基板と、前記基板に固定された請求項１～１３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子とを含む、センシング用基板。

[請求項15] 請求項１～１３のいずれかに記載のセンシング用ナノ粒子を含む、センシング用試薬。

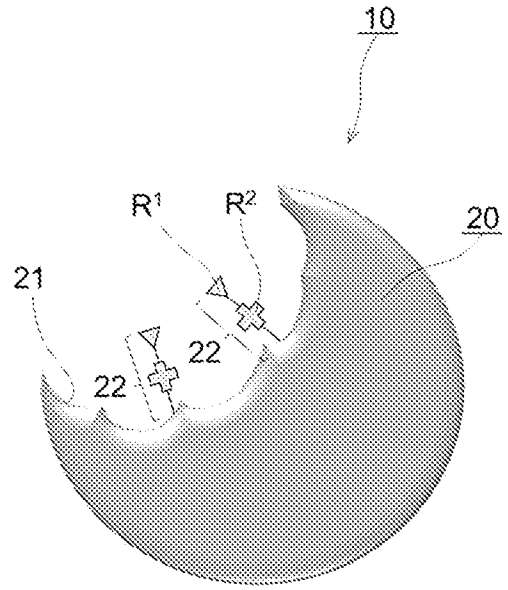
[請求項16] 生体物質を鋳型として、前記生体物質との相互作用基及び前記相互作用基とは異なるシグナル物質結合性基を含む機能性基を有する機能性モノマーを含むモノマー成分を重合させることで、分子インプリントポリマーを合成する工程１と、

前記分子インプリントポリマーから前記鋳型を除去する工程２と、

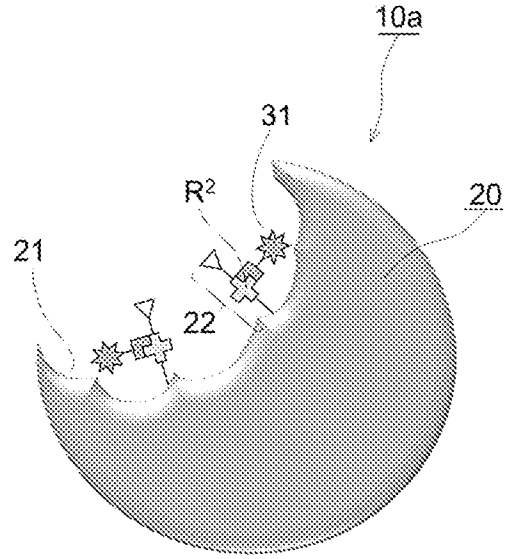
を含む、センシング用ナノ粒子の製造方法。

[請求項17] 前記工程２の後、前記分子インプリントポリマーにおけるシグナル物質結合性基にシグナル物質を結合させる工程３を含む、請求項１６に記載のセンシング用ナノ粒子の製造方法。

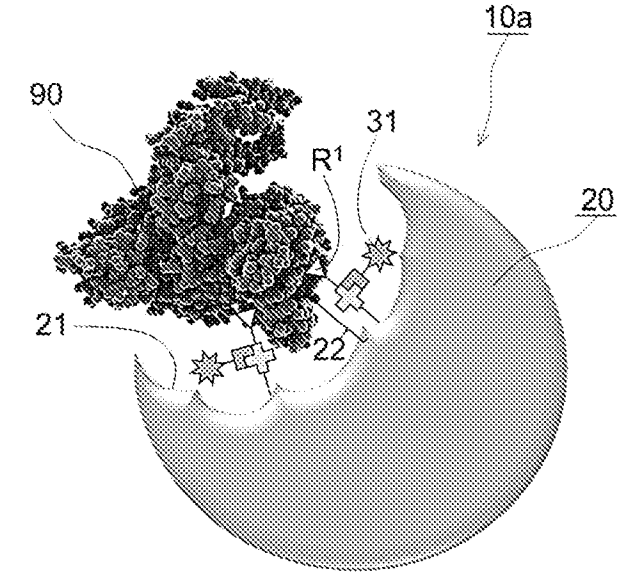
[図1]



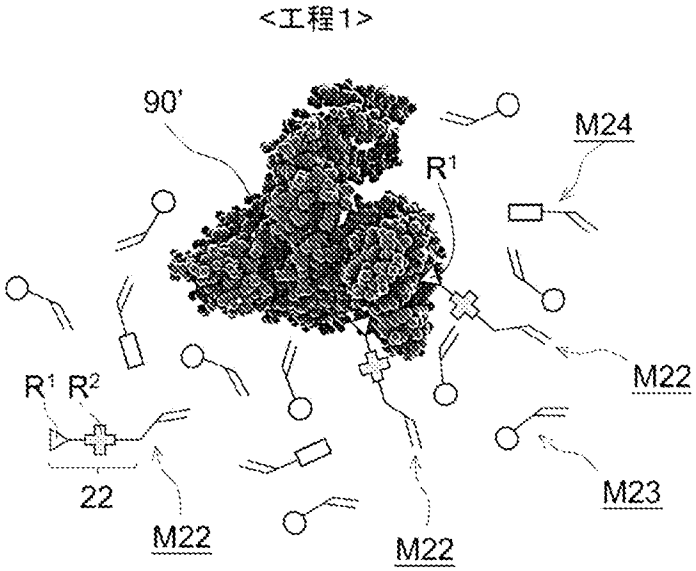
[図2]



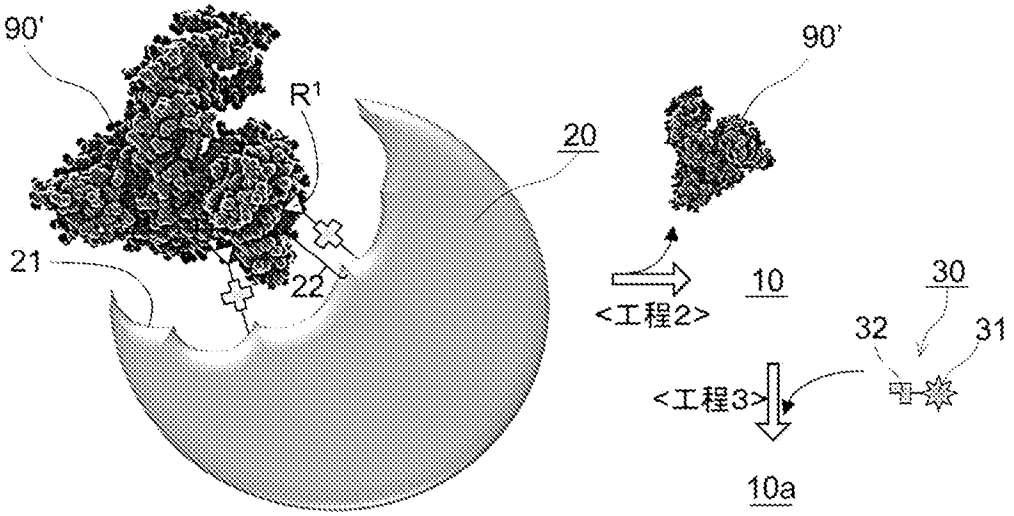
[図3]



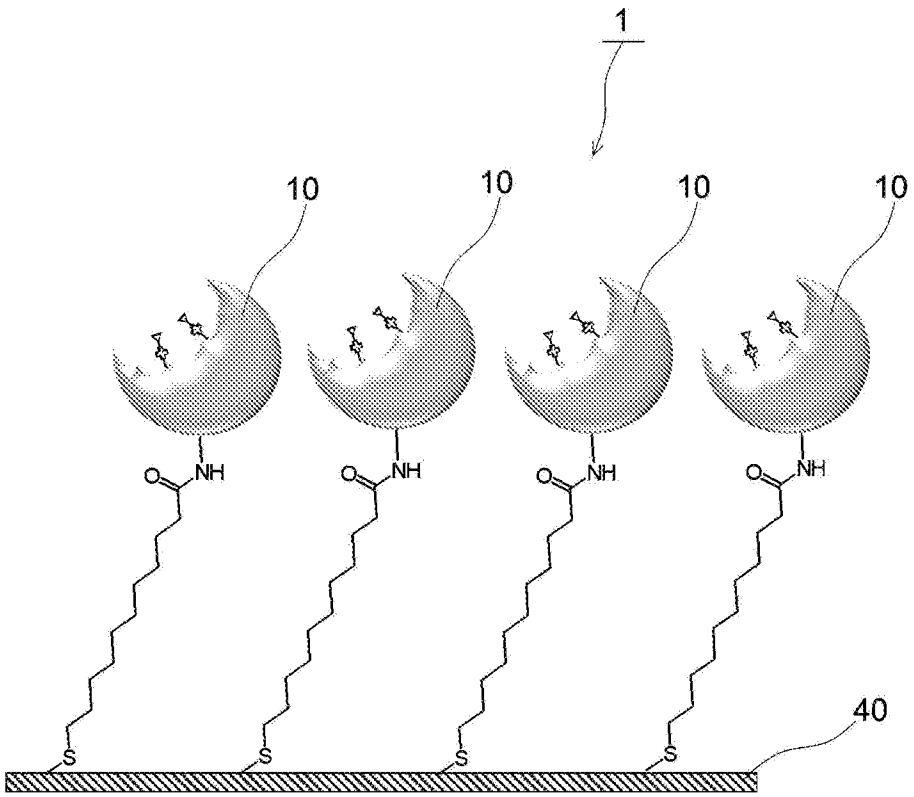
[図4]


<工程1>
90'
M24
R1
M22
R1 R2
22
M22
M22
M23

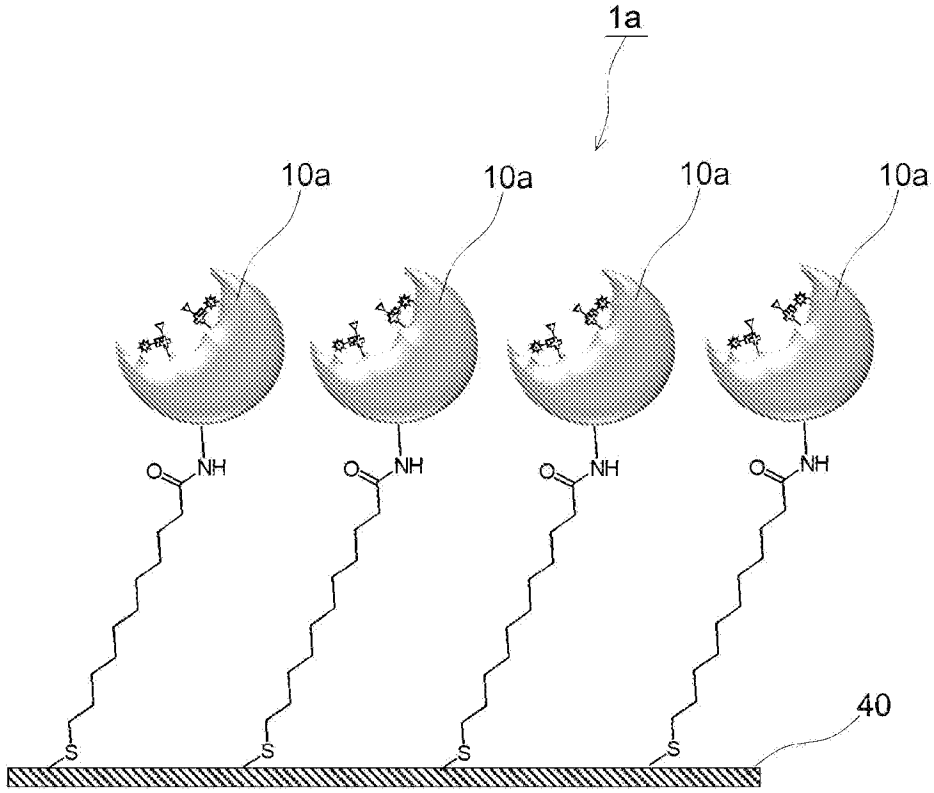
[図5]


90'
R1
20
21
22
90'
<工程2>
10
30
32
31
<工程3>
10a

[図6]

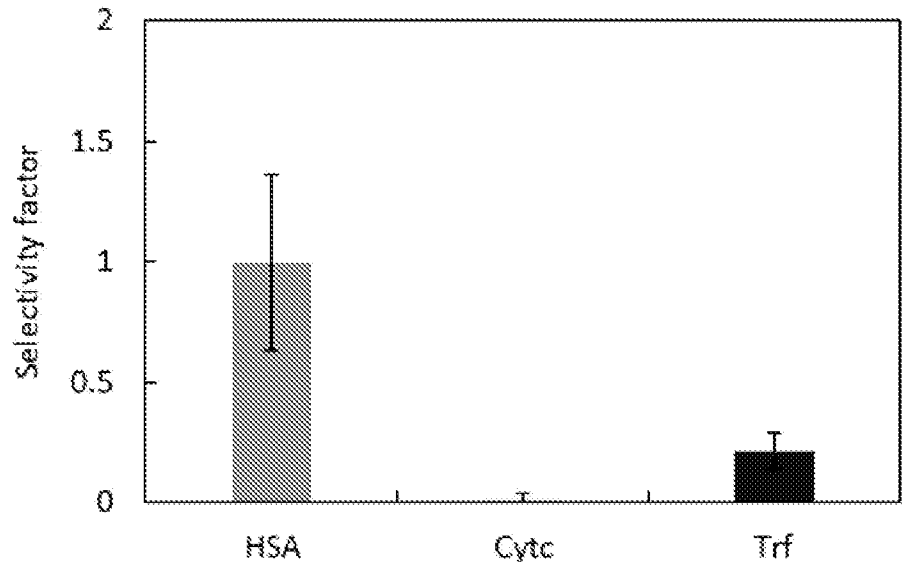

1
10
10
10
10
NH
NH
NH
NH
S
S
S
S
40

[図7]


1a
10a
10a
10a
10a
NH
NH
NH
NH
S
S
S
S
40

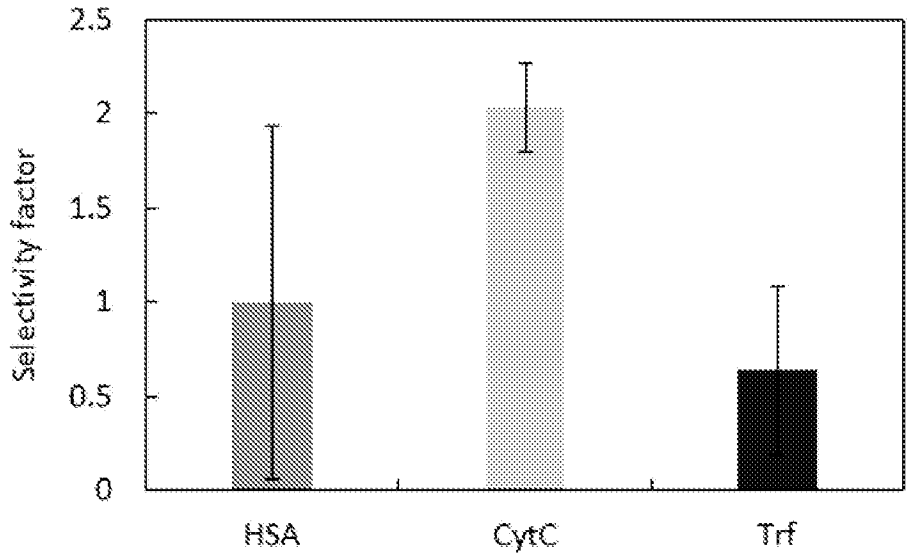
[図8]

実施例２

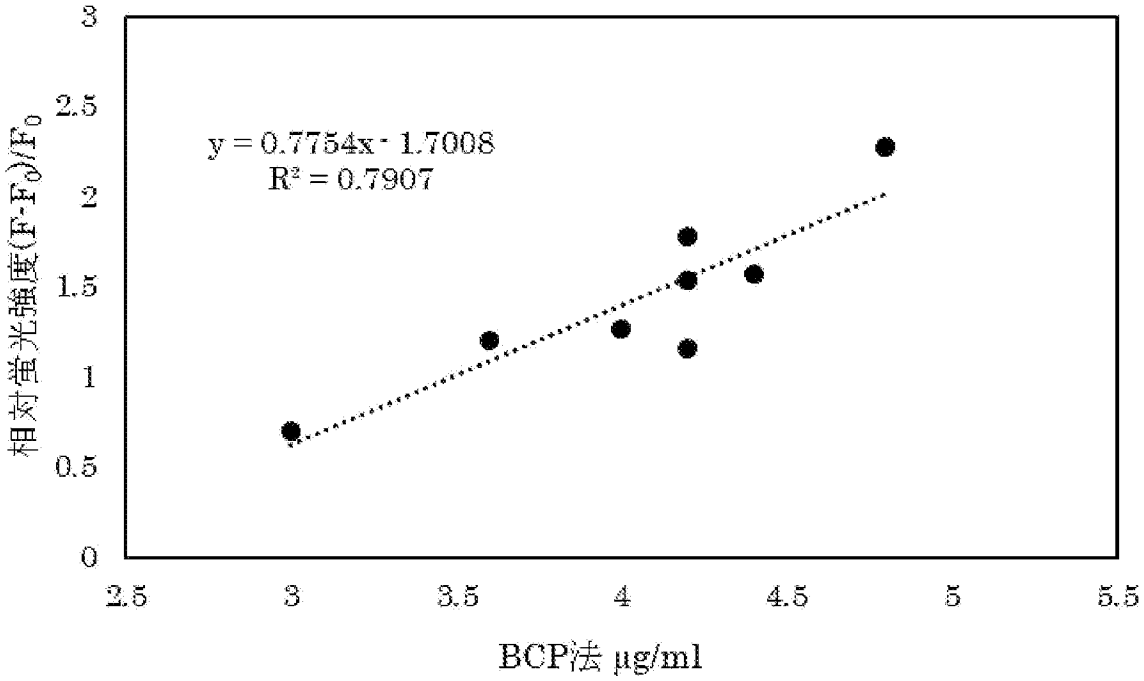


[図9]

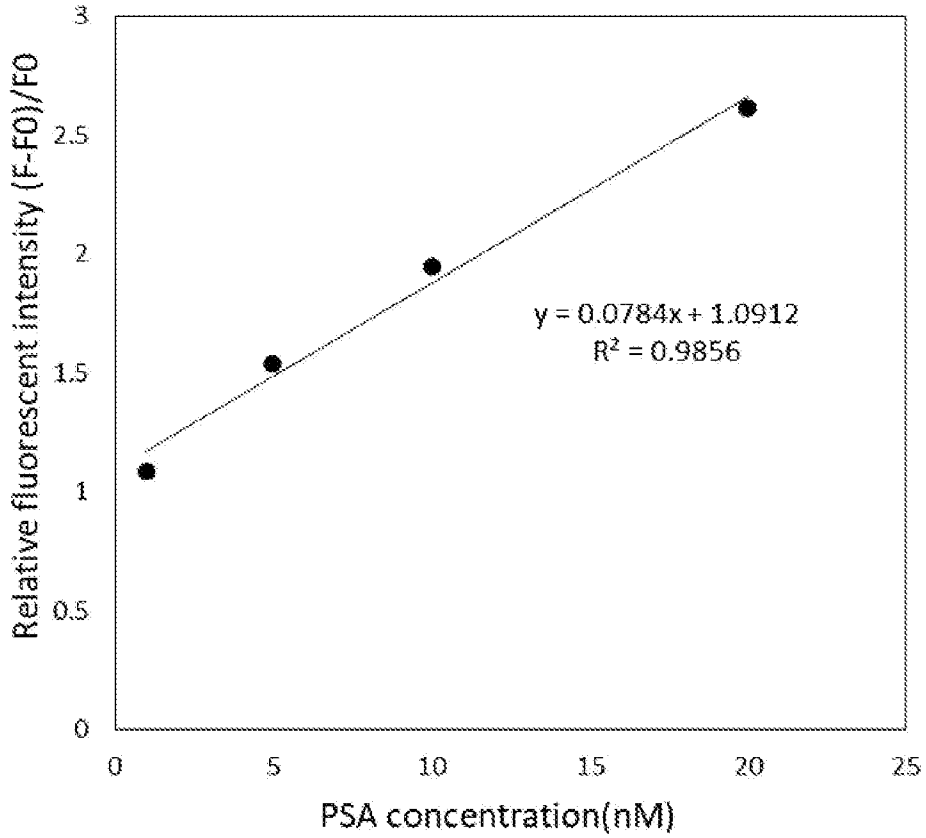
比較例２



[図10]

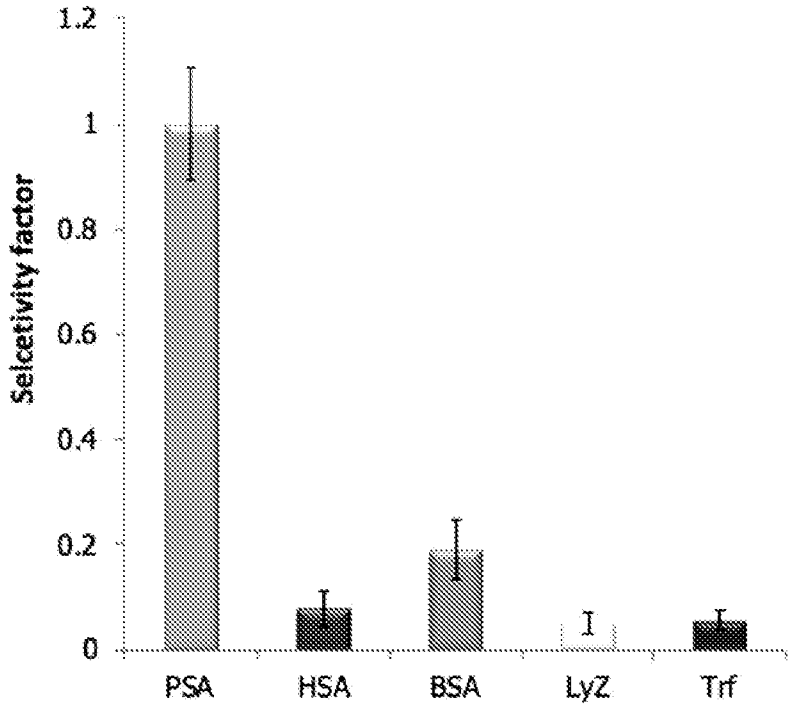

y = 0.7754x - 1.7008
R² = 0.7907
相対蛍光強度(F-F0)/F0
BCP法 μg/ml
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
2.5
3
3.5
4
4.5
5
5.5

[図11]


y = 0.0784x + 1.0912
R² = 0.9856
Relative fluorescent intensity (F-F0)/F0
PSA concentration(nM)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
5
10
15
20
25

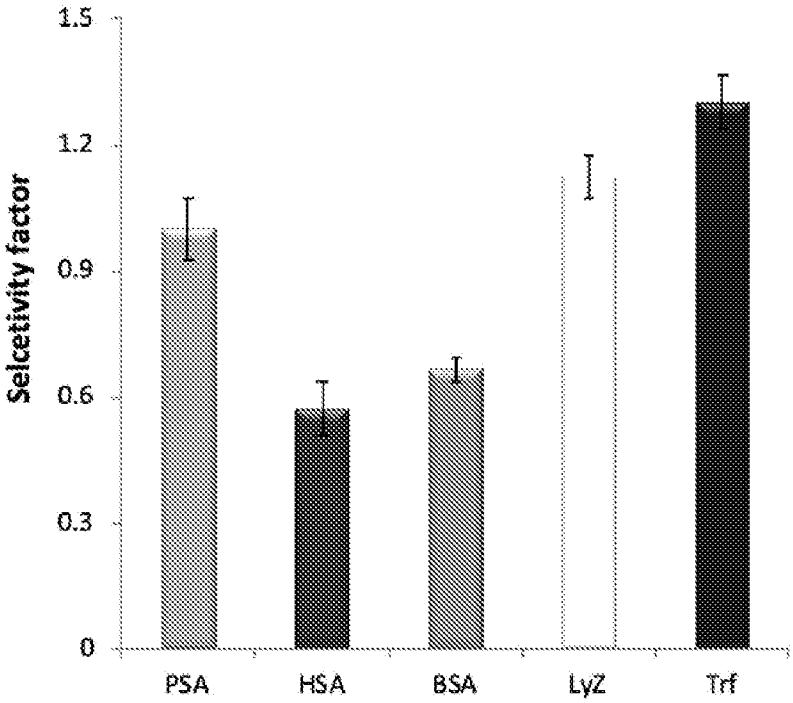
[図12]

実施例４　MIP-NGs

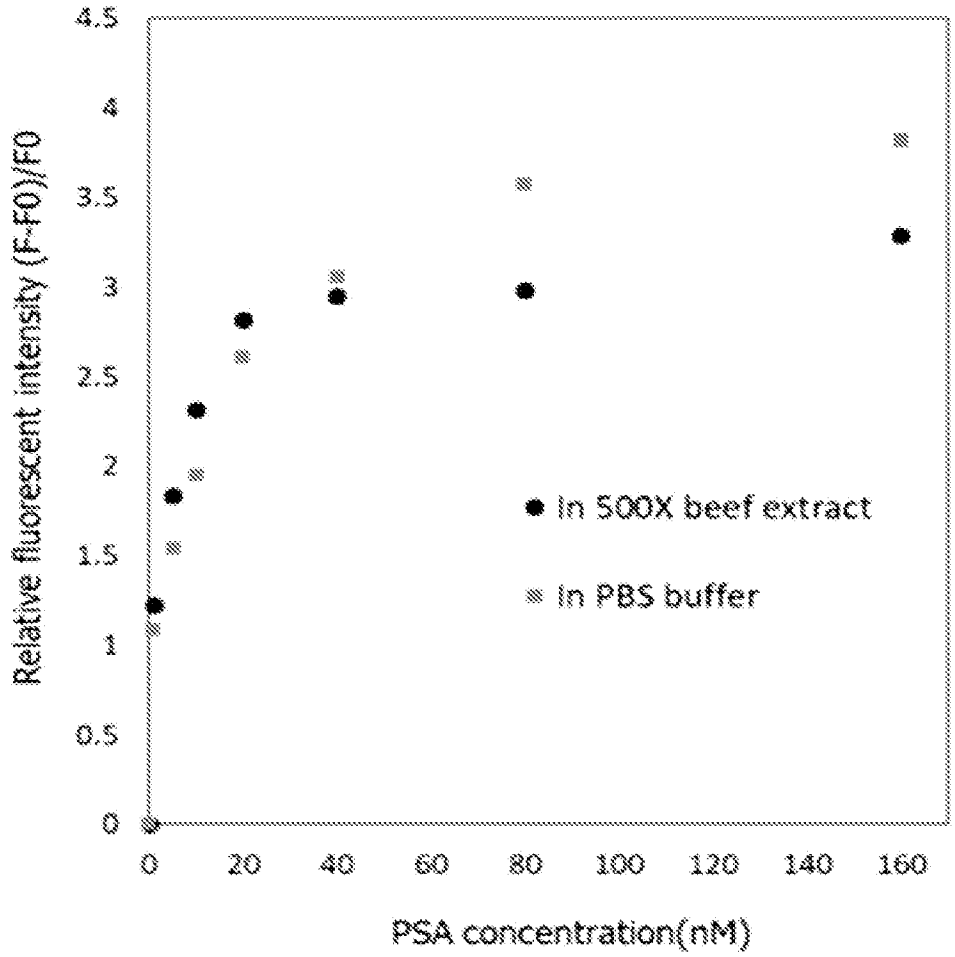


[図13]

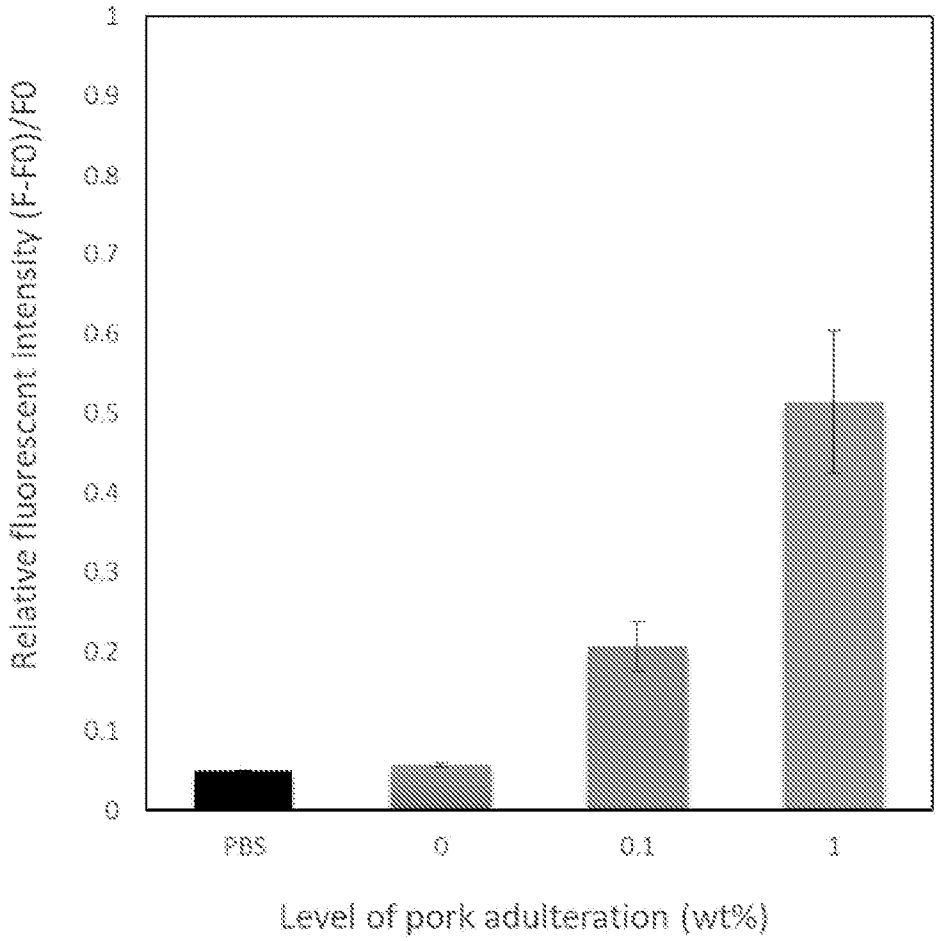
比較例３　NIP-NGs



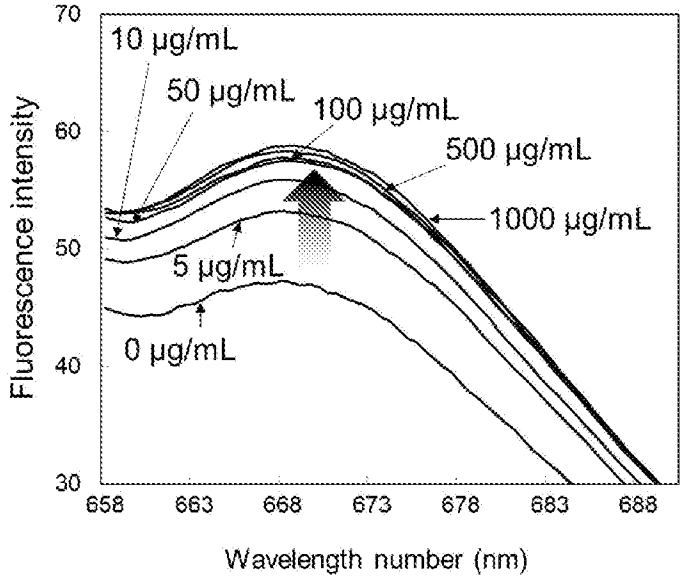
[図14]


Relative fluorescent intensity (F-F0)/F0
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
PSA concentration(nM)
In 500X beef extract
In PBS buffer

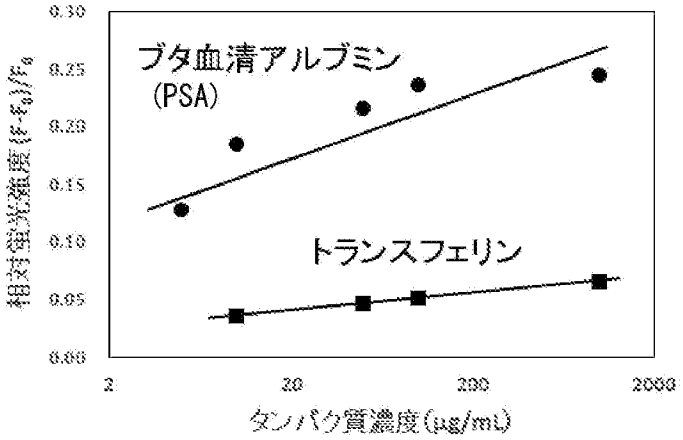
[図15]


Relative fluorescent intensity (F-F0)/F0
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
PBS
0
0.1
1
Level of pork adulteration (wt%)

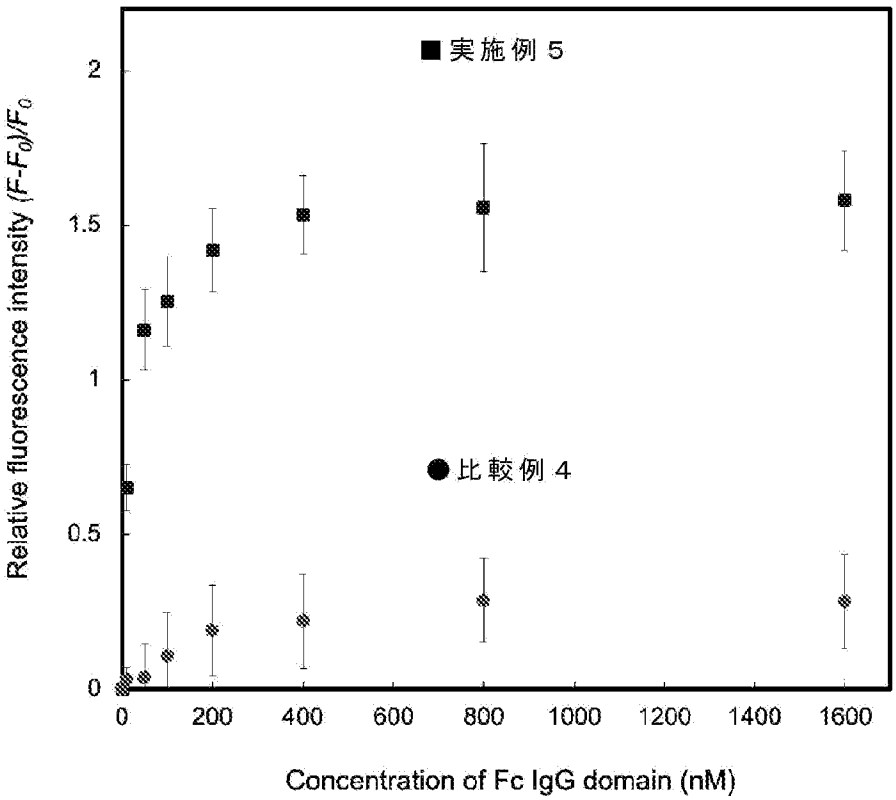
[図16]


Fluorescence intensity
70
60
50
40
30
10 μg/mL
50 μg/mL
100 μg/mL
500 μg/mL
1000 μg/mL
5 μg/mL
0 μg/mL
658
663
668
673
678
683
688
Wavelength number (nm)

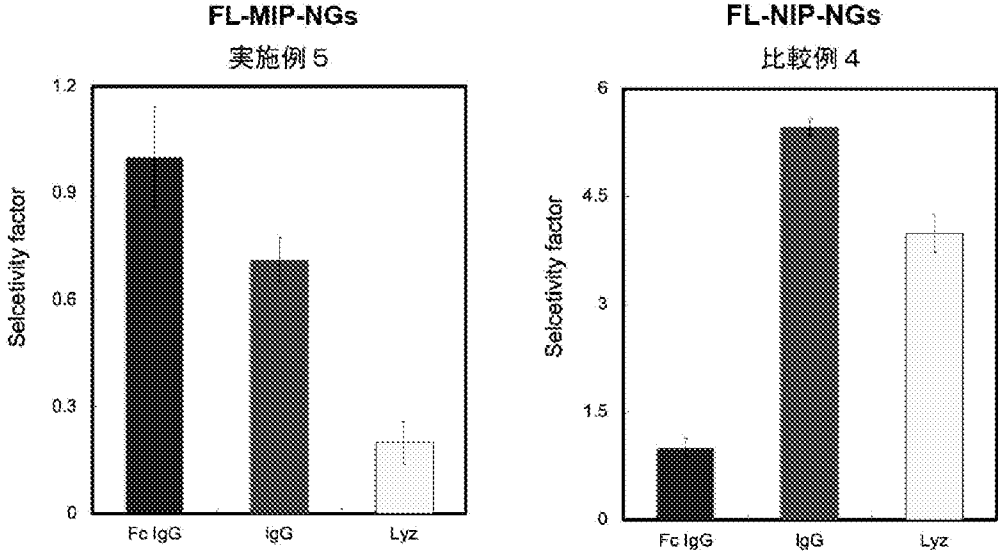
[図17]


ブタ血清アルブミン
(PSA)
トランスフェリン
タンパク質濃度(μg/mL)

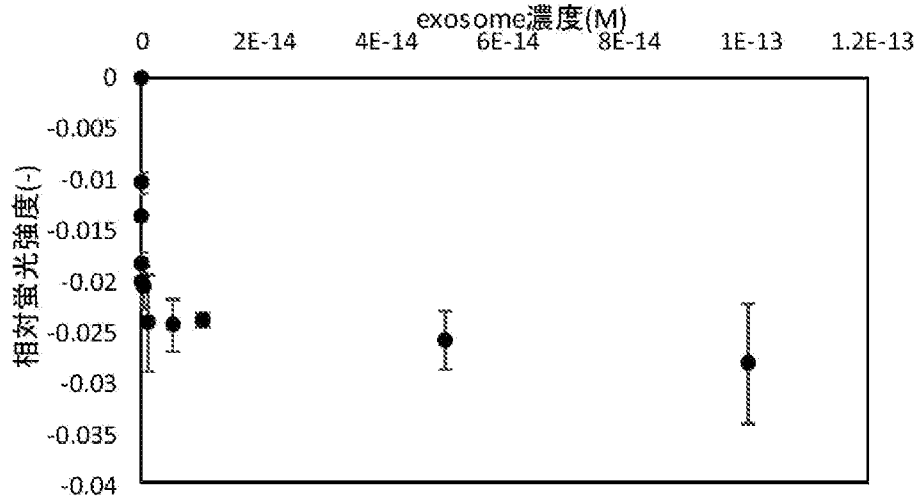
[図18]


■実施例５
●比較例４
Relative fluorescence intensity (F-F0)/F0
Concentration of Fc IgG domain (nM)

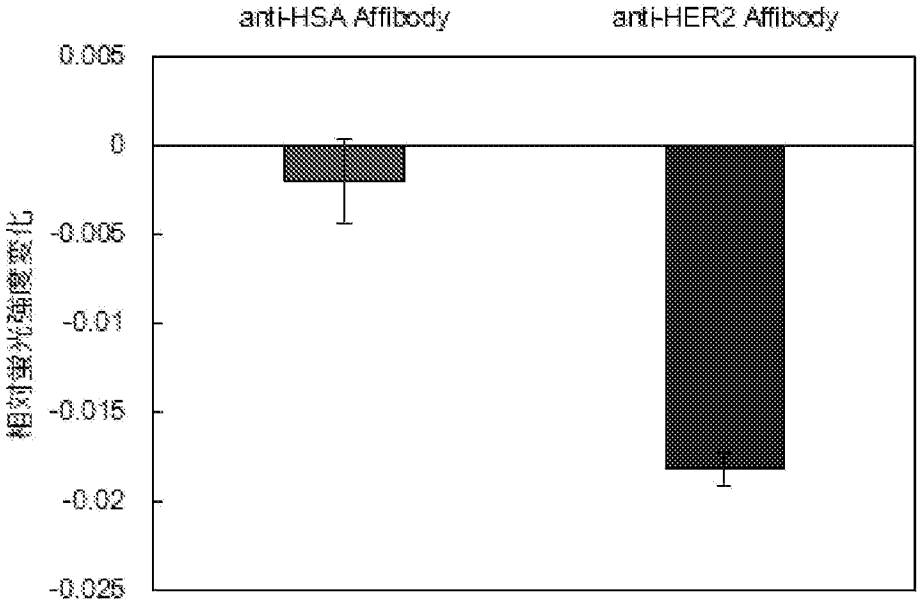
[図19]


FL-MIP-NGs
実施例５
FL-NIP-NGs
比較例４
Selcetivity factor
Fc IgG
IgG
Lyz

[図20]


exosome濃度(M)
0
2E-14
4E-14
6E-14
8E-14
1E-13
1.2E-13
0
-0.005
-0.01
-0.015
-0.02
-0.025
-0.03
-0.035
-0.04
相対蛍光強度(-)

[図21]


anti-HSA Affibody
anti-HER2 Affibody
0.005
0
-0.005
-0.01
-0.015
-0.02
-0.025
相対蛍光強度変化

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/007726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/566(2006.01)i
FI: G01N33/566; G01N33/53 D

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)
G01N33/53; G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2018-132527 A (SHIBAURA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 23 August 2018 (2018-08-23) entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0004], [0021]-[0034], etc.	1-3, 5-6, 8, 15-17 4, 7, 9-14
Y	WO 2018/221271 A1 (KOBE UNIVERSITY) 06 December 2018 (2018-12-06) entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0019]-[0032], [0044]-[0070], etc.	4, 7, 9-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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	Date of mailing of the international search report
30 April 2021 (30.04.2021)	18 May 2021 (18.05.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/007726

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	松本 大樹、外4名，ポストインプリンティング修飾分子インプリントポリマーナノ薄膜による前立腺特異抗原センシング，2017, 第78回応用物理学会秋季学術講演会［講演予稿集］ The 78th JSAF Autumn Meeting, 2017 [extended abstracts], 公益社団法人応用物理学会 The Japan Society of Applied Physics, see entire text, etc., non-official translation (MATSUMOTO, Hiroki et al., "Sensing of prostate-specific antigen with post-Imprinting modifications and nano-film of molecularly imprinted polymers")	4, 7, 9-14
Y	松浦 亮、外5名，分子インプリントポリマー修飾プラズモニックチップによるヒト血清アルブミンの高感度プラズモニックセンシング "Highly Sensitive Plasmonic Sensing for Human Serum Albumin by Molecularly Imprinted Polymer-Coated Plasmonic Chips", <第63回>応用物理学会春季学術講演会講演予稿集, see entire text, etc., (MATSUURA, Akira et al., Lecture preprints of the 63rd JSAP Spring Meeting, 2016)	9-14
A	JP 2016-194443 A (MORINAGA INSTITUTE OF BIOLOGICAL SCIENCE, INC.) 17 November 2016 (2016-11-17) entire text, in particular, see claims, paragraph [0092], etc.	13
	JP 2017-150815 A (HITACHI, LTD.) 31 August 2017 (2017-08-31) see entire text, all drawings, etc.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/007726

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-132527 A	23 Aug. 2018	(Family: none)	
WO 2018/221271 A1	06 Dec. 2018	US 2020/0110084 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0073]-[0088], [0104]-[0143], etc. EP 3647786 A1	
JP 2016-194443 A	17 Nov. 2016	(Family: none)	
JP 2017-150815 A	31 Aug. 2017	WO 2015/182296 A1 see entire text, all drawings, etc.	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/007726

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/566(2006.01)i
FI: G01N33/566; G01N33/53 D

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/53; G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2018-132527 A (学校法人 芝浦工業大学) 23.08.2018 (2018-08-23) 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］、段落［０００４］、［００２１］－［００３４］等参照	1-3,5-6,8,15-17
Y		4,7,9-14
Y	WO 2018/221271 A1 (国立大学法人神戸大学) 06.12.2018 (2018-12-06) 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］、段落［００１９］－［００３２］、［００４４］－［００７０］等参照	4,7,9-14
Y	松本　大樹、外４名，ポストインプリンティング修飾分子インプリントポリマーナノ薄膜による前立腺特異抗原センシング，２０１７年　第７８回応用物理学会秋季学術講演会［講演予稿集］ The 78th JSAP Autumn Meeting, 2017 [Extended Abstracts]，公益社団法人応用物理学会 The Japan Society of Applied Physics 全文等参照	4,7,9-14
Y	松浦 亮 、外５名，分子インプリントポリマー修飾プラズモニックチップによるヒト血清アルブミンの高感度プラズモニックセンシング Highly Sensitive Plasmonic Sensing for Human Serum Albumin by Molecularly Imprinted Polymer-Coated Plasmonic Chips，＜第６３回＞応用物理学会春季学術講演会講演予稿集 全文等参照	9-14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
30.04.2021	18.05.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
草川　貴史 2J 4075
電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2016-194443 A (株式会社森永生科学研究所) 17.11.2016 (2016-11-17) 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落［００９２］等参照	13
A	JP 2017-150815 A (株式会社日立製作所) 31.08.2017 (2017-08-31) 全文・全図等参照	1-17

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/007726

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-132527 A	23.08.2018	（ファミリーなし）	
WO 2018/221271 A1	06.12.2018	US 2020/0110084 A1 全文・全図，特に，特許請求の範囲，段落［００７３］－［００８８］，［０１０４］－［０１４３］等参照 EP 3647786 A1	
JP 2016-194443 A	17.11.2016	（ファミリーなし）	
JP 2017-150815 A	31.08.2017	WO 2015/182296 A1 全文・全図等参照	