

(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2020-526774

(P2020-526774A)

(43) 公表日 令和2年8月31日 (2020.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	2 G O 4 7
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
<b>GO 1 N 29/02 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
	GO 1 N 33/53 U	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-521497 (P2020-521497)	(71) 出願人	520004524
(86) (22) 出願日	平成30年7月5日 (2018.7.5)		アヴィアーナ モレキュラー テクノロジーズ, エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月3日 (2020.3.3)		アメリカ合衆国 フロリダ州 32827
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/040887		, オーランド, サンガー ドライブ 65
(87) 国際公開番号	W02019/010285		55, スイート 200
(87) 国際公開日	平成31年1月10日 (2019.1.10)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	62/529, 986		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成29年7月7日 (2017.7.7)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	62/530, 735	(74) 代理人	100153693
(32) 優先日	平成29年7月10日 (2017.7.10)		弁理士 岩田 耕一
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 弾性表面波センサー用の生物活性コーティング

## (57) 【要約】

弾性波バイオセンサー部品を提供する。弾性波バイオセンサーは、有効な感知領域の表面を増加させるための3Dマトリックス微細構造を伴うかまたは伴わない圧電基材と、圧電基材の表面に共有結合したアンカー物質とを含み、アンカー物質は、捕捉試薬に結合することができる。圧電材料の表面を、アンカー物質を含む生物活性フィルムでコーティングして、3Dバイオセンサー表面および部品を作製するプロセスも提供する。

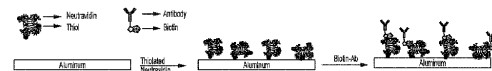


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

金属でコーティングされた基材と；結合タンパク質および少なくとも 1 つの硫黄原子を有する官能基を含むアンカー物質と、を含み、前記アンカー物質は、前記官能基を介して前記金属に直接結合し、金属でコーティングされた前記基材上に単層を形成し；前記アンカー物質は、捕捉試薬に連結するように構成されている、バイオセンサー部品。

**【請求項 2】**

前記金属が、アルミニウム、金、アルミニウム合金、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 3】**

前記金属がアルミニウムである、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 4】**

前記官能基がチオール基である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 5】**

前記結合タンパク質が、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 6】**

前記結合タンパク質が、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン (streptavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 7】**

前記捕捉試薬が、前記アンカー物質の前記結合タンパク質に結合するためのビオチン部分を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 8】**

前記捕捉試薬が、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、小分子またはタンパク質に結合する部分を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 9】**

前記部分が、抗体、アフィマー、またはアプタマーからなる群から選択される、請求項 8 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 10】**

弾性波トランスデューサをさらに備える、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 11】**

前記弾性波トランスデューサが、バルク弾性波を生成する、請求項 10 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 12】**

前記バルク弾性波が、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモードからなる群から選択される、請求項 11 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 13】**

フィルムバルク弾性波共振器ベース (FBAR ベース) のデバイスである、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 14】**

前記弾性波トランスデューサが、弾性表面波を生成する、請求項 10 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 15】**

前記弾性表面波が、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される、請求項 14 に記載のバイオセンサー部品。

10

20

30

40

50

**【請求項 16】**

前記基材が圧電材料を含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 17】**

前記金属が、前記基材上に向けてコーティングされている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 18】**

前記基材が誘電体層をさらに備え、前記金属が前記誘電体層上にコーティングされている、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 19】**

請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品を含むバルク波共振器。

**【請求項 20】**

金属材料の表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第 1 の組成物を前記金属材料の前記表面に塗布して、前記表面上に単層を形成するステップであって、前記アンカー物質は、結合タンパク質および少なくとも 1 つの硫黄を有する官能基を含む、ステップと、  
ビオチン化捕捉試薬を含む第 2 の組成物を前記アンカー物質の前記単層に塗布するステップであって、前記ビオチン化捕捉試薬は、前記結合タンパク質を介して前記アンカー物質に結合して、前記ビオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、  
を含む、プロセス。

**【請求項 21】**

前記アンカー物質の表面をプラズマ洗浄することをさらに含む、請求項 17 に記載のプロセス。

**【請求項 22】**

圧電基材と、  
前記圧電基材の表面に結合した、スペーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬と、を含み、  
前記アンカー物質は、前記結合成分を介して前記捕捉試薬と連結している、  
バイオセンサー部品。

**【請求項 23】**

前記結合成分が結合タンパク質である、請求項 22 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 24】**

前記結合タンパク質が、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである、請求項 23 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 25】**

前記結合タンパク質が、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン (streptavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 26】**

前記結合成分が、1 つまたは複数の官能基を有する結合化合物である、請求項 22 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 27】**

前記結合化合物が、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、スルホ - NHS、エボキシ、カルボン酸、カルボニル、マレイミドおよびアミンからなる群から選択される 1 つまたは複数の官能基を有する、請求項 26 に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 28】**

前記スペーサーがポリマーリンカーである、請求項 22 から 27 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

**【請求項 29】**

前記ポリマーリンカーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポ

10

20

30

40

50

リアクリレートである、請求項 28 に記載のバイオシミラー部品。

【請求項 30】

ポリマーリンカーがポリエチレングリコールである、請求項 23 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 31】

前記アンカー物質が、前記圧電基材の前記表面上に層を形成している、請求項 22 から 30 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 32】

前記アンカー物質の単層が、前記圧電基材の前記表面上に自己組織化単分子層を形成している、請求項 31 に記載のバイオセンサー部品。

10

【請求項 33】

前記アンカー物質の前記結合タンパク質が、前記スペーサーを介して圧電物質の表面から離れて延びている、請求項 22 から 32 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 34】

前記圧電基材が、水晶、ニオブ酸リチウムおよびタンタル酸リチウム、 $36^\circ\text{Y}$ 水晶、 $36^\circ\text{YX}$ タンタル酸リチウム、ランガサイト、ランガテート、ランガナイト、チタン酸ジルコン酸鉛、硫化カドミウム、ベルリナイト、ヨウ素酸リチウム、四ホウ酸リチウム、酸化ビスマスゲルマニウム、酸化亜鉛、窒化アルミニウム、ならびに窒化ガリウムからなる群から選択される、請求項 22 から 33 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 35】

20

ハウジングおよび流体チャンバをさらに含み、アンカー層を有する圧電材料の表面は、前記チャンバの壁を形成する、請求項 22 から 34 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 36】

前記アンカー物質が、シラン基を介して前記圧電基材の前記表面に結合している、請求項 22 から 35 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 37】

前記結合タンパク質が、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである、請求項 22 から 36 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

30

【請求項 38】

前記結合タンパク質が、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン (streptavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである、請求項 22 から 37 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 39】

捕捉試薬をさらに含み、前記捕捉試薬が、前記アンカー物質の前記結合タンパク質に結合するためのピオチン部分を含む、請求項 22 から 38 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 40】

前記捕捉試薬が、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、タンパク質または小分子に結合する第 3 の部分を含む、請求項 22 から 39 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

40

【請求項 41】

弾性波トランスデューサをさらに備える、請求項 22 から 40 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 42】

前記弾性波トランスデューサが、バルク弾性波を生成する、請求項 41 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 43】

前記バルク弾性波が、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモ

50

ードからなる群から選択される、請求項 4 2 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 4 4】

フィルムバルク弾性波共振器ベース（F B A R ベース）のデバイスである、請求項 2 2 から 4 3 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 4 5】

前記弾性波トランスデューサが、弾性表面波を生成する、請求項 4 1 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 4 6】

前記弾性表面波が、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載のバイオセンサー部品。

10

【請求項 4 7】

請求項 2 2 から 4 6 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品を含むバルク波共振器。

【請求項 4 8】

圧電材料の表面をバイオフィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第 1 の組成物を、金属でコーティングされた基材の表面に塗布して、前記表面上に単層を形成するステップであって、前記アンカー物質は、結合成分に連結したスパーサーを含む、ステップと；バイオチン化捕捉試薬を含む第 2 の組成物を前記アンカー物質の前記単層に塗布するステップであって、前記バイオチン化捕捉試薬は、前記アンカー物質の前記結合成分を介して前記アンカー物質に結合して、前記バイオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、を含む、プロセス。

20

【請求項 4 9】

試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって請求項 1 から 1 5 および 2 2 から 4 6 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品を試料と接触させるステップと、コーティングされた前記基材全体にわたって弾性波を生成させるステップと；分析物が前記捕捉試薬に結合した結果としての、前記弾性波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む、方法。

30

【請求項 5 0】

圧電基材と、前記圧電基材上に固定化された捕捉試薬と、を含み、前記圧電基材は、前記圧電基材上に固定化された捕捉試薬の数を増加させるように構成された三次元（3 D）マトリックス微細構造を含み、前記捕捉試薬は、前記 3 D マトリックス微細構造に結合することにより前記圧電基材上に固定化されている、バイオセンサー部品。

【請求項 5 1】

前記 3 D マトリックス微細構造が、複数の細孔を含む、請求項 5 0 に記載のバイオセンサー部品。

40

【請求項 5 2】

前記 3 D マトリックス微細構造が、捕捉剤のマイクロアレイを含む、請求項 5 0 または 5 2 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 3】

前記 3 D マトリックス微細構造がヒドロゲルマトリックスを含む、請求項 5 0 から 5 2 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 4】

ヒドロゲルマトリックスが、複数の細孔を含む、請求項 5 0 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 5】

50

前記ヒドロゲルマトリックスが、架橋ポリマーを含む、請求項 5 3 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 6】

架橋ポリマーが親水性である、請求項 5 3 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 7】

前記 3 D マトリックス微細構造がデンドリマーを含む、請求項 5 0 から 5 2 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 5 8】

前記 3 D マトリックス微細構造が前記ヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイを含む、請求項 5 0 から 5 7 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

10

【請求項 5 9】

前記 3 D マトリックス微細構造が前記ヒドロゲルマトリックスの層を含む、請求項 5 0 から 5 7 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 0】

前記ヒドロゲルマトリックスが、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、有機小分子、ポリペプチド、またはタンパク質に対して不浸透性である、請求項 5 6 から 6 1 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 1】

前記捕捉試薬を前記 3 D マトリックス微細構造または前記圧電物質に付着させるアンカー物質をさらに含む、請求項 5 0 から 6 1 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

20

【請求項 6 2】

前記捕捉試薬が、前記アンカー物質の前記結合タンパク質に結合するためのビオチン部分を含む、請求項 5 0 から 6 1 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 3】

前記捕捉試薬が、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、有機小分子、ポリペプチド、またはタンパク質に結合する部分を含む、請求項 5 0 から 6 2 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 4】

前記部分が、抗体、アフィマー、またはアプタマーからなる群から選択される、請求項 6 3 に記載のバイオセンサー部品。

30

【請求項 6 5】

アンカー物質をさらに含む、請求項 6 0 から 6 4 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 6】

弾性波トランスデューサが、バルク弾性波を生成する、請求項 6 5 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 7】

前記バルク弾性波が、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモードからなる群から選択される、請求項 6 6 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 6 8】

フィルムバルク弾性波共振器ベース（F B A R ベース）のデバイスである、請求項 5 0 から 6 7 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品。

40

【請求項 6 9】

前記弾性波トランスデューサが、弾性表面波を生成する、請求項 6 8 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 7 0】

前記弾性表面波が、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される、請求項 6 9 に記載のバイオセンサー部品。

【請求項 7 1】

請求項 5 0 から 7 0 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品を含むバルク波共振器

50

。

【請求項 7 2】

圧電基材上に 3 D マトリックス微細構造を形成して、前記圧電基材の表面積を増加させるステップと；前記圧電基材上に 1 つまたは複数の捕捉試薬を固定化するステップと、を含む、バイオセンサー部品を作製する方法。

【請求項 7 3】

前記圧電基材上に細孔を形成するステップを含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記圧電基材上にヒドロゲルマトリックスを形成するステップを含む、請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記圧電基材上にヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイを形成するステップを含む、請求項 7 2 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記圧電基材上にヒドロゲルマトリックスの層を形成するステップを含む、請求項 7 2 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記ヒドロゲルマトリックスが、複数の細孔を含む、請求項 7 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

リソグラフィ印刷を使用して、前記圧電基材上に前記捕捉試薬のマイクロアレイを形成するステップを含む、請求項 7 2 に記載の方法。

20

【請求項 7 9】

前記圧電基材上にデンドリマーの層を形成するステップを含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 0】

試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、請求項 5 0 から 7 0 のいずれか一項に記載のバイオセンサー部品を試料と接触させるステップと；

前記金属基材全体にわたって弾性波を生成させるステップと；分析物が前記捕捉試薬に結合した結果としての、前記弾性波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む、方法。

30

【請求項 8 1】

前記試料が、環境試料または生体試料である、請求項 5 9 および 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記生体試料が、血液、血清、血漿、尿、痰、または糞便である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記弾性波が、約 1 0 0 ~ 3 0 0 0 M H z の入力周波数を有する、請求項 4 9 、 8 1 、 および 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

この特許出願は、2 0 1 7 年 7 月 7 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 2 9 , 9 8 6 号 および 2 0 1 7 年 7 月 1 0 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 3 0 , 7 3 5 号の利益および優先権を主張し、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

50

## 【 0 0 0 2 】

本開示は、一般に、生物活性コーティング方法、および弾性表面波技術の圧電表面を使用するマイクロフレイディクスを用いた単一または多重化バイオセンサーデバイスの3D改変に関する。より詳細には、本開示は、緩衝液中の小分子、核酸配列、タンパク質、抗体および細胞、感染した可能性のある患者または動物の生体試料の迅速な検出のためのサンドイッチアッセイを実施するために、三次元(3D)表面を作製して、捕捉剤結合の密度を高め、感度を向上させるため、圧電結晶または金属の表面にバイオコーティングする方法に関し、バイオセンサーに基づく弾性表面の開発に好適なプラットフォーム技術を作製する。

## 【 背景技術 】

10

## 【 0 0 0 3 】

診断がなければ医学は盲目的であり、したがって診断領域では疾患および脅威を迅速かつ正確に特定することが重要である。生物現象を診断するために使用される検出技術は、従来、光センサーおよび化学センサーを使用しており、音響技術の最近の開発により、バイオセンシング用の音響法の使用可能性が生じている。音響法は、基本的なセンシング特性として弾性波(すなわち、非常に高い周波数の音)の生成を伴う電気信号に応答する応答性圧電材料の機能を利用する。弾性波が弾性波センサー材料の表面にわたってまたは表面上で伝播するとき、分析物の結合によって波路における質量負荷および/または粘度変化がもたらされ、これにより弾性表面波またはバルク弾性波の速度および/または振幅に影響を与える場合がある。これらの変化は、それらの表面に結合した対応する量と関連している場合があり、測定されて、前記分析物の感知/検出を提供する。残念ながら、標的分子とセンサー表面との間の結合は弱い場合があり、したがって、弾性波センサーは多くの場合感度が不足し、標的が提示されると効率的に動作しない。そのため、目的の生体分子/分析物を表面に効率的に結合させて検出感度を高めることができる、受容体分子の、安定な、高強度の固定化が必要である。

20

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 4 】

一態様では、本開示は、金属でコーティングされた基材と; 結合タンパク質および少なくとも1つの硫黄原子を有する官能基を含むアンカー物質と、を含み、アンカー物質は、官能基を介して金属に直接結合し、金属でコーティングされた基材上に単層を形成し; アンカー物質は、捕捉試薬に連結するように構成されている、バイオセンサー部品を提供する。

30

## 【 0 0 0 5 】

一実施形態では、金属は、アルミニウム、金、アルミニウム合金、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

## 【 0 0 0 6 】

一実施形態では、金属はアルミニウムである。

## 【 0 0 0 7 】

一実施形態では、官能基はチオール基である。

40

## 【 0 0 0 8 】

一実施形態では、結合タンパク質は、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである。

## 【 0 0 0 9 】

一実施形態では、結合タンパク質は、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン(streptavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである。

## 【 0 0 1 0 】

一実施形態では、捕捉試薬は、アンカー物質の結合タンパク質に結合するためのビオチン部分を含む。

50



## 【 0 0 1 1 】

一実施形態では、捕捉試薬は、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、小分子またはタンパク質に結合する部分を含む。

## 【 0 0 1 2 】

一実施形態では、部分は、抗体、アフィマー、またはアプタマーからなる群から選択される。

## 【 0 0 1 3 】

一実施形態では、バイオセンサーは、弾性波トランスデューサをさらに備える。

## 【 0 0 1 4 】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、バルク弾性波を生成する。

10

## 【 0 0 1 5 】

一実施形態では、バルク弾性波は、厚みすべりモード、音響プレートモード (acoustic plate mode)、および水平プレートモード (horizontal plate mode) からなる群から選択される。

## 【 0 0 1 6 】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、フィルムバルク弾性波共振器ベース (F B A R ベース) のデバイスである。

## 【 0 0 1 7 】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、弾性表面波を生成する。

## 【 0 0 1 8 】

20

一実施形態では、弾性表面波は、横波型弾性表面波、表面横波 (surface traverse wave)、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される。

## 【 0 0 1 9 】

一実施形態では、基材は圧電材料を含む。

## 【 0 0 2 0 】

一実施形態では、金属は、基材上に向けてコーティングされている。

## 【 0 0 2 1 】

一実施形態では、基材は誘電体層をさらに備え、金属は誘電体層上にコーティングされている。

## 【 0 0 2 2 】

30

一態様では、本開示は、前述のいずれか 1 つのバイオセンサー部品を含むバルク波共振器を提供する。

## 【 0 0 2 3 】

一態様では、本開示は、金属材料の表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第 1 の組成物を金属材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合タンパク質および少なくとも 1 つの硫黄を有する官能基を含む、ステップと；ビオチン化捕捉試薬を含む第 2 の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ビオチン化捕捉試薬は、結合タンパク質を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、を含むプロセスを提供する。

40

## 【 0 0 2 4 】

一実施形態では、アンカー物質の表面をプラズマ洗浄する。

## 【 0 0 2 5 】

一態様では、本開示は、圧電基材と；圧電基材の表面に結合した、スパーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬と、を含み、アンカー物質は、結合成分を介して捕捉試薬と連結している、バイオセンサー部品を提供する。

## 【 0 0 2 6 】

一実施形態では、結合成分は結合タンパク質である。

## 【 0 0 2 7 】

一実施形態では、結合タンパク質は、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマ

50

ー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである。

【0028】

ー実施形態では、結合タンパク質は、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン(strepavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである。

【0029】

ー実施形態では、結合成分は、1つまたは複数の官能基を有する結合化合物である。

【0030】

ー実施形態では、結合化合物は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、スルホ-NHS、エポキシ、カルボン酸、カルボニル、マレイミドおよびアミンからなる群から選択される1つまたは複数の官能基を有する。

【0031】

ー実施形態では、スペーサーはポリマーリンカーである。

【0032】

ー実施形態では、ポリマーリンカーは、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリアクリレートである。

【0033】

ー実施形態では、ポリマーリンカーは、ポリエチレングリコールである。

【0034】

ー実施形態では、アンカー物質は、圧電基材の表面上に層を形成している。

【0035】

ー実施形態では、アンカー物質の単層は、圧電基材の表面上に自己組織化単分子層を形成している。

【0036】

ー実施形態では、アンカー物質の結合タンパク質は、スペーサーを介して圧電物質の表面から離れて延びている。

【0037】

ー実施形態では、圧電基材は、水晶、ニオブ酸リチウムおよびタンタル酸リチウム、36°Y水晶、36°YXタンタル酸リチウム、ランガサイト、ランガテート、ランガナイト、チタン酸ジルコン酸鉛、硫化カドミウム、ベルリナイト、ヨウ素酸リチウム、四ホウ酸リチウム、酸化ビスマスゲルマニウム、酸化亜鉛、窒化アルミニウム、ならびに窒化ガリウムからなる群から選択される。

【0038】

ー実施形態では、バイオセンサー部品は、ハウジングおよび流体チャンバをさらに含み、アンカー層を有する圧電材料の表面は、チャンバの壁を形成する。

【0039】

ー実施形態では、アンカー物質は、シラン基を介して圧電基材の表面に結合する。

【0040】

ー実施形態では、結合タンパク質は、アビジン、オリゴヌクレオチド、抗体、アフィマー、アプタマー、またはポリヌクレオチドである。

【0041】

ー実施形態では、結合タンパク質は、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン(strepavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである。

【0042】

ー実施形態では、バイオセンサー部品は、捕捉試薬をさらに含み、捕捉試薬は、アンカー物質の結合タンパク質に結合するためのビオチン部分を含む。

【0043】

ー実施形態では、捕捉試薬は、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、タンパク質または小分子に結合する第3の部分を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、弾性波トランスデューサをさらに備える。

## 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、バルク弾性波を生成する。

## 【 0 0 4 6 】

一実施形態では、バルク弾性波は、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモードからなる群から選択される。

## 【 0 0 4 7 】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、フィルムバルク弾性波共振器ベース（FBA Rベース）のデバイスである。

10

## 【 0 0 4 8 】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、弾性表面波を生成する。

## 【 0 0 4 9 】

一実施形態では、弾性表面波は、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される。

## 【 0 0 5 0 】

一態様では、本開示は、前述のいずれか1つのバイオセンサー部品を含むバルク波共振器を提供する。

## 【 0 0 5 1 】

一態様では、本開示は、圧電材料の表面をバイオフィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第1の組成物を、金属でコーティングされた基材の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合成分に連結したスパーサーを含む、ステップと；ピオチン化捕捉試薬を含む第2の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ピオチン化捕捉試薬は、アンカー物質の結合成分を介してアンカー物質に結合して、ピオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、を含むプロセスを提供する。

20

## 【 0 0 5 2 】

一態様では、本開示は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、前述のいずれか1つのバイオセンサー部品を試料と接触させるステップと；コーティングされた基材全体にわたって弾性波を生成させるステップと；分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む、方法を提供する。

30

## 【 0 0 5 3 】

一態様では、本開示は、圧電基材と；圧電基材上に固定化された捕捉試薬と、を含み、圧電基材は、圧電基材上に固定化された捕捉試薬の数を増加させるように構成された三次元（3D）マトリックス微細構造を含み、捕捉試薬は、3Dマトリックス微細構造に結合することにより圧電基材上に固定化されている、バイオセンサー部品を提供する。

## 【 0 0 5 4 】

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、複数の細孔を含む。

## 【 0 0 5 5 】

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、捕捉剤のマイクロアレイを含む。

40

## 【 0 0 5 6 】

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、ヒドロゲルマトリックスを含む。

## 【 0 0 5 7 】

一実施形態では、ヒドロゲルマトリックスは、複数の細孔を含む。

## 【 0 0 5 8 】

一実施形態では、ヒドロゲルマトリックスは、架橋ポリマーを含む。

## 【 0 0 5 9 】

一実施形態では、架橋ポリマーは親水性である。

## 【 0 0 6 0 】

50

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、デンドリマーを含む。

【0061】

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、ヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイを含む。

【0062】

一実施形態では、3Dマトリックス微細構造は、ヒドロゲルマトリックスの層を含む。

【0063】

一実施形態では、ヒドロゲルマトリックスは、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、有機小分子、ポリペプチド、またはタンパク質に対して不浸透性である。

【0064】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、捕捉試薬を3Dマトリックス微細構造または圧電物質に付着させるアンカー物質をさらに含む。

【0065】

一実施形態では、捕捉試薬は、アンカー物質の結合タンパク質に結合するためのビオチン部分を含む。

【0066】

一実施形態では、捕捉試薬は、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、有機小分子、ポリペプチド、またはタンパク質に結合するための部分を含む。

【0067】

一実施形態では、部分は、抗体、アフィマー、またはアプタマーからなる群から選択される。

【0068】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、アンカー物質をさらに含む。

【0069】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、バルク弾性波を生成する。

【0070】

一実施形態では、バルク弾性波は、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモードからなる群から選択される。

【0071】

一実施形態では、バイオセンサー部品は、フィルムバルク弾性波共振器ベース(FBARベース)のデバイスである。

【0072】

一実施形態では、弾性波トランスデューサは、弾性表面波を生成する。

【0073】

一実施形態では、弾性表面波は、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される。

【0074】

一態様では、本開示は、前述のいずれか1つのバイオセンサー部品を含むバルク波共振器を提供する。

【0075】

一態様では、本開示は、圧電基材上に3Dマトリックス微細構造を形成して、圧電基材の表面積を増加させるステップと；圧電基材上に1つまたは複数の捕捉試薬を固定化するステップと、を含む、バイオセンサー部品を作製する方法を提供する。

【0076】

一実施形態では、本開示は、圧電基材上に細孔を形成するステップを含む。

【0077】

一実施形態では、この方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスを形成するステップを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 8 】

一実施形態では、この方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイを形成するステップを含む。

## 【 0 0 7 9 】

一実施形態では、この方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスの層を形成するステップを含む。

## 【 0 0 8 0 】

一実施形態では、ヒドロゲルマトリックスは、複数の細孔を含む。

## 【 0 0 8 1 】

一実施形態では、この方法は、リソグラフィ印刷を使用して圧電基材上に捕捉試薬のマイクロアレイを形成するステップを含む。

10

## 【 0 0 8 2 】

一実施形態では、この方法は、圧電基材上に dendrimer の層を形成するステップを含む。

## 【 0 0 8 3 】

一態様では、本開示は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、前述のいずれか 1 つのバイオセンサー部品を試料と接触させるステップと；金属基材全体にわたって弾性波を生成させるステップと；分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む方法を提供する。

## 【 0 0 8 4 】

一実施形態では、試料は、環境試料または生体試料である。

20

## 【 0 0 8 5 】

一実施形態では、生体試料は、血液、血清、血漿、尿、痰、または糞便である。

## 【 0 0 8 6 】

一実施形態では、弾性波は、約 1 0 0 ~ 3 0 0 0 M H z の入力周波数を有する。

## 【 0 0 8 7 】

さらに、いくつかの実施形態は、金属でコーティングされた基材と、結合タンパク質またはヌクレオチドおよび少なくとも 1 つの硫黄原子を有する官能基を含むアンカー物質と、を含み、アンカー物質は、捕捉試薬に連結するように構成されており、官能基を介して金属に直接結合し、金属基材上に単層を形成する、バイオセンサー部品に関する。

30

## 【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態は、アンカー物質を含む第 1 の組成物を金属 / 結晶材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合タンパク質および少なくとも 1 つの硫黄を有する官能基を含む、ステップにより、金属材料表面 / および / または結晶平面を生物活性膜でコーティングするプロセスに関する。第 2 の組成物は、アンカー物質の単層にビオチン化捕捉試薬を含み、ビオチン化捕捉試薬は、結合タンパク質を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する。

## 【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態は、バイオセンサー部品と、圧電基材と、圧電基材の表面に結合した、スペーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬とに関し、アンカー物質は、結合成分を介して捕捉試薬と連結している。

40

## 【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態は、アンカー物質を含む第 1 の組成物を金属 / 結晶材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合成分に連結したスペーサーを含む、ステップにより、圧電材料の表面をバイオフィルムでコーティングするプロセスに関する。第 2 の組成物は、アンカー物質の単層にビオチン化捕捉試薬を含み、ビオチン化捕捉試薬は、アンカー物質の結合成分を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する。

## 【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、本明

50

細書に記載のバイオセンサー部品を試料と接触させるステップと、コーティングされた基材全体にわたって弾性波またはバルク波を生成させるステップと、分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波またはバルク波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む、方法に関する。

【0092】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のバイオセンサー部品を含むバルク波共振器に関する。圧電基材は、圧電基材の表面に結合した、スペーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬とを伴い、アンカー物質は、結合成分を介して捕捉試薬と連結している。

【0093】

いくつかの実施形態は、アンカー物質を含む第1の組成物を金属/結晶材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合成分に連結したスペーサーを含む、ステップにより、圧電材料の表面を生物活性コーティングでコーティングするプロセスに関する。第2の組成物は、アンカー物質の単層にビオチン化捕捉試薬を含み、ビオチン化捕捉試薬は、アンカー物質の結合成分を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する。

【0094】

いくつかの実施形態は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法に関する。この方法は、コーティングされた基材全体にわたって弾性波またはバルク波を生成させることによりバイオセンサー部品を接触させるステップと、分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波またはバルク波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む。

【0095】

いくつかの実施形態は、圧電基材と、圧電基材上に固定化された捕捉試薬と、を含み、圧電基材は、圧電基材上に固定化された捕捉試薬の数を増加させるように構成された三次元(3D)マトリックス微細構造を含み、捕捉試薬は、3Dマトリックス微細構造に結合することにより圧電基材上に固定化されている、バイオセンサー部品に関する。

【0096】

いくつかの実施形態は、圧電基材上に3Dマトリックス微細構造を形成して、圧電基材の表面積を増加させるステップと、圧電基材上に1つまたは複数の捕捉試薬を固定化するステップと、によって、バイオセンサー部品を作製する方法に関する。

【0097】

いくつかの実施形態は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、上記の実施形態のいずれか1つのバイオセンサー部品を接触させるステップと、金属基材全体にわたって弾性バルク波を生成させるステップと、分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波またはバルク波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、による、方法に関する。

【0098】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のバイオセンサー部品を含むバルク波共振器に関する。

【0099】

いくつかの実施形態は、ラブ波としてポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)ポリマーを使用し、かつプラズマエッチングを使用して、センサーの表面に3D構造を作製し、表面積を増加させる。

【0100】

以下の用語は、下記でそれらに与えられた意味を有するものとする。

【0101】

「アンカー物質」とは、センサー表面の圧電基材(「直接」結合用)金属部分またはその上の中間コーティングと、「捕捉試薬」(以下で定義する)との両方に結合するコーティング材料を指す。この用語には、アビジンであって、特異的結合パートナーとして機能

10

20

30

40

50

するビオチンに結合する能力によって機能的に定義されたタンパク質ファミリーのメンバーであるもの（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン）、ならびに、特異的結合パートナーを有するオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドおよびタンパク質であって、これらを使用して、捕捉試薬を改変し、したがって捕捉試薬をアンカーコーティング圧電センサー材料に結合させることができるもの、が含まれる。また、炭水化物群に結合する天然の炭水化物結合レクチンも含まれる（例えば、抗体および抗体断片（すなわち、F e断片）およびアプタマーなどのヌクレオチド断片における）。試験の精度に影響を与える立体配座の変化または捕捉試薬の部分的な変性のあるため、一般に、捕捉試薬をアンカーとして使用することは好ましくない。オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、直接に、または適用された中間の銀コーティングを介し、（例

10

20

#### 【0102】

「捕捉試薬」とは、生体試料中の分析物に特異的に結合し、生体試料からの分析物を捕捉することにより、分析物を識別および/または定量するために使用することができる物質を意味する。この用語には、抗体、アプタマー、およびそれらの抗体断片が含まれるが、これらに限定されない。捕捉試薬は、アンカー物質の特異的結合パートナーであるリンキング基による改変（例えば、ビオチン化または相補的核酸）の有無にかかわらず、アンカー物質に結合する。換言すれば、捕捉試薬は、アンカー物質の特異的結合パートナーであるかまたはそれを含み、同時に分析物を認識する。

#### 【0103】

「有機小分子」とは、約10ダルトン超約2500ダルトン未満、好ましくは約2000ダルトン未満、好ましくは約10～約1000ダルトンの間、より好ましくは約10～約500ダルトンの間の分子量を有する、天然または合成または組換えのいずれかの有機分子を指す。

#### 【0104】

「アビジン」は、鳥類、爬虫類および両生類などの卵白に由来するタンパク質であり、多くの生化学反応において使用されている。アビジンファミリーには、ニュートラアビジン、ストレプトアビジンおよびアビジンが含まれ、これらすべてのタンパク質は、ビオチンを高い親和性および特異性で結合する能力によって機能的に定義される。アビジンには、ストレプトアビジンなどの細菌アビジン、およびニュートラアビジンなどの改変アビジンも含まれる（Thermo Scientific製の脱グリコシル化アビジン：[www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)）。それらは小さなオリゴマータンパク質であり、それぞれ4つ（または2つ）の同一のサブユニットを含み、各サブユニットはビオチンのための単一の結合部位を有する。本発明においてバイオセンサーの表面に結合する場合、いくつかの部位は金属コーティング圧電材料表面に面していることがあり、したがってビオチン結合には利用することができない。他のいくつかの部位は、圧電材料から離れて面しており、ビオチン結合に利用することができる。アビジンのビオチンへの結合親和性は、非共有結合ではあるが、非常に高いため、不可逆的と見なすことができる。アビジンの解離定数（KD）は約10～15Mであり、したがってこの結合は最も強力な既知の非共有結合の1つとなっている。その四量体形態では、アビジンは66～69kDaのサイズであると推定される。分子量の10パーセントは、4～5つのマンノースと3つのN-アセチルグルコサミン残基で構成される炭水化物含有量に起因する。アビジンの炭水化物部分には、構造および組成が類似した少なくとも3つの固有のオリゴ糖構造タイプが含まれている。

30

40

#### 【0105】

「ビオチン」は、d-ビオチンまたはビタミンH、ビタミンB7、およびコエンザイムRとも呼ばれ、アビジンの特異的結合パートナーである。Sigma-Aldrichを含む複数の供給元から市販されている。

50

## 【 0 1 0 6 】

本明細書で提供される範囲は、範囲内のすべての値の略記であると理解される。例えば、1～50の範囲には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50を含む群の任意の数、数の組合せ、または部分範囲、ならびに前述の整数の間にあるすべての小数、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、および1.9が含まれると理解される。部分範囲に関しては、範囲のいずれかの端点から延びる「入れ子になった部分範囲」が特に考えられる。例えば、1～50の例示的な範囲の入れ子になった部分範囲は、ある方向に1～10、1～20、1～30、および1～40、または他の方向に50～40、50～30、50～20、および50～10を含んでもよい。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 1 0 7 】

【図1】チオール化生物学的捕捉試薬を使用した非変性アルミニウム表面へのバイオコーティングの一実施形態を示す。

【図2】アルミニウム(A1)表面への優先的なニュートラアビジン(NAv)の結合を示す。図2Aは、ピオチン化HRP/o-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)ペアを使用した酵素アッセイの結果を示す。417nmでの吸光度の強度は、センサーの表面に結合したNAvの量に比例した。A1コーティング結晶表面上の結合NAvの量は、チオール化NAvを使用した場合に大幅に増加した。図2Bは、表面NAvに結合したピオチン化フルオレセイン分子の顕微鏡ベースの画像を示す(倍率500倍)図2Cは、0.2μmポリスチレンピオチン化蛍光ビーズの結合を示す画像を示す(倍率500倍)。

【図3】標的分析物を選択的に捕捉するためのニュートラアビジンによるバイオコーティング開発の概略図を示す。

【図4】センサー上の水の接触角測定を示す。図4Aは、接触角の大幅な減少をもたらすプラズマ洗浄を示す。図4Bは、PEG-シランでコーティングすると、センサーの疎水性が著しく増加したことを示す。

【図5】ピオチン化フルオレセインの蛍光画像(図5A、倍率50倍)および蛍光ポリスチレンビーズ(図5B、倍率500倍)を示しており、表面バイオコーティングへの均一な結合を示す。

【図6】標的分析物を選択的に捕捉するためのバイオコーティング開発(ニュートラアビジンなし)を示す。

【図7】エポキシスパーサーを介して固定化された表面バイオコーティングに結合した蛍光分析物を示す。図7Aは対照(500倍)であり、図7Bはエポキシコーティングセンサー(500倍)である。

【図8】ピコ秒レーザーシステムによって穿孔されたヒドロゲルマトリックス内の正弦波構造のSEM画像および接触角を示す。図8Aは、周期性が25μm、高さが12μmの正弦波構造を示す。図8Bは、周期性が35μm、高さが45μmの正弦波構造を示す。

【図9】マイクロパターン/ナノパターンの作製のためのソフトリソグラフィプロセスを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 1 0 8 】

本開示は、少なくとも部分的に、バイオセンサー基材を、コーティングの前に改変してもよく、または金属でコーティングしてもよく、少なくとも1つの硫黄原子を有する官能基を含む結合タンパク質(例えば、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体など)を有するアンカー物質は、金属でコーティングされた基材に結合して、生物活性コーティングを形成することができ、この生物活性コーティングは、バイオセンサーデバイス(例えば、弾性表面波(Sound Acoustic Wave)(SAW)センサー、バルク弾性波(BAW)センサーなど)に結合/連結して、バイオセンサーデバイスによって検出される信号の



強度と感度を高めることができる、という発見に基づいている。

【0109】

いくつかの実施形態では、アビジンなどのアンカー物質の金属コーティング圧電材料への直接結合は、本明細書で議論される条件下で得ることができる。このプロセスを使用して、アンカー物質は、強力で安定な共有結合または化学吸着結合を介して金属コーティング圧電基材表面に直接付着することに成功し、金属コーティング圧電表面上に単層を形成する。アンカー物質の複数の層が音響信号に干渉することがあるため、単層はバイオセンサーの最適かつ一貫した機能に寄与し得る。

【0110】

本明細書に記載の音響技術により、高精度および高感度の生物学的センシングのための音響法の使用が可能になる。本明細書に記載の技術を使用して、生物学的感受性薬剤を、音響透過性材料の表面に適合させて、結合することができ、これは検出用途のための音響法の使用をさらに拡大するのに役立つ。いくつかの実施形態は、生物材料と金属コーティング結晶の表面との間に強力な接着を提供するためのシラン、反応性アミン、カルボキシル残基およびエポキシ残基を有する化合物、ならびに炭水化物系材料などの化学剤の使用に関する。いくつかの実施形態では、結晶表面は、水晶、および同様の材料、例えばニオブ酸リチウムおよびタンタル酸リチウム、 $36^\circ\text{Y}$ 水晶、 $36^\circ\text{YX}$ タンタル酸リチウム、ランガサイト、ランガテート、ランガナイト、チタン酸ジルコン酸鉛、硫化カドミウム、ベルリナイト、ヨウ素酸リチウム、四ホウ酸リチウム、酸化ビスマスゲルマニウム、酸化亜鉛、窒化アルミニウム、ならびに窒化ガリウムであってもよい。

10

20

【0111】

いくつかの実施形態は、生体材料または化学化合物の付着に適している金属で結晶の表面をコーティングする方法に関する。いくつかの実施形態では、金属は、アルミニウム、アルミニウム合金、金、銀、チタン、クロム、白金、タングステンなどであり得る。いくつかの実施形態では、金属は、アルミニウムまたはアルミニウム合金であり得る。本明細書に記載の方法により、従来、生体材料との結合が不十分であり得るいくつかの金属表面を、使用することができる。例えば、アルミニウム自体は生体材料と弱い結合を形成し得るが、本明細書に記載の方法および材料により、弾性表面波(SAW)センサーにおいてアルミニウム表面の幅広い用途が可能になる。生体材料を結合するための表面としてアルミニウムを使用すると、音響センサーと併用した場合に、信号損失を引き起こさず、結合材料を破壊せず、ブラックレイグまたはパープルレイグを形成しないなどの利点があり得る。さらに、アルミニウムの表面は、より効果的に弾性波を伝播し得る。本明細書に記載の方法は、生体分子または化学分子と金属(アルミニウムまたはアルミニウム合金)コーティング表面との間の強力な結合を実現し、これにより、SAWセンサーにおいて金属コーティング表面を使用することが可能になる。

30

【0112】

本明細書に記載の方法および材料は、金属(アルミニウムまたはアルミニウム合金)コーティング結晶表面および非コーティング結晶上に安定な共有結合バイオコーティングを提供することができ、これらの表面結合生物活性コーティングは、機能的な生物活性を保持することができる。さらに、本明細書に記載の方法および材料は、高感度の電気システムおよび様々な改変と組み合わせた場合に、高感度のバイオセンサーを提供するのに役立つ。

40

【0113】

本明細書に記載の方法は、共有結合した親和性捕捉試薬を達成することができる。捕捉試薬のいくつかの例には、小分子、抗体、タンパク質抗原、アプタマー、または標的分析物の選択的捕捉に好適な他のそのような分子が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、表面接着により、標的分析物を選択的かつ特異的に捕捉するための、アルミニウム表面上における前記親和剤の好適な配向がもたらされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の材料は、親和剤および活性化部分に共有結合した親和剤を固着するために使用されるチオール官能基で活性化されたシランの組合せを含むことができ

50

、活性化部分は、エポキシおよび他の好適な接着化学官能基を含むことができる。いくつかの実施形態では、活性化部分は、立体障害を最小化するためにPEG化炭水化物などのスペーサーとともに使用されて、シグナル応答を増加させてもよい。いくつかの実施形態では、活性化部分は、スペーサーとともに使用されなくてもよい。

#### 【0114】

本明細書に記載の生物学的アンカー物質は、多くの場合、生物活性であることが知られており、アビジンなどの薬剤が含まれるが、これらに限定されない。アビジンは、結合の安定性を高めながら、改変されたタンパク質、ポリマー、および炭水化物成分を含む広範囲のバイオチン化材料に結合することができる。本明細書に記載の方法は、SAWセンサーの表面を活性化するために使用することができ、熱、プラズマ、放射線、および酸素または窒素などのガスが含まれるがこれらに限定されない。これらの異なるプロセスは、複数の条件下で様々な処理を提供する。SAWセンサーのアルミニウムコーティング結晶表面は、これらの条件下で活性化され、これにより生物学的に活性な捕捉試薬の共有結合が強化される。これらの表面改変と材料との組合せは、所望の標的分析物分子を特異的に捕捉するための任意の抗体または他の親和性捕捉剤でセンサーの表面を修飾する普遍的なプラットフォームとして機能する。

10

#### 【0115】

##### バイオセンサー部品

センサーの表面は、圧電結晶材料上に堆積した金属層（アルミニウムまたはアルミニウム合金）であってもよく、またはセンサーは、金属層のない非コーティング圧電材料であってもよい。いくつかの実施形態では、SAWセンサーの表面は、圧電結晶材料上に堆積した金属層（アルミニウムまたはアルミニウム合金）であり得る。いくつかの実施形態では、SAWセンサーのセクションは、結晶と交互に金属コーティングを含んでいても、または誘電体材料層で覆われていてもよい。いくつかの実施形態では、誘電体層はポリマーまたはセラミック層であり得る。いくつかの実施形態では、誘電体層は、SiO<sub>2</sub>、ポリ（メタクリル酸メチル）（PMMA）、酸化亜鉛、または窒化アルミニウムを含むことができる。いくつかの実施形態では、好適な結晶を種々の結晶カットとともに使用することができる。いくつかの実施形態では、センサーのセクションは、圧電基材上に堆積した誘電体層を含み得る。いくつかの実施形態では、センサーのセクションは、金属層上に堆積した誘電体層を含んでもよく、さらに金属層は圧電基材上に堆積している。いくつかの実施形態では、センサーのセクションは、誘電体層上に堆積した金属層を含んでもよく、さらに誘電体層は金属層上に堆積している。いくつかの実施形態では、センサーのセクションは、誘電体層上に堆積した第1の金属層を含んでもよく、さらに誘電体層は第2の金属層上に堆積しており、さらに第2の金属層は圧電基材上に堆積している。標的分析物の検出のためのセンサーの使用に関するすべての好適なアプローチは、本明細書に記載の好適なコーティングでセンサー表面を修飾する能力に基づくことができる。生体分子の検出のために、センサー表面は、所望の標的分析物を選択的に捕捉することができる好適な材料で固定化または改変することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のセンサーはSAWセンサーであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のセンサーはBAWセンサーであり得る。

20

30

40

#### 【0116】

いくつかの実施形態は、金属層でコーティングされた基材、結合タンパク質および少なくとも1つのチオール基を有する官能基を含むアンカー物質を含み、アンカー物質は、官能基を介して金属層に直接結合し、アンカー物質は、捕捉試薬に連結するように構成されている、バイオセンサー部品に関する。いくつかの実施形態では、アンカー物質は、金属層に結合した後、金属層上に単層を形成する。

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、金属は、アルミニウム、金、アルミニウム合金、銀、チタン、クロム、白金、タングステン、およびまたはそれらの任意の組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、金属は、圧電基材または誘電体基材上に堆積している

50

。いくつかの実施形態では、金属は、誘電体基材上に堆積しており、さらに、誘電体基材は、別の金属層上に堆積している。

【0118】

いくつかの実施形態では、基材は圧電材料を含む。いくつかの実施形態では、基材は、圧電材料の真上に配置された誘電体層をさらに含む。

【0119】

いくつかの実施形態では、結合タンパク質上の官能基は、チオール基である。

【0120】

いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、アビジン、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、抗体などの親和性薬剤であり得る。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン(strepavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、抗体、アフィマー、およびアプタマーを含み得る。

10

【0121】

捕捉試薬は、抗体、アプタマー、またはビオチン化オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸、タンパク質、ペプチド、およびIgA、IgG、IgM、IgEを含む抗体、酵素、酵素補因子、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン受容体、多糖、キレート剤、炭水化物または糖から形成された他の特異的リガンドもしくは受容体であり得る。

20

【0122】

いくつかの実施形態では、捕捉試薬は、全細胞、細菌、真核細胞、腫瘍細胞、ウイルス、真菌、寄生虫、芽胞、核酸、タンパク質または小分子に結合するための部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、部分は、抗体、タンパク質断片、ペプチド、ポリペプチド、アフィマー、抗体断片、アプタマーまたはヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、部分は、抗体、アフィマー、またはアプタマーからなる群から選択される。

【0123】

捕捉試薬は、結合タンパク質への特異的結合パートナーで改変することができる。いくつかの実施形態では、捕捉試薬は、アンカー物質の結合タンパク質に結合するためのビオチン部分をさらに含む。

30

【0124】

例示されたバイオセンサーおよび検出方法のいくつかは、捕捉試薬として付着した抗体を有する表面として示されている。しかし、バイオセンサーは、捕捉試薬として抗体を使用することに限定されず、センサー表面上にタンパク質断片、アフィマー、抗体断片、アプタマーまたはヌクレオチドを含むがこれらに限定されない他の捕捉剤を固定化するように適合させることができる。

【0125】

本明細書に記載のバイオセンサー部品は、弾性波またはバルク波トランスデューサをさらに備える。いくつかの実施形態では、弾性波トランスデューサは、バルク弾性波を生成する。いくつかの実施形態では、バルク弾性波は、厚みすべりモード、音響プレートモード、および水平プレートモードからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バイオセンサー部品は、フィルムバルク弾性波共振器ベース(FBARベース)のデバイスである。

40

【0126】

いくつかの実施形態では、弾性波トランスデューサは、弾性表面波を生成する。いくつかの実施形態では、弾性表面波は、横波型弾性表面波、表面横波、レイリー波、およびラブ波からなる群から選択される。

【0127】

いくつかの実施形態は、結晶層、結合タンパク質および少なくとも1つのチオール基を

50

有する官能基を含むアンカー物質を含み、アンカー物質は、官能基を介して結晶層に直接結合し、アンカー物質は、捕捉試薬に連結するように構成されている、バイオセンサー部品に関する。

【0128】

金属表面 / 材料と官能基（例えば、チオール基）との間の結合が記載されている実施形態では、金属表面 / 材料は、結晶材料または他の圧電材料で置き換えることができる。

【0129】

スペーサー含有アンカー物質

いくつかの実施形態は、金属でコーティングされた基材と、金属に結合した、スペーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬と、を含み、アンカー物質は、結合成分を介して捕捉試薬と連結している、バイオセンサー部品に関する。いくつかの実施形態では、基材は圧電材料を含むことができる。いくつかの実施形態では、スペーサーは、金属コーティング上に共有結合を形成することができるシラン基を含む。したがって、いくつかの実施形態では、アンカー物質は、シラン基を介して金属コーティング圧電基材の表面に結合する。

10

【0130】

いくつかの実施形態は、結晶材料と、結晶材料に結合した、スペーサーおよび結合成分を含むアンカー物質と、捕捉試薬と、を含むバイオセンサー部品に関する。アンカー物質は、結合成分を介して捕捉試薬と連結している。いくつかの実施形態では、スペーサーは、シラン基を含む。シラン基は、結晶材料上に共有結合を形成することができる。したがって、いくつかの実施形態では、アンカー物質は、シラン基を介して結晶材料の表面に結合する。

20

【0131】

いくつかの実施形態では、結合成分は、例えばアビジン、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドなどの結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ニュートラアビジン、天然アビジン、ストレプトアビジン (streptavidin)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアビジンである。

【0132】

いくつかの実施形態では、結合成分は、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、スルホ - NHS、エポキシ、カルボン酸、カルボニル、マレイミドおよび / またはアミンからなる群から選択される 1 つまたは複数の官能基を有する結合化合物である。

30

【0133】

いくつかの実施形態では、スペーサーは、ポリマーリンカーであり、ここで、ポリマーリンカーは、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリアクリレートである。いくつかの実施形態では、ポリマーリンカーは、約 50 ~ 約 10,000、約 100 ~ 約 10,000、約 200 ~ 約 8000、約 300 ~ 約 8000、約 400 ~ 約 8000、約 500 ~ 約 6000、約 600 ~ 約 6000、約 700 ~ 約 6000、約 800 ~ 約 5000、約 900 ~ 約 5000、約 1000 ~ 約 5000、約 500 ~ 約 4000、約 600 ~ 約 4000、約 700 ~ 約 4000、約 800 ~ 約 4000、約 900 ~ 約 4000、約 1000 ~ 約 4000、約 500 ~ 約 3000、約 600 ~ 約 3000、約 700 ~ 約 3000、約 800 ~ 約 3000、約 900 ~ 約 3000、約 1000 ~ 約 3000、約 500 ~ 約 2000、約 600 ~ 約 2000、約 700 ~ 約 2000、約 800 ~ 約 2000、約 900 ~ 約 5000、または約 1000 ~ 約 2000 の範囲の分子量を有する直鎖ポリエチレンである。

40

【0134】

いくつかの実施形態では、ポリマーリンカーは、約 10 超、約 50 超、約 100 超、約 200 超、約 300 超、約 400 超、約 500 超、約 600 超、約 700 超、約 800 超、約 900 超、約 1000 超、約 1200 超、約 1400 超、約 1600 超、約 1800 超、または約 2000 超の分子量を有する直鎖ポリエチレンである。いくつかの実施形態では、ポリマーリンカーは、約 500 未満、約 600 未満、約 700 未満、約 800 未満

50

、約 900 未満、約 1000 未満、約 1200 未満、約 1400 未満、約 1600 未満、約 1800 未満、約 2000 未満、約 2200 未満、約 2400 未満、約 2600 未満、約 2800 未満、約 3000 未満、約 3500 未満、約 4000 未満、約 4500 未満、約 5000 未満、約 5500 未満、約 6000 未満、約 6500 未満、約 7000 未満、約 7500 未満、約 8000 未満、約 8500 未満、約 9000 未満、約 9500 未満、または約 10,000 未満の分子量を有する直鎖ポリエチレンである。

#### 【0135】

結合化合物が 1 つまたは複数の官能基（例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、スルホ - NHS、エポキシ、カルボン酸、カルボニル、マレイミド、および / またはアミン）を有する実施形態では、スペーサーの長さは、約 0.1 ~ 50、0.5 ~ 50、1 ~ 50、1.5 ~ 50、2 ~ 50、2.5 ~ 50、3 ~ 50、4 ~ 50、5 ~ 50、0.1 ~ 40、0.5 ~ 40、1 ~ 40、1.5 ~ 40、2 ~ 40、2.5 ~ 40、3 ~ 40、4 ~ 40、5 ~ 40、0.1 ~ 30、0.5 ~ 30、1 ~ 30、1.5 ~ 30、2 ~ 30、2.5 ~ 30、3 ~ 30、4 ~ 30、5 ~ 30、0.1 ~ 20、0.5 ~ 20、1 ~ 20、1.5 ~ 20、2 ~ 20、2.5 ~ 20、3 ~ 20、4 ~ 20、5 ~ 20、0.1 ~ 10、0.5 ~ 10、1 ~ 10、1.5 ~ 10、2 ~ 10、2.5 ~ 10、3 ~ 10、4 ~ 10、5 ~ 10、0.1 ~ 8、0.5 ~ 8、1 ~ 8、1.5 ~ 8、2 ~ 8、2.5 ~ 8、3 ~ 8、4 ~ 8、5 ~ 8、0.1 ~ 5、0.5 ~ 5、1 ~ 5、1.5 ~ 5、2 ~ 5、2.5 ~ 5、3 ~ 5、4 ~ 5、0.1 ~ 3、0.5 ~ 3、1 ~ 3、1.5 ~ 3、2 ~ 3、2.5 ~ 3、0.1 ~ 2.5、0.5 ~ 2.5、1 ~ 2.5、1.5 ~ 2.5、または 2 ~ 2.5 nm の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、スペーサーは、0.05 nm 超、0.1 nm 超、0.2 nm 超、0.3 nm 超、0.4 nm 超、0.5 nm 超、0.6 nm 超、0.7 nm 超、0.8 nm 超、0.9 nm 超、1 nm 超、1.2 nm 超、1.4 nm 超、1.6 nm 超、1.8 nm 超、2 nm 超、2.5 nm 超、3 nm 超、4 nm 超、5 nm 超、6 nm 超、7 nm 超、8 nm 超、9 nm 超、10 nm 超、20 nm 超、30 nm 超、40 nm 超、50 nm 超、60 nm 超、70 nm 超、80 nm 超、90 nm 超、または 100 nm 超の範囲の長さを有する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、1 nm 未満、1.5 nm 未満、2 nm 未満、2.5 nm 未満、3 nm 未満、4 nm 未満、5 nm 未満、10 nm 未満、20 nm 未満、30 nm 未満、40 nm 未満、50 nm 未満、100 nm 未満、150 nm 未満、200 nm 未満、250 nm 未満、または 500 nm 未満の範囲の長さを有する。

#### 【0136】

いくつかの実施形態では、アンカー物質は、金属コーティング圧電材料の表面上に単層を形成する。いくつかの実施形態では、アンカー物質は、金属コーティング圧電材料の表面上に自己組織化単分子層を形成する。一実施形態では、アンカー物質の結合タンパク質は、スペーサーを介して金属の表面から離れて延びている。

#### 【0137】

いくつかの実施形態では、圧電基材は、ニオブ酸リチウム（LiNbO<sub>3</sub>）、タンタル酸リチウム（LiTaO<sub>3</sub>）、二酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、およびホウケイ酸塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、金属コーティングは、アルミニウムまたはアルミニウム合金であってもよい。

#### 【0138】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のバイオセンサー部品は、ハウジングおよび流体チャンバをさらに備え、チャンバ壁は、アンカー物質および捕捉試薬を有するコーティング圧電基材の表面上に形成される。

#### 【0139】

バルク弾性波共振器

バルク弾性波（BAW）共振器は、2 つの電極の間に挟まれた少なくとも 1 つの圧電材料で構成されるデバイスである。電極は、圧電材料に交番電界を印加し、これにより応力が発生し、BAW 波が生成される。設計によっては、音響インピーダンスの高い層と低い

10

20

30

40

50

層を付加して、ブラッグ反射器を構築し、および/またはこれらの層を懸架する。B A W共振器には、複数の層、圧電基材（A l N、P Z T、水晶、L i N b O<sub>3</sub>、ランガサイトなど）、電極（金、アルミニウム、銅など）、ブラッグ反射器（高音響インピーダンスまたは低音響インピーダンス材料）、分析物を捕捉するための層（生物活性層、抗体、抗原、ガス感受性層、パラジウムなど）層、または弾性波を伝播することができる任意の材料を含めることができる。B A Wセンサーは、本明細書に記載の種々の層の混合物であり得る。感知層（分析物を捕捉する層）は、電極（A）と直接接触してもよく、またはブラッグ反射器上にあってもよく、または弾性波を伝播することができる任意の材料上にあってもよい。

#### 【0140】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のバイオセンサー部品を含むB A W共振器に関する。液体またはガスセンシング用のB A Wセンサーの構築は、B A Wセンサーの表面を通過するものはすべて、その共振周波数を変更するという原則に基づいている。共振周波数（測定または位相周波数）をトラッキングおよびデコードすることにより、センサーの表面に付着した粒子の質量負荷および粘度を測定することができる。

#### 【0141】

##### バイオコーティング法

いくつかの実施形態は、金属材料の表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第1の組成物を金属材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合タンパク質および少なくとも1つのチオール基を有する官能基を含む、ステップと；ビオチン化捕捉試薬を含む第2の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ビオチン化捕捉試薬は、結合タンパク質を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、を含む、プロセスに関する。

#### 【0142】

いくつかの実施形態は、結晶材料を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第1の組成物を結晶材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合タンパク質および少なくとも1つのチオール基を有する官能基を含む、ステップと、ビオチン化捕捉試薬を含む第2の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ビオチン化捕捉試薬は、結合タンパク質を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成するステップと、を含む、プロセスに関する。

#### 【0143】

いくつかの実施形態は、アルミニウム表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第1の組成物をアルミニウム表面に塗布して、アルミニウム表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合タンパク質およびチオール官能基を含む、ステップと；ビオチン化捕捉試薬を含む第2の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ビオチン化捕捉試薬は、結合タンパク質を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成するステップと、を含む、プロセスに関する。このプロセスは、結晶表面または誘電体材料の表面のコーティングにも使用することができる。

#### 【0144】

いくつかの実施形態は、金属コーティング圧電材料の表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、金属コーティング圧電材料の表面を処理して金属表面を活性化するステップと、アンカー物質の層を金属コーティング圧電基材の活性化表面に直接適用するステップと、を含む、プロセスに関する。アンカー物質は、アンカー物質の特異的結合パートナーを含むかまたは構成する捕捉試薬に結合する特性を有する。いくつかの実施形態では、アンカー物質は、シラン官能基を含む。シラン官能基は、金属コーティング圧電表面と反応することができる。いくつかの実施形態では、この方法は、圧電基材上に金属層を堆積させるステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、金属はアルミニ

10

20

30

40

50

ウムである。このプロセスは、結晶表面または誘電体材料の表面のコーティングにも使用することができる。

【0145】

いくつかの実施形態では、この方法は、共有結合により金属表面上に化学吸着したアンカー層を形成するステップを含む。

【0146】

いくつかの実施形態は、生体液試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、バイオセンサー部品を、捕捉試薬を含む組成物と接触させるステップであって、捕捉試薬は、アンカー物質に対する特異的結合パートナーを含むか、または構成し、また分析物を特異的に認識する、ステップと、捕捉試薬をアンカー物質に結合させ、捕捉試薬層を形成させ、一方で、結合させた捕捉試薬層を生体液試料と接触させるステップと、圧電表面にわたって/全体に弾性波を生成させるステップと、分析物が捕捉試薬層に結合した結果としての、波の振幅、位相、時間遅延、または周波数の変化を測定するステップ、を含む方法に関する。

10

【0147】

いくつかの実施形態は、金属材料の表面を生物活性フィルムでコーティングするプロセスであって、アンカー物質を含む第1の組成物を金属材料の表面に塗布して、表面上に単層を形成するステップであって、アンカー物質は、結合成分に連結したスパーサーを含む、ステップと、ビオチン化捕捉試薬を含む第2の組成物をアンカー物質の単層に塗布するステップであって、ビオチン化捕捉試薬は、アンカー物質の結合成分を介してアンカー物質に結合して、ビオチン化捕捉試薬の層を形成する、ステップと、を含む、プロセスに関する。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、アンカー物質の表面を活性化するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、アンカー物質の表面を活性化するステップは、プラズマ洗浄を含む。いくつかの実施形態では、プラズマ洗浄は、酸素または酸素/アルゴン混合物を使用して表面を処理するステップを含む。いくつかの実施形態では、プラズマ洗浄は、1～10分間、1～20分間、1～30分間、または1～60分間続く。いくつかの実施形態では、プラズマ洗浄は、1分、5分、10分、20分、30分、40分、50分、60分、1.5時間、2時間、3時間、または4時間より長く続く。いくつかの実施形態では、プラズマ洗浄は、5分、10分、20分、30分、40分、50分、60分、1.5時間、2時間、3時間、または4時間未満続く。いくつかの実施形態では、プラズマ洗浄は、50～150 KHz、50～200ワットでの処理を含む。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、直接コーティングである。いくつかの実施形態では、直接コーティングは、数時間ではなく数秒または数分で実行される単純で迅速なコーティング化学を含み、単層の物質を配置するために必要な精度と能力を備えた、インクジェット印刷などの、スケラブルで連続的な、最小限のオペレーターの介入で簡単に自動化されるインライン方式を使用して製造される。このコーティング方法は、リジェクトの数が少なく、有害廃棄物の発生量がより少ない。このコーティング方法は、材料の中間層なしで、圧電表面上にアンカー物質を直接堆積させる。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の調製方法は、圧電基材表面を洗浄するステップを含む。洗浄ステップは、酸処理、紫外線曝露、および反応性の高い種の生成を介して圧電基材の表面上のすべての有機汚染物質を実質的に除去することができるプラズマ処理の種々の方法を含むが、これらに限定されない複数の方法によって達成することができる。いくつかの実施形態では、調製方法は、プラズマ洗浄するステップを含む。

【0151】

コーティングバイオセンサーへの分析物の結合

いくつかの実施形態では、圧電基材表面上の結合アビジンは、目的の分析物を結合させ

50

るために、活性化を必要とする。活性化には、目的の分析物抗原に特異的な、抗体などのビオチン化バインダーが含まれる。抗体または他の薬剤は、アビジンコーティングチップに付着される前にビオチン化される。抗体は、アビジン基質に付着する前または後に分析物抗原に結合することができる。分析物ビオチン化抗体複合体は、センサーの外側で形成することができ、複合体をセンサーと接触させることができ、これにより、抗体上のビオチンがアビジンコーティングチップに結合する。2つの方法のどちらが好ましいかは、分析物および試料処理に依存する。両方法は、本開示の範囲内にある。チップ表面上のアビジンに結合した特定の抗体による表面コーティングの分析により、再びAFMを使用して6～9nmの深さを測定して、抗体が実際にアビジン層に結合していることが示された。

#### 【0152】

抗原特異的ビオチン化捕捉試薬を適用して、スクロース、トレハロース、グリセロールなどの当技術分野で既知のタンパク質安定剤も含む非乾燥媒体中で結合した過剰の遊離ビオチン化試薬からなる第2の層を形成する。多くの薬剤はビオチン化することができ、それらの中で最も一般的に使用されるのは、目的の分析物を特異的に認識するビオチン化抗体である。タンパク質捕捉試薬は、化学的にまたは酵素的にビオチン化することができる。化学的ビオチン化は、種々の既知のコンジュゲート化学を利用して、アミン、カルボキシレート、スルフヒドリル、および炭水化物の非特異的ビオチン化をもたらす。また、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)カップリングにより、タンパク質中の任意の第一級アミンがビオチン化されることが理解されている。酵素的ビオチン化は、細菌ビオチンリガーゼによる特定の配列内の特定のリジンのビオチン化をもたらす。ほとんどの化学的ビオチン化試薬は、リンカーを介してビオチンの吉草酸側鎖に結合した反応基で構成されている。酵素的ビオチン化は、ほとんどの場合、目的のタンパク質をそのN末端、C末端、または内部ループで、Aviタグ(AviTag)またはアクセプターペプチド(Acceptor Peptide)(AP)と呼ばれる15アミノ酸ペプチドに結合することによって実行される。これらのビオチン化技術は当技術分野において既知である。

#### 【0153】

一旦結合すると、捕捉試薬は短時間、加熱空気に曝露され、塗布された流体から水分が部分的に除去されて、保護および安定化ゲルを形成し、これにより、非乾燥ゲル層において抗体のような結合タンパク質性バインダーの長期安定性が確保され、このことにより、第2の抗原特異的バインダー層の本質的に完全な時間依存形成が可能になる。これらのガラス様層は、カートリッジのパウチ内のシリカまたはモレキュラーシーブの乾燥剤ペレットの存在下での保管のために任意に脱水される。カートリッジの上部チャンバは密閉されて、流体区画を形成する。次いで、上部チャンバを備えたカートリッジは、プラスチック製の保管パウチ内で、好ましくはN<sub>2</sub>雰囲気中で密閉される。

#### 【0154】

アンカー物質(アビジンなど)とビオチン化捕捉試薬との結合により、チップ上に第2の捕捉試薬層が形成される。使用前に、保護ゲル層において残っている未結合のビオチン化捕捉試薬およびその他の成分は、分析手順中にアッセイバッファーで、または試験体液でも簡単に洗い流すことで容易に除去することができる。これらのセンサーは、抗原、分析物の結合を検出し、バイオセンサーを使用して病気の検出をすることが実証されている。

#### 【0155】

本明細書に記載のバイオセンサーに、目的の分析物に特異的に結合する捕捉剤を含む適切なバイオフィルムコーティングを付与すると、様々な薬剤および生化学マーカーを検出するのに使用することができる。この統合バイオセンサーが可能な使用例には、ヒト診断および獣医の診断が含まれる。分析物は、感染性病原体中に存在する、または見出される、またはそれによって生成され、かつ検出に使用することができる任意の物質として定義され、これには、小分子、オリゴヌクレオチド、核酸、タンパク質、ペプチド、病原体断片、溶解病原体、およびIgA、IgG、IgM、IgEを含む抗体、酵素、酵素補因子、酵素阻害剤、毒素、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン

10

20

30

40

50



、多糖、アプタマー、およびキレート剤が含まれるが、これらに限定されない。抗原抗体相互作用の検出は以前に記載されている（米国特許第4,236,893号明細書、第4,242,096号明細書、および第4,314,821号明細書、これらはすべて参照により本明細書に明示的に組み込まれる）。さらに、全細胞（病原菌などの原核細胞、真核細胞、哺乳類腫瘍細胞を含む）、ウイルス（レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなどを含む）、真菌、寄生生物、および芽胞（血清型（sero vars）または血清型（serotypes）などの感染因子の表現型の変形形態を含む）の検出は、本開示の範囲内である。

#### 【0156】

いくつかの実施形態は、試料中の分析物の存在または量を判定する方法であって、バイオセンサー部品を試料と接触させるステップと；弾性波を生成させるステップと；分析物が捕捉試薬に結合した結果としての、弾性波の振幅、位相または周波数の変化を測定するステップと、を含む方法に関する。

10

#### 【0157】

いくつかの実施形態では、試料は、環境試料または生体試料である。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、血清、血漿、尿、痰、または糞便である。

#### 【0158】

いくつかの実施形態では、金属でコーティングされた基材は圧電基材である。いくつかの実施形態では、弾性波は、約10～3000MHzの入力周波数を有する。いくつかの実施形態では、弾性波は、約1～10000、1～8000、1～6000、1～5000、1～4000、1～3000、1～2000、1～1000、10～8000、10～6000、10～5000、10～3000、10～2000、10～1000、50～8000、50～6000、50～5000、50～3000、50～2000、50～1000、100～8000、100～6000、100～5000、100～3000、100～2000、100～1000、200～8000、200～6000、200～5000、200～3000、200～2000、200～1000MHzの範囲の入力周波数を有する。いくつかの実施形態では、弾性波は、約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100MHz超の入力周波数を有する。いくつかの実施形態では、弾性波は、約500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000MHz未満の入力周波数を有する。

20

30

#### 【0159】

本明細書にて開示された実施形態は、上記にて開示された2つのセンサークラスのそれぞれに見出される独立した利点の組合せを示す個々の要素およびセンサーを提供する。例えば、チオール官能基を有するアンカー物質を使用して圧電基材に結合する第1の実施形態は、スパーサーを有するアンカー物質の実施形態と組み合わせることができる。

#### 【0160】

アンカー剤のコーティング密度を改善するための3D表面

多くのセンサー設計は、機能する酵素ヒドロゲルマトリックスなどの1つのマトリックス（または複数のマトリックス）を利用する。「マトリックス」という用語は、その内部でまたはそこから何か他のものが発生する、発達する、形成される、および/または発見されるもの、という、当技術分野で受け入れられている意味に従って、本明細書で使用される。例示的な酵素ヒドロゲルマトリックスは、典型的には、バイオセンシング酵素（例えば、グルコースオキシダーゼまたは乳酸オキシダーゼ）、およびグルタルアルデヒドなどの架橋剤で架橋されてポリマーネットワークを形成したヒト血清アルブミンタンパク質を含む。次に、このネットワークを水溶液で膨潤させて、酵素ヒドロゲルマトリックスを形成する。このヒドロゲルの膨潤の程度は、数週間の期間にわたって頻繁に増大し、これはおそらくネットワーク架橋の分解による。その原因に関係なく、観察されたこの膨張の結果は、細孔の外側のヒドロゲルの突出または外側のセンサーチューブに切開された「窓」である。これにより、センサーの寸法が設計仕様を超え、分析性能に悪影響を及ぼす。

40

50

## 【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態は、複数の異なるマイクロパターンを利用して、標的分析物（例えば、細胞またはウイルス粒子の表面上に遊離したまたは発現した抗原）へのコンジュゲートに有効な結合部分（例えば、抗体）の立体配置を損なうことなく結合した固定化捕捉試薬の有効表面積を増加させることに関する。センサーの性能を決定するには、結合した分析物（抗原など）の表面密度が非常に重要であるため、標的分析物の拡散輸送が可能になり、捕捉試薬（例えば、ビオチンコンジュゲート抗体）が結合するアンカー物質（例えば、アビジン分子）上の結合部分のサイズに対応する、比較的オープンな三次元マトリックス微細構造を確保する必要がある。いくつかの実施形態は、ウイルスおよび細菌を含む、インタクトな病原体種を検出することに関するものであり、この検出には、捕捉試薬（例えば、活性化ビオチン分子）を含むマトリックスを介してこれらの種の輸送を可能にするために、この三次元（3D）マトリックスを通る幅約0.05ミクロン～約10ミクロンの通路を要する。

10

## 【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態は、強化された材料特性を有するバイオセンサー要素およびそのような要素から構築されたバイオセンサーに関する。本開示はさらに、そのようなセンサーを作製および使用する方法を提供する。いくつかの実施形態は弾性波センサーに関するが、本明細書にて開示される様々な要素（例えば、圧電基材および3Dマトリックス微細構造設計）は、当技術分野において既知の多種多様なセンサーのいずれか1つを用いた使用に適合させることができる。本明細書にて開示される分析物センサー要素、構造、およびこれらの要素を作製および使用するための方法を使用して、種々の層状センサー構造を確立することができる。このようなセンサーは、驚くべき感度および精度を示す。また、センサーは高度な柔軟性、汎用性、および特性を有し、このことによって多種多様なセンサー構成を設計して、多種多様な分析種を調べることができる。

20

## 【 0 1 6 3 】

従来のSAWセンサーと比較して、本明細書に記載のバイオセンサーの感度は、低濃度の生物学的分析物の検出に、およびまた生体液中の感染粒子の数が少ない可能性のある細菌またはウイルス感染の検出に十分である。さらに、本明細書に記載のセンサーは、生体液の体積も制限される状況でも十分な感度を有する。

## 【 0 1 6 4 】

本明細書に記載の検出および定量化方法は、ピコモル範囲の生物学的分析物を検出するのに十分な感度を有し得、生体液中の感染粒子の数が少ない（すなわち、 $< 10$  粒子/mL）可能性のある細菌感染またはウイルス感染の検出にも十分な感度を有し得る。加えて、本明細書に記載の検出方法は、その増強された感度によって、生体液の体積も制限されている場合（例えば、10～250マイクロリットル）にも使用することができる。

30

## 【 0 1 6 5 】

3Dマトリックス微細構造には、3Dゲルまたはナノ構造表面を含めることができ、3D超分子アーキテクチャを利用することができ、3Dマトリックス微細構造をバイオセンサーに統合して、有効表面積とバイオセンサーの表面に固定化される捕捉剤の数を増やすことができる。デンドリマーは分岐構造で3D空間に高密度の官能基を提供するため、種々のデンドリマーを使用して3Dマトリックス微細構造を作製することができる。周辺官能基は、センサー表面上での抗原/抗体のコンジュゲートを促進する。デンドリマーは、それらの分岐構造により、抗原と抗体との結合の立体障害も低減させ、したがって標的分子の捕捉が促進される。ポリアミドアミン（PAMAM）および/またはポリプロピレンイミン（PPI）デンドリマーを使用して、圧電基材の表面をコーティングすることができる。デンドリマーは、共有結合または非共有結合のいずれかで、圧電基材の表面上にコーティングすることができる。シアリル化法（Sialinization）を使用して、アミノシラン、シアノシラン、エポキシシランなどを使用して圧電表面を官能化することができる。デンドリマーは、官能化表面弾性表面と共有結合によりコンジュゲートすることができる。デンドリマー層の高さは、5～20nmの間であり得る。次に、抗体、抗体断片、単一

40

50

ドメイン抗体、小分子、DNAまたは抗原をデンドリマー表面の周辺に固定化して、標的分子を捕捉することができる。

【0166】

三次元マトリックス微細構造の作製方法

リソグラフィ技術を使用して、圧電基材上に3Dマトリックス微細構造を形成することができる。フォトマスクおよびモールドを使用して、光重合プロセス中に微細パターンを形成することができる。リソグラフィプロセス後、アンカー物質を微細構造に付着させることができる。アンカー物質を3Dマトリックス微細構造に付着させた後、次に捕捉試薬をアンカー物質に連結させることにより、微細構造に固定化させることができる。

【0167】

いくつかの実施形態は、圧電基材上に3Dマトリックス微細構造を形成する方法に関し、前記方法は、懸濁液を前記圧電基材に塗布して懸濁液層を形成するステップと、フォトマスクを前記懸濁液層に適用するステップと、前記フォトマスクを紫外線光源に曝露し、これにより前記フォトマスクによって覆われていない前記懸濁液層の前記部分を反応させるステップと、前記基材から未反応の懸濁液層を除去し、前記3Dマトリックス微細構造が前記基材上に形成される、ステップを含む。

【0168】

いくつかの実施形態は、圧電基材上に3Dマトリックス微細構造を形成する方法に関し、前記方法は、前記圧電基材上に、少なくとも1つのマイクロチャネルを含むマイクロ流体ネットワークを形成するステップと、前記マイクロチャネルをヒドロゲル前駆体溶液で満たすステップと、前記ヒドロゲル前駆体を紫外線光源に曝露するステップと、前記マイクロ流体ネットワークを前記圧電基材から除去して、前記基材上に配置された前記三次元ヒドロゲル微細構造を残す、ステップを含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、前記懸濁液層の一部は、前記フォトマスクで覆われていない。

【0170】

いくつかの実施形態では、前記懸濁液は、スピンコーティングにより前記基材に塗布される。

【0171】

いくつかの実施形態では、前記懸濁液は、マイクロ流体チャネル内を流れることにより、前記基材に塗布される。

【0172】

いくつかの実施形態では、前記未反応の懸濁液層は、前記懸濁液層を溶媒中に溶解させることにより、前記基材から除去し、溶媒は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水または有機溶媒であり得る。いくつかの実施形態では、前記未反応の懸濁液層は、洗浄により、前記圧電基材から除去する。

【0173】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、3Dマトリックス微細構造を、結合試薬を含む溶液に曝露するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、結合試薬はビオチンである。

【0174】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、3Dマトリックス微細構造をアンカー物質の溶液に曝露するステップをさらに含み、3Dマトリックス微細構造は、結合試薬を含み、3Dマトリックス微細構造は、結合試薬を介してアンカー物質に付着する。

【0175】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、アンカー物質を3Dマトリックス微細構造に付着させた後、3Dマトリックス微細構造を捕捉剤の溶液に曝露するステップをさらに含む。

【0176】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態は、圧電基材上に３Ｄマトリックス微細構造を形成して、圧電基材の表面積を増加させるステップと、圧電基材上に１つまたは複数の捕捉試薬を固定化するステップと、を含む、バイオセンサー部品を作製する方法に関する。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、圧電基材上に細孔を形成するステップをさらに含む。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスを形成するステップをさらに含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイを形成するステップをさらに含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、圧電基材上にヒドロゲルマトリックスの層を形成するステップをさらに含む。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、複数の細孔を含むヒドロゲルマトリックスをさらに含む。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、リソグラフィ印刷を使用して圧電基材上に捕捉試薬のマイクロアレイを形成するステップをさらに含む。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製方法は、レーザーを使用して細孔を形成するステップを含む。いくつかの実施形態では、レーザーは、ピコ秒またはフェムト秒パルスレーザーである。

【０１８４】

[実施例１]

センサー表面に直接付着する第１の層として、チオール化ニュートラアビジンを使用した。図１は、チオール化生物学的捕捉試薬を使用した非変性アルミニウム表面のバイオコーティングを示す。例としてアルミニウムを提供したが、結晶上でも使用することができる。付着は、チオール化学に基づいていた。チオールは金表面に対して高い結合活性を有し、安定な共有結合を形成する。図２Ａは、チオール化ニュートラアビジンもアルミニウムに対して高い結合活性を示し、結晶に対し、アルミニウムへ予期せずに優先的に結合することを示している。チオール化ニュートラアビジンのアルミニウム金属への優先的結合を使用して、センサー上に任意の目的の領域を選択的に作製することができる。捕捉剤は、チオール化ニュートラアビジンであり得、アプタマー、ヌクレオチド、および抗体を含む任意のチオール化捕捉剤で置き換えることもできる。本明細書に記載の方法は、チタンなどの、弾性波の伝達に使用される他の材料に使用することができる。

【０１８５】

ｄｄ $H_2O$ に１０～０．０１ｍｇ／ｍＬのニュートラアビジンを含む低マイクロリットル範囲の少量の液体を、センサー領域の標的表面上に塗布し、結晶またはアルミニウム表面の条件に基づいて、数分から数時間まで変化する一定時間、空気乾燥させた。その後、過剰の非吸収ニュートラアビジンを、完全に洗い流した。図２Ａは、光学アッセイ法を使用して、表面コーティングニュートラアビジンとチオール化ニュートラアビジンそれぞれに対する、ビオチン化酵素プローブの結合を比較している。データは、チオール化ニュートラアビジンのアルミニウムへの吸収が、結晶表面への吸収よりも約６倍大きく、また（非チオール化）ニュートラアビジンの吸収よりも大きかったことを示す。

【０１８６】

図２Ａ～図２Ｃは、アルミニウム表面へのニュートラアビジン（ＮＡｖ）の優先的な結合を示す。図２Ａは、ビオチン化ＨＲＰ／ $\alpha$ -フェニレンジアミン二塩酸塩（ＯＰＤ）ペ

10

20

30

40

50

アを使用した酵素アッセイの結果を示す。Blank LTは、タンタル酸リチウムの結晶表面を表す。417nmでの吸光度の強度は、センサーの表面に結合したニュートラアビジンの量に比例した。アルミニウムまたは結晶の表面上の結合ニュートラアビジンの量は、チオール化ニュートラアビジンを使用した場合に大幅に増加した。図2Bは、表面ニュートラアビジンに結合したビオチン化フルオレセイン分子の顕微鏡ベースの画像を示し(倍率500倍)、図2Cは、0.2μmポリスチレンビオチン化蛍光ビーズの結合を示す(倍率500倍)。ビオチン化フルオレセインおよびポリスチレン蛍光ビーズを使用したSAWセンサー上の表面結合蛍光の存在により、表面ニュートラアビジンバイオコーティングが機能的に活性であることを確認した。

【0187】

#### [実施例2]

アルミニウムまたは結晶の表面を、最初にプラズマ洗浄(数分~数時間)によって活性化させた。センサー表面をプラズマ洗浄に曝露することにより、官能基が生成され、これらは、水接触角を評価することにより容易に測定することができる。活性化表面に、試薬をその後付着させるには、90°よりかなり小さい接触角が最適であった。活性化表面を、後でチオール化ニュートラアビジンに曝露し、表面に層を形成させた。コーティング後、センサーを洗浄して、活性化アルミニウム表面または結晶表面から過剰なチオール化ニュートラアビジンを除去した。次に、コーティングデバイスを乾燥させた。

【0188】

#### [実施例3]

図3は、標的分析物を選択的に捕捉するためのニュートラアビジンによるバイオコーティング開発の概略図を示す。アルミニウムまたは結晶の表面を、最初にプラズマ洗浄(数分~数時間)によって活性化させた。センサーをプラズマ洗浄に曝露することにより、官能基が生成され、これらは、水接触角を評価することにより容易に測定することができる。活性化表面に、試薬をその後付着させるには、90°よりかなり小さい接触角が最適であった。図4Aおよび図4Bは、センサー上の水の接触角測定を示す。図4Aは、接触角の大幅な減少をもたらすプラズマ洗浄を示し、図4Bは、PEG-シランでコーティングすると、センサーの疎水性が著しく増加したことを示す。

【0189】

続いて、活性化表面を、種々の長さのPEG化合物に付着したシラン(スパーサー)でコーティングし、ビオチンをスパーサーの上部に共有結合により付着させた。PEGの濃度は、単層を確保するために重要であり、使用する反応条件に依存していた。コーティング後、センサーを洗浄して、活性化アルミニウム表面から過剰な未吸収のPEG-ビオチンを除去した。次に、コーティングデバイスを乾燥させた。次に、PEG-ビオチンコーティングの一体性を、水接触角測定で確認した。PEGスパーサーの長さは、分子量100~2000の間であり得、目的の特定の結合剤に合わせて調整し得る。

【0190】

図5Aおよび図5Bは、ビオチン化フルオレセインの蛍光画像、および蛍光ポリスチレンビーズの蛍光画像を示す。図5Aはビオチン化フルオレセイン(倍率50倍)であり、図5Bは蛍光ポリスチレンビーズ(倍率500倍)であり、表面バイオコーティングへの均一な結合を示す。図5Aおよび図5Bは、ビオチン化ポリスチレンビーズがセンサーの活性化表面に接着し、得られた表面ニュートラアビジンが完全に機能していたことを示す。同様に、ビオチン化抗体またはそれらの断片、アプタマーなどを含む任意のビオチン化物質を、バイオコーティング上に作製することができる。示されている例では、ビオチン化フルオレセインを、表面結合ニュートラアビジンのプローブとして使用した。表面上のすべてのニュートラアビジン結合部位が、例えばビオチン化抗体によって取られた条件下では、バイオコーティング上に後続のビオチン化フルオレセインの付加を観察することはできない(データは示していない)。データは、コーティングが標的分析物の捕捉に好適であったことを示している。したがって、分析物のセンサー表面への結合によって、SAW技術を使用して定量的に検出することができるセンサー表面上の微小粘度および質量負

10

20

30

40

50

荷における変化がもたらされるであろう。

【0191】

[実施例4]

この例には、表面活性化および誘導体化に続くアルミニウムおよび/または結晶のバイオコーティングのプロセスが含まれる。短いNH<sub>2</sub>またはエポキシスペーサーを介した、表面への生物学的捕捉剤(抗体など)の直接共有結合。

【0192】

図6は、標的分析物を選択的に捕捉するためのバイオコーティング開発(ニュートラアビジンなし)を示す。センサー表面に付着した抗体または他の分析物捕捉分子に直接結合することができる、スペーサー(例えば、PEGまたは炭水化物鎖)に付着した官能基を使用した。この直接的なアプローチは、ニュートラアビジンの使用を回避し、それにより、二分子層の全体の厚さおよび関連するプロセスステップの数が削減された。短いスペーサー(2~20nm長のPEGまたは炭水化物鎖)を有するN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、スルホ-NHS、マレイミド、-COOHまたは-NH<sub>2</sub>または3-グリシドキシプロピル(エポキシ)官能基のいずれかを選択することができる。各場合において、スペーサーで分離された官能基を結合するアンカー分子としてシランを使用した。官能化スペーサーは、捕捉分子(例えば、抗体)と反応し、高密度および立体障害の減少をもたらした。センサーのアルミニウム表面または結晶表面を、プラズマ洗浄によって活性化させた。次に、シラン分子(5~10%濃度-重量/体積)をセンサー表面に塗布し、インキュベートさせた(数分~数時間)。過剰なシランを溶媒で洗い流した。NHS官能化のために、抗体/タンパク質(1~10ug)をセンサーに直接塗布し、室温でインキュベートした。NHSまたはエポキシのいずれかの官能化に続いて、蛍光分析物を付加して、表面のバイオコーティングの官能性を確認することができる。

10

20

【0193】

図7Aおよび図7Bは、エポキシスペーサーを介して固定化された表面バイオコーティングに結合した蛍光分析物を示す。図7Aは対照(500倍)であり、図7Bはエポキシコーティングセンサー(500倍)である。

【0194】

[実施例5]

圧電基材における三次元マトリックスは、表面に細孔を開けて捕捉剤のためのより大きな領域を露出することにより形成することができ、この構造は圧電基材の活性化領域の増加に役立つ。各細孔の深さが増すと、細孔ごとに分析物に曝露されるアビジンの面積が増加するため、細孔はできるだけ深いことが好ましい。しかし、各細孔の深さが増すと、細孔のアスペクト比も増加し、このことにより分析物が細孔の底まで拡散しにくくなる場合がある。10(h/R)より大きいアスペクト比は、分析物が細孔の全領域を覆うのに必要な時間を過度に増加させ、機器の応答時間を引き起こすため、好ましくない。10(h/R)以下のアスペクト比が好ましい。捕捉剤でコーティングされた圧電基材の面積が100mm<sup>2</sup>で、圧電基材に直径20ミクロン、深さ100ミクロンの細孔を付加する場合、接触面積は1細孔あたり6280ミクロン<sup>2</sup>増加する。したがって、総接触面積を2倍にするには1.6×10<sup>4</sup>個の細孔が必要であり、接触面積を10<sup>3</sup>倍増やすのに必要な細孔の数は1.6×10<sup>7</sup>個である。1.6×10<sup>7</sup>個の細孔が占める表面積は50平方ミリメートルである。したがって、細孔の面積密度は50%であり、ピコ秒パルスレーザーのスキャンによりかなり達成可能である。10<sup>3</sup>を超える表面積の増加には、より大きな直径の細孔が好ましい。例えば、接触面積を2倍にする直径100ミクロン、深さ500ミクロンの細孔の数は、1.3×10<sup>2</sup>個であり、1.04mm<sup>2</sup>の総表面積を包含する。

30

40

【0195】

図8Aおよび図8Bは、1.04μmで動作するピコ秒レーザーシステムによって穿孔されたヒドロゲルマトリックス内の正弦波構造のSEM画像および接触角を示す。図8Aは、周期性が25μm、高さが12μmの正弦波構造を示し、図8Bは、周期性が35μm

50

、高さが45  $\mu\text{m}$ の正弦波構造を示す。親水性架橋マトリックスのこれらの寸法の細孔は、ピコ秒またはフェムト秒パルスレーザーを使用して穿孔することが好ましい。

【0196】

[実施例6]

ビオチンストレプトアビジン複合体のマイクロアレイは、圧電基材上に固定化されている。好ましくは、各ドットは10~25ミクロンの直径を有し得、5~20ミクロンの高さを有し得る。好ましくは、従来のタンパク質マイクロアレイ技術を使用して、25~50%の表面充填密度を達成することができる。タンパク質マイクロアレイは、ストレプトアビジンおよびビオチンを含むタンパク質の吸着に対して非常に不活性なコーティング材料としてポリエチレングリコール(PEG)を使用して、簡便に作製される。フォトリソグラフィ技術を使用して、PEGコーティングをパターン化し、ビオチンを付着させ、次いでビオチンをストレプトアビジンに複合体化させ、その後抗体と複合体化したビオチンを結合させる。

【0197】

[実施例7]

ヒドロゲルマトリックスは、PEGなどの水溶性不活性希釈剤を組み込んだ親水性モノマー配合物の重合および架橋により形成する。ヒドロゲルマトリックスは、圧電基材上にモノマー配合物の層を付加し、次にモノマー層を紫外線に曝露してそこで光開始剤を活性化し、重合および架橋を行うことにより形成することができる。次に、ヒドロゲルマトリックスを、マトリックスの厚さ、その親水性(平衡含水率)、および処理温度に応じて、数分から数時間脱イオン水またはPBSに浸漬させる。この処理により、希釈剤が除去され、マイクロキャビティを導入する水に置き換えられ、自由容積が強化されて、マトリックスに付着したタンパク質分子のセグメントの局所的な移動性が可能になる。次に、ヒドロゲルマトリックスにビオチンを結合させるために、ビオチンの溶液(すなわち、リン酸緩衝生理食塩水に溶解したNH<sub>4</sub>SCN-ビオチン)でマトリックスを溶出させる。次に、ヒドロゲルマトリックスをストレプトアビジンの溶液でさらに溶出し、ストレプトアビジンを、結合したビオチンに結合させる。次に、機能化されたヒドロゲルマトリックスは、特定の病原体または他の生物剤を標的とする抗体とコンジュゲートしたビオチンで活性化される状態になっている。

【0198】

[実施例8]

実施例5~7に記載されている微細パターンおよび3Dマトリックスはすべて、圧電基材上でソフトリソグラフィプロセスを使用して調製することができる。図9に示すように、このアプローチは、特に自動化に適している。図9に示すマイクロパターン/ナノパターンの作製のためのソフトリソグラフィプロセスでは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)製のモールドを利用することができる。

【0199】

[実施例9]

ヒドロゲルマトリックスのマイクロアレイはまた、実施例7に記載された重合ステップおよび架橋ステップに従って調製することができる。ヒドロゲルマトリックスのこのマイクロアレイは、上記の実施例に記載された手順を使用して機能化することもできる。

【0200】

[実施例10]

ヒドロゲルマトリックスは、層を形成するために調製することができる。ヒドロゲルマトリックスは、ポリビニルアルコールまたはポリ酢酸ビニルなどの水溶性ポリマーの小粒子を含む配合物から形成される。マトリックスが形成されると、希釈剤を除去するために、もしあれば粒子も溶解させるために、水または生理食塩水で洗浄する。粒子は、 $10^2$ ~ $10^6$ ミクロン<sup>3</sup>の範囲の特定の容積空間を残し、ランダムにかつ均一にマトリックス内に分布する。最大 $10^6$ 個の粒子を、1mLのモノマー配合物に充填することができる。それにより形成された各マイクロキャビティにより、アビジン分子に結合したビオチン

上に存在する抗体部位へのアクセスが可能になる。

【0201】

[実施例11]

デンドリマー（例えば、PMMA、PPI、またはそれらの組合せ）を調製して、層を形成することができる。デンドリマーは、官能基を含むように形成することができる。マトリックスが形成されると、希釈剤を除去するために、もしあれば粒子も溶解させるために、水または生理食塩水で洗浄する。粒子は、 $10^2 \sim 10^6$  ミクロン<sup>3</sup>の範囲の特定の容積空間を残し、ランダムにかつ均一にマトリックス内に分布する。最大 $10^6$ 個の粒子を、1 mLのモノマー配合物に充填することができる。それにより形成された各マイクロキャビティにより、アビジン分子に結合したビオチン上に存在する抗体部位へのアクセスが可能になる。

10

【図1】

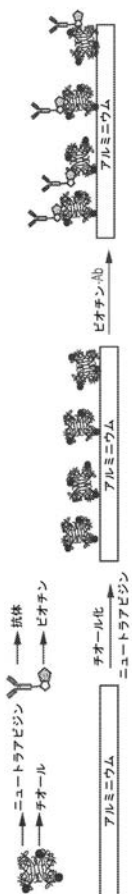


図1

【図2】

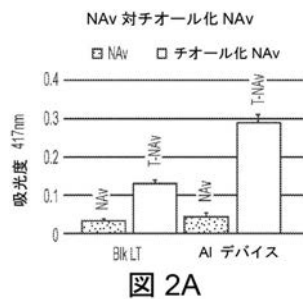


図2A

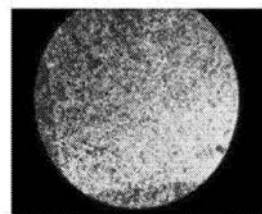


図2B

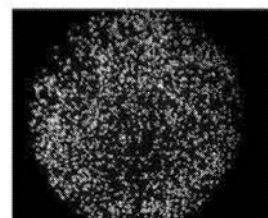


図2C



【 図 3 】

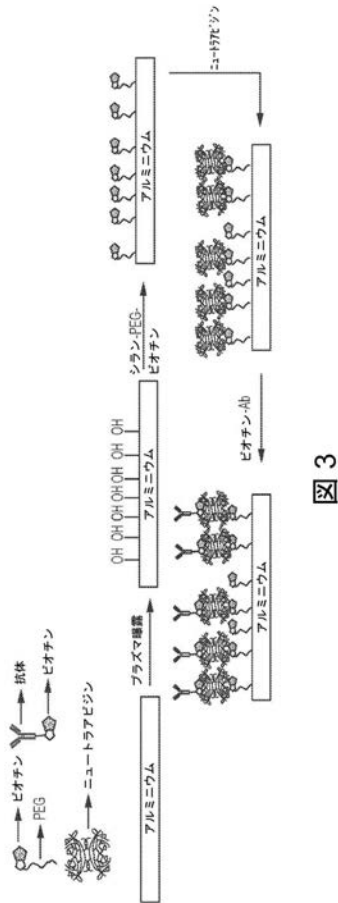


図 3

【 図 4 】

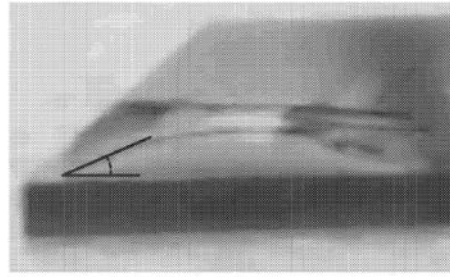


図 4A

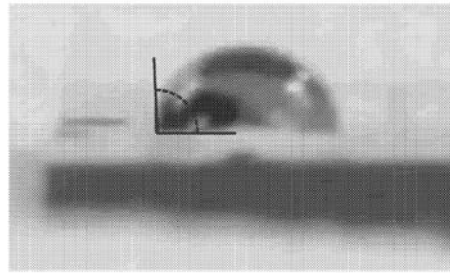


図 4B

【 図 5 】

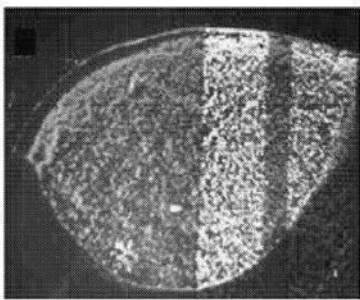


図 5A

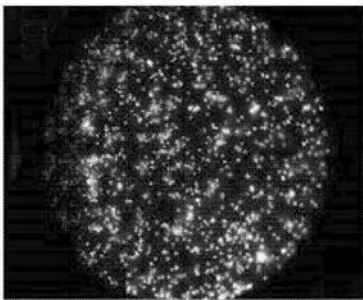


図 5B

【 図 6 】

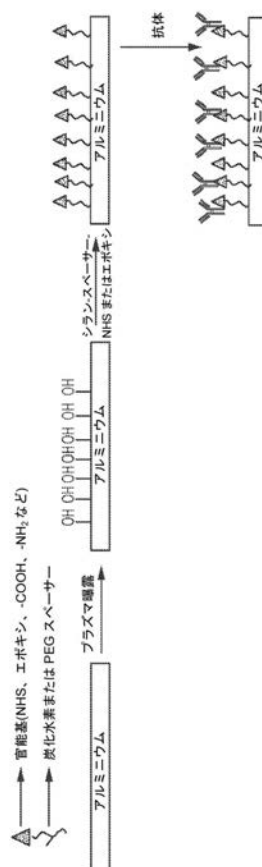


図 6

【 図 7 】

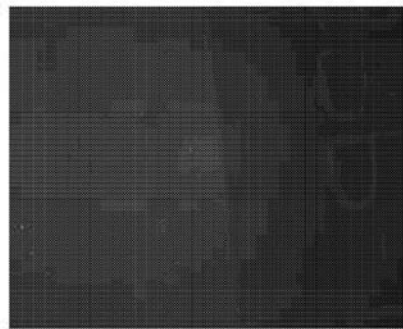


図 7A

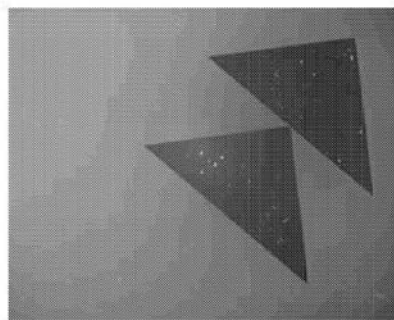


図 7B

【 図 8 】

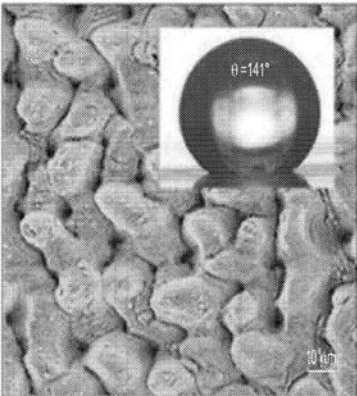


図 8A

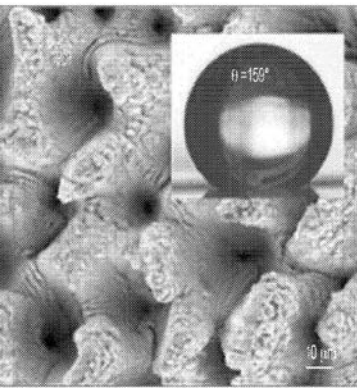


図 8B

【 図 9 】

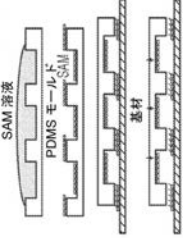
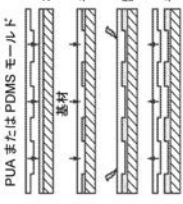
コンタクトプリンティング(ref.38、39)		キャピラリーモールドディング(ref.40~43)
モールド	ソフトモールド ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS) ハード PDMS(h-PDMS)	ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS) リジッドフレキシブルモールド(PUA)
解像度	~500 nm	~50nm PUA モールドによる
用途	1.チャネル作製 2.生体分子の直接印刷 (1D 化学改変)	1.チャネル作製 2.マイクロナノ構造の作製 (2D 構造)
プロセス		
	<p>SAM 溶液</p> <p>PDMS モールド</p> <p>溶媒の乾燥</p> <p>モールドに接触</p> <p>モールド除去</p> <p>基材</p>	<p>PUA または PDMS モールド</p> <p>基材</p> <p>ポリマーコーティング</p> <p>モールド配置</p> <p>熱または UV</p> <p>モールド除去</p>

図 9

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US18/40887

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - G01N 27/327, 33/48, 33/487, 33/50, 33/53, 33/543, 33/566; G01R 29/22 (2018.01)  
CPC - A61B 5/68; G01N 27/3275, 33/48, 33/48707, 33/50, 33/53, 33/54306, 33/566; G01R 29/22

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)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2015/0111765 A1 (LISA, LAURY-KLEINTOP et al.) 23 April 2015; abstract; paragraphs [0010], [0011], [0013], [0025], [0036], [0037], [0045], [0047], [0049], [0062], [0065], [0073], [0076], [0082], [0088]; Figures 1, 2A and 2B	1-2, 20, 22-24, 25/22-24, 26-27, 48, 50-52, 72-73, 74/72-73, 78  3/1-2, 57/50-52, 79
Y	WO 2016/048257 A1 (BOGAZICI UNIVERSITESI) 31 March 2016; abstract	3/1-2
Y	US 2009/0317442 A1 (BANISTER, M et al.) 24 December 2009; paragraphs [0010], [0020], [0028]	57/50-52, 79

☐ 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

"g" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 2018 (27.08.2018)

Date of mailing of the international search report

11 SEP 2018

Name and mailing address of the ISA/

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40887

**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.: 4-19, 21, 28-47, 49, 53-56, 58-71, 75-77, 80-83  
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:

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

**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.

## 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 33/543	5 9 3
	G 0 1 N 29/02	5 0 1

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ダス, ソウメン  
アメリカ合衆国 3 2 8 2 6 フロリダ州, オーランド, ソロン ドライブ 1 2 0 0 1, アパートメント 2 0 2

(72)発明者 ハムリン, ジョン マーティン  
アメリカ合衆国 2 1 0 4 4 メリーランド州, コロンビア, ハイ ウィールズ コート 5 3 1 9

(72)発明者 グプタ, アミタバ  
アメリカ合衆国 2 4 0 1 8 バージニア州, ロアノーク, フォックス デン ロード 5 3 2 2  
Fターム(参考) 2G047 AC13 CA01 CB03