(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
2022年3月31日(31.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/064960 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/031621

(22) 国際出願日： 2021年8月27日(27.08.2021)

(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 2020-159008 2020年9月23日(23.09.2020) JP
PCT/JP2021/007726 2021年3月1日(01.03.2021) 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: 山本 秀策，外(**YAMAMOTO, Shusaku** et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町３－１ グランフロント大阪 タワーC 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：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2022/064960 A1

(54) **Title:** BASE MATERIAL FOR MANUFACTURING SENSOR FOR ANALYZING DETECTION OBJECT, SENSOR FOR ANALYZING DETECTION OBJECT, AND METHOD FOR ANALYZING DETECTION OBJECT

(54) 発明の名称： 検出対象の分析用センサ作製用基材、検出対象の分析用センサ、及び検出対象の分析法

(57) **Abstract:** The present disclosure provides a biosensor having improved sensitivity. The present disclosure also provides a base material for manufacturing a sensor for analyzing a detection object, said base material comprising a molecularly imprinted polymer having: a molecularly imprinted recess in which a target of the detection object is received; and a group for binding a specific bondable molecule to the target, said group being provided inside the molecularly imprinted recess. The base material is characterized in that the group for binding the specific bondable molecule is a group suited for a small substance, and/or is characterized in that the molecularly imprinted recess has a shape or structure suited for a small substance.

(57) 要約：本開示は、感度が向上したバイオセンサを提供する。本開示はまた、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する特異的結合性分子の結合用基とを有する分子インプリントポリマーを含み；前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基であるであることを特徴とし、ならびに／あるいは、分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有することを特徴とする、検出対象の分析用センサ作製用基材を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

検出対象の分析用センサ作製用基材、検出対象の分析用センサ、及び検出対象の分析法

技術分野

[0001] 本開示は、検出対象を基材上で感度良く検出する技術に関する。より具体的には、本開示は、検出対象の分析用センサ作製用基材及びその製造方法、検出対象の分析用センサ及びその製造方法、並びに検出対象の分析法に関する。

背景技術

[0002] エクソソーム等の小型細胞外小胞（Small Extracellular Vesicles；ｓＥＶｓ）は細胞から放出される小胞体の一つであり、直径２０～２００ｎｍの脂質二重膜小胞である。小型細胞外小胞は、その内部にタンパク質、及びｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡなどの核酸を内包するとともに、その表面にもタンパク質を有している。小型細胞外小胞はこのような物質に特徴づけられているため、小型細胞外小胞の特徴を解析することで、分泌した細胞がどのような細胞であるかを推測できると考えられている。また、小型細胞外小胞は様々な体液中で存在が確認されており、比較的容易に採取することができる。

[0003] 癌細胞から分泌される小型細胞外小胞は腫瘍由来の物質を含んでいる。したがって、体液中の小型細胞外小胞に含まれる物質を解析することで癌の診断を行うことができると期待されている。さらに、小型細胞外小胞は細胞によって能動的に分泌されるものであることから、がんの早期段階であっても何らかの特徴を呈していることが予想されている。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者は、分子インプリント技術により形成された穴を有するポリマー（分子インプリントポリマー：ＭＩＰ）を含み、当該穴の中に選択的に抗体

が導入されているバイオセンサにおいて、敢えて、抗体の代わりに小型物質を導入したところ、当該小型物質の生来的な結合能（以下において、「結合能」とは、親和性（ａｆｆｉｎｉｔｙ）を意味する。）が低いにも関わらず、標的当たりの結合能が、抗体を導入した場合を凌駕する驚くべきレベルに高められることを見出した。本開示は、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。

[0005] 本開示は、検出対象の分析用センサ作製用基材及びその製造方法、検出対象の分析用センサ及びその製造方法、並びに検出対象の分析法を含む。例えば、本開示は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

[0006] 本開示は、バイオセンサに用いられる抗体が、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ところ、その感度の改善を提供する。

[0007] 本開示は、感度が向上したバイオセンサを提供する。

(項目１)

検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、

前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する結合性分子の結合用基と

を有する分子インプリントポリマーを含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、

検出対象の分析用センサ作製用基材。

(項目２)

検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、

前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する結合性分子の結合用基と

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凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目３）

前記分子インプリント凹部内に、更にシグナル物質の結合用基を有する、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

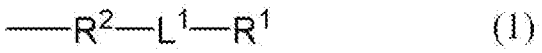
（項目４）

前記分子インプリント凹部表面において、前記結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が互いに独立している、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目５）

前記分子インプリント凹部内において、前記結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が、下記式（１）で示される機能性基を構成している、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化1]



(1)

［R^1は前記結合性分子の結合用基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表し、R^2は前記シグナル物質の結合用基を含む連結基を表す。］

（項目６）

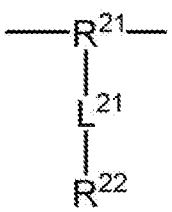
前記シグナル物質の結合用基を含む連結基が、下記式（２）又は（３）で示される、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化2]



(2)

[化3]



(3)

［R^3は、水素、若しくは、ポリアルキレングリコール鎖を含んでよい炭素数１～８のアルキル基を表し、R^{21}は窒素原子又は炭化水素を表し、L^{21}は直接結合又は連結基を表し、R^{22}は前記シグナル物質の結合用基を表す。］

(項目７)

前記結合性分子の結合用基が、アミノ基、カルボキシ基、ボロン酸基、cis-ジオール基、アルデヒド基、ケトン基、オキシアミノ基、ヒドラジド基、ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、およびピリジルジスルフィド基からなる群から選択される基である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

(項目８)

前記結合性分子の結合用基が、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、およびピリジルジスルフィド基からなる群から選択される基である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

(項目９)

前記結合性分子の結合用基が、抗体のFcドメイン結合タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、項目7に記載の結合用基を１つもしくは複数含むポリマー、デンドリマー、またはオリゴDNAを介して小型物質に適合される、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

(項目１０)

前記抗体のFcドメイン結合タンパク質が、プロテインA、プロテインG、プロテインL、またはプロテインA/Gである、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

(項目１１)

前記分子インプリント凹部内に、前記検出対象又は前記分子インプリント凹部の鋳型との相互作用基を更に有する、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１２）

前記結合性分子が、特異的結合性分子である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１３）

前記特異的結合性分子が、抗体ミメティック、リン脂質結合性タンパク質、人工（高分子）レセプター及びレクチンからなる群から選択される、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１４）

前記検出対象が、膜構造を有する微小粒体である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１５）

前記分子インプリント凹部の鋳型が粒子コアまたは生体分子である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１６）

前記分子インプリント凹部の鋳型がシリカ粒子または血清タンパク質である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１７）

前記分子インプリント凹部の鋳型が血清タンパク質であり、前記検出対象が膜構造を有する微小粒体であり、前記標的が前記微小粒体の表面に発現している分子である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１８）

基板と、前記基板の表面上に設けられたポリマー膜と、を含み

前記インプリントポリマーが前記ポリマー膜を構成している、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目１９）

前記インプリントポリマーが粒子状である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目２０）

粒子状の前記インプリントポリマーが、基板上に固定されている、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

（項目２１）

前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材と、

前記特異的結合性分子の結合用基に結合した前記検出対象の標的に対する特異的結合性基とを含み、

前記特異的結合性基が小型物質基である、検出対象の分析用センサ。

（項目２２）

前記シグナル物質の結合用基に結合したシグナル基をさらに含む、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ。

（項目２３）

前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサに、検出対象を含む試料を接触させ、前記特異的結合性基に前記検出対象を結合する工程と、

前記特異的結合性基と前記検出対象との結合を検出する工程と、

を含む、検出対象の分析法。

（項目２４）

基板に、検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）と、

前記結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）と、

重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、前記鋳型の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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）と、

前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記結合性分子の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）と、

を含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

(項目２５)

基板に、検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）と、

前記結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）と、

重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、前記鋳型の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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）と、

前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記結合性分子の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）と、

を含み、

該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

(項目２６)

前記鋳型の前記表面を、第２の可逆的連結基を介して重合性官能基で修飾する修飾工程を含み、

前記工程（１－３）において、前記重合性モノマー及び前記重合性官能基を基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、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し、

前記工程（１－４）において、前記第１の可逆的連結基及び前記第２の可逆的連結基を開裂させてそれぞれ前記結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

(項目２７)

表面が、第１の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（１－１１）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（１－１２）と、

前記第１の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し、前記結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）と、を含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目２８）

表面が、第１の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（１－１１）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（１－１２）と、

前記第１の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し、前記結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）と、を含み、

該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目２９）

表面が第３の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（１－２１）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（１－２２）と、

前記第３の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（１－２３）と、

検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用

基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）と、を含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目３０）

表面が第３の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（１－２１）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（１－２２）と、

前記第３の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（１－２３）と、

検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）と、を含み、

該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目３１）

前記工程（１－２２）において、前記鋳型との相互作用基を含むモノマーをさらに前記基質とする、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目３２）

前記結合性分子が、特異的結合性分子である、前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

（項目３３）

前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

前記結合性分子の結合用基に、前記結合性分子を結合する工程（２）と、

を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

（項目３４）

前記項目のいずれか一項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

前記結合性分子の結合用基に、前記結合性分子を結合する工程（２）と、

前記シグナル物質結合用基にシグナル物質を結合する工程（３）を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

（項目３５）

前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを用いて被験体を診断または検査する方法であって、該診断方法は、

A）被験体から試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を採取する工程、

B）前記試料を前記分析用センサと接触させる工程、

C）前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記シグナルを分析してから前記被験体を診断または検査する（例えば、疾患の有無若しくは進行を判定する）工程

を含む、診断または検査方法。

（項目３６）

前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを備える診断または検査システムを用いて被験体を診断または検査する方法をコンピュータに実行させるプログラムであって、該方法は、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を前記診断または検査システムに提供する工程、

B）前記診断または検査システムが、前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する工程、

C）前記診断または検査システムが、前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記診断または検査システムが、前記シグナルを分析してから前記被験体

を診断または検査する（検出結果から疾患の有無または進行を判定する）工程

を含む、プログラム。

（項目３７）

前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを用いて被験体を診断または検査する方法をコンピュータに実行させるプログラムを格納した記録媒体であって、該方法は、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を前記診断または検査システムに提供する工程、

B）前記診断または検査システムが、前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する工程、

C）前記診断または検査システムが、前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記診断または検査システムが、前記シグナルを分析してから該被験体を診断または検査する（検出結果から疾患の有無または進行を判定する）工程

を含む、記録媒体。

（項目３８）

診断または検査システムであって、該システムでは、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）提供する提供部、

B）前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する起動部、

C）前記分析用センサからのシグナルを検出する検出部、および

D）前記シグナルを分析してから該被験体を診断する（検出結果から疾患の有無または進行を判定する）診断部

を含む、システム。

[0008] 項１．　検出対象の標的分子を受け入れる分子インプリント凹部と、前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基とを有する分子インプリントポリマーを含み、

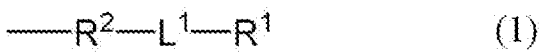
前記特異的結合性分子が分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質又はペプチドである、検出対象の分析用センサ作製用基材。

項２．　前記分子インプリント凹部内に、更にシグナル物質の結合用基を有する、項１に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項３．　前記分子インプリント凹部表面において、前記特異的結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が互いに独立している、項２に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項４．　前記分子インプリント凹部内において、前記特異的結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が、下記式（１）で示される機能性基を構成している、項２に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化4]



(1)

［R^1は前記特異的結合性分子の結合用基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表し、R^2は前記シグナル物質の結合用基を含む連結基を表す。］

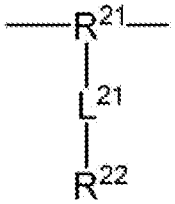
項５．　前記シグナル物質の結合用基を含む連結基が、下記式（２）又は（３）で示される、項４に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化5]



(2)

[化6]



(3)

［R^3は、水素、若しくは、ポリアルキレングリコール鎖を含んでよい炭素数１～８のアルキル基を表し、R^{21}は窒素原子又は炭化水素を表し、L^{21}は直接結合又は連結基を表し、R^{22}は前記シグナル物質の結合用基を表す。］

項６．　前記分子インプリント凹部内に、前記検出対象又は前記分子インプ

リント凹部の鋳型との相互作用基を更に有する、項１～５のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項７．　前記特異的結合性分子が、ナノボディ、抗体ミメティック、リン脂質結合性タンパク質、及びレクチンからなる群から選択される、項１～６のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項８．　前記検出対象が、膜構造を有する微小粒体である、項１～７のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項９．　前記分子インプリント凹部の鋳型が血漿タンパク質であり、前記検出対象が膜構造を有する微小粒体であり、前記標的分子が前記微小粒体の表面に発現している分子である、項１～８のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項１０．　基板と、前記基板の表面上に設けられたポリマー膜と、を含み

前記インプリントポリマーが前記ポリマー膜を構成している、項１～９のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項１１．　前記インプリントポリマーが粒子状である、項１～９のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項１２．　粒子状の前記インプリントポリマーが、基板上に固定されている、項１１に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

項１３．　項１～１２のいずれか１項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材と、

前記特異的結合性分子の結合用基に結合した前記検出対象の標的分子に対する特異的結合性基とを含み、

前記特異的結合性基が分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質基又はペプチド基である、検出対象の分析用センサ。

項１４．　前記シグナル物質の結合用基に結合したシグナル基をさらに含む、項１３に記載の検出対象の分析用センサ。

項１５．　項１３又は１４に記載の検出対象の分析用センサに、検出対象を含む試料を接触させ、前記特異的結合性基に前記検出対象を結合する工程と

、

前記特異的結合性基と前記検出対象との結合を検出する工程と、

を含む、検出対象の分析法。

項１６．　基板に、検出対象の標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）と、

前記特異的結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）と、

重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、前記鋳型の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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）と、

前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記特異的結合性分子の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）と、

を含み、

前記特異的結合性分子が分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質又はペプチドである、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

項１７．　前記鋳型の前記表面を、第２の可逆的連結基を介して重合性官能基で修飾する修飾工程を含み、

前記工程（１－３）において、前記重合性モノマー及び前記重合性官能基を基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、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し、

前記工程（１－４）において、前記第１の可逆的連結基及び前記第２の可逆的連結基を開裂させてそれぞれ前記特異的結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する、項１６に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

項１８．　表面が、第１の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（１－１１）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（１－１２）と、

前記第１の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し、前記特異的結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）と、を含み、

前記特異的結合性分子が分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質又はペプチドである、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

項１９．　表面が第３の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（１－２１）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（１－２２）と、

前記第３の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（１－２３）と、

検出対象の標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）と、を含み、

前記特異的結合性分子が分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質又はペプチドである、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

項２０．　前記工程（１－２２）において、前記鋳型との相互作用基を含むモノマーをさらに前記基質とする、項１９に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

項２１．　項１６～２０のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

前記特異的結合性分子の結合用基に、前記特異的結合性分子を結合する工程（２）と、を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

項２２．　項１７、１９及び２０のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

前記特異的結合性分子の結合用基に、前記特異的結合性分子を結合する工

程（２）と、

前記シグナル物質結合用基にシグナル物質を結合する工程（３）を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

発明の効果

[0009] 本開示によれば、導入している特異的結合性分子の生来的な結合能が低い（解離定数Ｋｄが比較的大きい）にも拘わらず、感度が向上したバイオセンサが提供される。このような優れた効果がもたらされる具体的なメカニズムについては定かではないが、導入している特異的結合性分子が比較的小さな分子であることにより、分子インプリント技術により形成された微小な穴の中に複数の特異的結合性分子を配することが可能となり、これによってセンシング時に検出対象が複数の結合で捕捉され、検出対象当たりの特異的結合性分子の結合能が驚異的なレベルに引き上げられた（解離定数Ｋｄが顕著に低下した）と考えられる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A]本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例の模式図である。

[図1B-1]図１Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの一例の模式図である。

[図1B-2]図１Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの他の例の模式図である。

[図2A]本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例の模式図である。

[図2B-1]図２Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの一例の模式図である。

[図2B-2]図２Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの他の一例の模式図である。

[図3A]本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例の模式図である。

[図3B]図３Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図4A]本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例の模式図である。

[図4B]図４Ａに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図5]（Ａ）図１Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が基板上に設けられた膜状である場合の模式図及びそれに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図6]（Ａ）図１Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が粒子である場合の模式図及び（Ｂ）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図7]（Ａ）図１Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が基板に固定された粒子である場合の模式図及び（Ｂ）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図8]（Ａ）図２Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が基板上に設けられた膜状である場合の模式図、及び（Ｂ１），（Ｂ２）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図9]（Ａ）図２Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が粒子である場合の模式図及び（Ｂ）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図10]（Ａ）図４Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が粒子である場合の模式図及び（Ｂ）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図11]（Ａ）図３Ａの本開示の検出対象の分析センサ作製用基材の一例が基板に固定された粒子である場合の模式図及び（Ｂ）それに対応する本開示の検出対象の分析センサの模式図である。

[図12-1a]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における鋳型を用意する一態様を模式的に示す。

[図12-1b]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における鋳型を用意する他の態様を模式的に示す。

[図12-2]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における工程（１－１）を模式的に示す。

[図12-3a]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１

０ａ－Ｃ’の製造方法における工程（１－２）（図１２－１ａで得た鋳型６０$_1$を用いる場合）を模式的に示す。

[図12-3b]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における工程（１－２）（図１２－１ｂで得た鋳型６０$_2$を用いる場合）を模式的に示す。

[図12-4]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における工程（１－３）を模式的に示す。

[図12-5]図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法における工程（１－４）を示す。

[図12-6]図８（Ｂ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ１０ａ－Ｃの製造方法を模式的に示す。

[図13-1a]図６（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法における工程（１－１１）（鋳型６０$_1$を用いる場合）を模式的に示す。

[図13-1b]図６（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法における工程（１－１１）（鋳型６０$_2$を用いる場合）を模式的に示す。

[図13-2]図６（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法における工程（１－１２）を模式的に示す。

[図13-3]図６（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法における工程（１－１３）の一例を模式的に示す。

[図13-4]図６（Ｂ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ１０－Ｐの製造方法を模式的に示す。

[図14-1]図１０（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’の製造方法における工程（１－２１）を模式的に示す。

[図14-2]図１０（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’の製造方法における工程（１－２２）を模式的に示す。

[図14-3]図１０（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材

１０ｃ－Ｐ’の製造方法における工程（１－２３）を模式的に示す。

[図14-4]図１０（Ａ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’の製造方法における工程（１－２４）を模式的に示す。

[図14-5]図１０（Ｂ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの製造方法を模式的に示す。

[図15]図１４－３及び図１４－４の間に、粒子状の検出対象の分析用センサ基材を基板に固定する工程を模式的に示す。

[図16-1]図１０（Ｂ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐによる二重ターゲティングの例（分子インプリント凹部２１ｃの鋳型（６０ｃ）の濃度が高い環境中）を模式的に示す。

[図16-2]図１０（Ｂ）に示した粒子状の検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐによる二重ターゲティングの例（分子インプリント凹部２１ｃの鋳型（６０ｃ）の濃度が低い環境中）を模式的に示す。

[図17A]実施例１の基板状の検出対象（エクソソーム）の分析センサ１０ａ－Ｃ（シグナル物質としてAlexa　Fluor　647を導入）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17B]比較例１のアフィボディを導入しなかった分析センサによる、相対蛍光強度とエクソソーム濃度との関係を示す。

[図18]実施例２の基板状の検出対象（エクソソーム）の分析センサ１０ａ－Ｃ（シグナル物質としてローダミンを導入）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19]実施例３の基板状の検出対象（エクソソーム）の分析センサ（但し、特異的結合性基に融合したシグナル物質を利用する基板状の検出対象の分析センサ１０[1]タイプのもの）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20]実施例４の粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０－ＰＣの、粒子状分子インプリントポリマーのＴＥＭ画像を示す。

[図21]実施例４の粒子状且つ基板に固定された検出対象（エクソソーム）の

分析センサ１０－ＰＣによる、レスポンスの変化量とエクソソーム溶液濃度との関係を示す。

[図22]実施例５の粒子状且つ基板に固定された検出対象（エクソソーム）の分析センサ１０ｂ－ＰＣ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23]実施例５の粒子状且つ基板に固定された検出対象（エクソソーム）の分析センサ１０ｂ－ＰＣ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分析用センサとについて、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。

[図24]実施例６の基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐの、粒子状分子インプリントポリマーのＴＥＭ画像を示す。

[図25]実施例６の基板に固定された粒子状の検出対象（エクソソーム）の分析センサ１０ｃ－Ｐによる、エクソソームとＨＳＡとの濃度比が異なる溶液中での二重ターゲティングを示す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に、本開示をさらに詳細に説明する。

本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」等）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

本明細書において、本開示において使用される用語および一般的な技術は、適宜説明する。

［１．検出対象の分析用センサ作製用基材］

本開示の検出対象の分析用センサ作製用基材は、後述の発明の分析用センサを作製するための材料となる基材である。この分析用センサ作製用基材は、ユーザが、検出対象をより一層感度高く検出可能なセンサへ簡便にカスタマイズできるように構成されている。

[0012] ［１－１．基本構成（センシング前駆部）］

本開示の検出対象の分析センサ作製用基材は、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する特異的結合性分子の結合用基とを有する分子インプリントポリマーを含み；前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基であることを特徴とし、ならびに／あるいは、分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有することを特徴とする。この基本構成は、検出対象の分析センサ作製用基材のセンシング前駆部（つまり、分析用センサにカスタマイズされた場合にセンシング部を構成する部分）を構成する。

[0013] 本明細書において「標的」とは、目的となる分子または物質をいう。例えば、標的は、分子または分子集合体であってもよい。

[0014] 本明細書において「小型物質」とは、抗体より小さな任意の物質をいい、「小型結合性分子物質」とも互換的に使うことができる。分子量の目安では、約１５万とされているため、それより少ない（すなわち１５０，０００未満の）分子量であれば、この概念に入り得る。好ましい分子量としては、約１４万以下、約１３万以下、約１２万以下、約１１万以下、約１０万以下、約９万以下、約８万以下、約７万以下、約７万以下、約６万以下、約５万以下、約４万以下、約３万以下、約２２，０００以下、約２０，０００以下、約１９，０００以下、約１８，０００以下、約１７，０００以下、約１６，０００以下、約１５，０００以下、約１４，０００以下、約１３，０００以下、約１２，０００以下、約１１，０００以下、約１０，０００以下、約９，０００以下、約８，０００以下、約７，０００以下、約６，０００以下、などが挙げられる。小型分子の分子量としては、約２００以上、約３００以

上、約４００以上、約５００以上、約６００以上を下限として挙げることができる。

小型物質としては、任意の種類の物質が使用されることができ、代表的には、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖、脂質、核酸、核酸誘導体、人工(高分子)レセプター、その他の有機分子、これらの複合分子、などが挙げられ、好ましくはタンパク質、ポリペプチド、ペプチドが挙げられ、タンパク質、またはペプチドがより好ましい。

[0015] 本明細書において「人工(高分子)レセプター」とは、標的を認識する分子インプリントポリマーナノ粒子（粒径、約10～30nm）をいう。抗体の代わりにサンドイッチアッセイなどに用いられる。このような人工レセプターとしては、Evan M. Peck and Bradley D. Smith, Chapter 1:Applications of Synthetic Receptors for Biomolecules , in Synthetic Receptors for Biomolecules: Design Principles and Applications, 2015, pp. 1-38を参照することができる。

[0016] 本明細書において「結合用基」または「分子インプリント凹部」が「…に適合される」とは、適合対象となる物質（例えば、小型物質、分子量４５，０００の分子など）について、「結合用基」または「分子インプリント凹部」が備えられるセンサ用製造基材またはセンサにおいて使用されるとき、適合対象となる物質を対象として検出プロセスを行う際に、適切に検出がされるような構成をしていることをいう。

[0017] 代表的に、例えば、「小型物質に適合される結合用基」は、抗体より小さな小型物質に適切な結合用基であり、アミノ基、カルボキシ基、ボロン酸基、cis-ジオール基、アルデヒド基、ケトン基、オキシアミノ基、ヒドラジド基、ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)基、ニッケルーニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、ピリジルジスルフィド基、および金属錯体などの基が好ましく利用され得る。また該結合用基は、プロテインA、プロテインG、プロテインL、およびプロテインA/Gなどの抗体のFcドメイン結合タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、およびニュートラアビジンなどのタン

パク質、アミノ基、カルボキシ基、ボロン酸基、cis-ジオール基、アルデヒド基、ケトン基、オキシアミノ基、ヒドラジド基、ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、ピリジルジスルフィド基、および金属錯体などの基を１つまたは複数含むポリマー、デンドリマー、ならびにオリゴDNAなどを介して小型物質に適合されてもよい。

[0018] 代表的には、例えば、「分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する」とは、分子インプリント凹部がセンサ用製造基材またはセンサにおいて配置されるときに、検出に適切な形状や構成をしていることをいう。

[0019] 本開示の検出対象の分析センサ作製用基材のいくつかの例を、図１Ａ、図２Ａ、図３Ａ、図４Ａに、それぞれ、検出対象の分析センサ作製用基材１０’，１０ａ’，１０ｂ’，１０ｃ’として模式的に示す。これらの図に示される本開示の検出対象の分析センサ作製用基材は、それぞれ、図１Ｂ－１、図１Ｂ－２、図２Ｂ－１、図２－２、図３Ｂ、図４Ｂに模式的に示す検出対象の分析用センサ１０，10_1，１０ａ，$10a_1$，１０ｂ，１０ｃの作製に用いられる。

[0020] 図１Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０’は、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部２１と、前記分子インプリント凹部２１内に設けられた、前記標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’とを有する分子インプリントポリマー２０を含む。

[0021] 図２Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’は、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部２１と、前記分子インプリント凹部２１内に設けられた、前記標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質結合用基２３’とを有する分子インプリントポリマー２０ａを含む。つまり、検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’は、分子インプリント凹部２１内に、更にシグナル物質結合用基２３’が設けられていることを除いて図１Ａの検出対象の分析センサ作製用基材１０’と同様である。

さらに、検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’においては、分子インプリント凹部２１表面において、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質の結合用基２３’が互いに独立（つまり、分子インプリント凹部２１表面方向において互いに離間）している。

[0022] 図３Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０ｂ’は、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部２１と、前記分子インプリント凹部２１内に設けられた、前記標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質結合用基２３ｂ’とを有する分子インプリントポリマー２０ｂを含む。つまり、検出対象の分析センサ作製用基材１０ｂ’は、分子インプリント凹部２１内に、更にシグナル物質結合用基２３ｂ’が設けられている点において、図２Ａの検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’と同様である。但し、図２Ａの検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’と異なり、検出対象の分析センサ作製用基材１０ｂ’においては、分子インプリント凹部２１内において、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’が、所定の機能性基２４ｂを構成している。

[0023] 図４Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０ｃ’は、検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部２１ｃと、前記分子インプリント凹部２１ｃ内に設けられた、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’並びに分子インプリント凹部２１ｃの鋳型との相互作用基２５とを有する分子インプリントポリマー２０ｃを含む。つまり、検出対象の分析センサ作製用基材１０ｃ’は、更にシグナル物質結合用基２３ｂ’を含む点、並びに、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’が、所定の機能性基２４ｂを構成している点において、図３Ａの検出対象の分析センサ作製用基材１０ｂ’と同様である。但し、図３Ａの検出対象の分析センサ作製用基材１０ｂ’と異なり、検出対象の分析センサ作製用基材１０ｃ’は、相互作用基２５を更に含み、且つ、分子インプリント凹部２１ｃが、相互作用基２５と相

互作用する鋳型によって形成されたものとして限定されている。

[0024] 図１Ａ、図２Ａ、図３Ａ、図４Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０’，１０ａ’，１０ｂ’，１０ｃ’が、それぞれ、図１Ｂ－１、図１Ｂ－２、図２Ｂ－１、図２Ｂ－２、図３Ｂ、図４Ｂに模式的に示す検出対象の分析用センサ１０，10_1，１０ａ，$10a_1$，１０ｂ，１０ｃの作製に用いられる際には、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’に、少なくとも標的に対する特異的結合性基４２（小型物質基）を結合させ、シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’にシグナル基４３を結合させる。

[0025] ［１－２．形状］

図１Ａに示した本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０’のより具体的な例を、図５（Ａ）、図６（Ａ）、図７（Ａ）に、検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｃ’，１０－Ｐ’，１０－ＰＣ’として示す。本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｃ’，１０－Ｐ’，１０－ＰＣ’は、それぞれ、図５（Ｂ）、図６（Ｂ）、図７（Ｂ）に模式的に示す検出対象の分析用センサ１０－Ｃ，１０－Ｐ，１０－ＰＣの作製に用いられる。

[0026] 図５（Ａ）に示す本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０-Ｃ’は、本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０’が基板状（チップ状）である場合の例である。つまり、検出対象の分析センサ作製用基材１０-Ｃ’では、基板３０と、基板３０の表面上に設けられたポリマー膜とを含み、インプリントポリマー１０が当該ポリマー膜を構成している。

[0027] 図６（Ａ）に示す本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０-Ｐ’は、本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０’が粒子状である場合の例である。つまり、検出対象の分析センサ作製用基材１０-Ｐ’では、インプリントポリマー１０が粒子状をなしている。

[0028] 図７（Ａ）に示す本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０-ＰＣ’は、本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０’が粒子状で基板（チップ）に固定されている場合の例である。つまり、図７（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０-ＰＣ’は、図６（Ａ）に示す検出対象の分析セン

サ作製用基材１０-Ｐ’が基板３０に固定されている。

[0029] 分子インプリントポリマーの形状の好ましい例としては、粒子状が挙げられる。分子インプリントポリマーが粒子状であることは、上述の図７（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０-ＰＣ’のように基板に固定することで、検出対象の分析用センサを基板（チップ）状の形状とすることができるだけでなく、上述の図６（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０-Ｐ’のように非固定の状態とすることで、検出対象の分析用センサを遊離（例えば分散媒中に分散）した形態とすることもでき、汎用性の点で優れている。

[0030] 粒子状である場合の分子インプリントポリマーの平均粒子径は、検出対象又は検出対象の標的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で例えば５～５００ｎｍ、好ましくは８～１７０ｎｍ、より好ましくは１０～１００ｎｍ、さらに好ましくは１５～５０ｎｍ、一層好ましくは２０～３０ｎｍが挙げられる。また、ＤＬＳによって測定されるＺ平均粒子径で例えば５～５００ｎｍ、好ましくは５０～３５０ｎｍ、より好ましくは８０～２００ｎｍ、さらに好ましくは１００～１４０ｎｍ、一層好ましくは１２０～１７０ｎｍが挙げられる。さらに、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）で測定される個数平均粒子径で例えば５～１５０ｎｍ、好ましくは１０～１００ｎｍ、より好ましくは１０～３５ｎｍ又は４５～９０ｎｍ、さらに好ましくは２０～３０ｎｍが挙げられる。なお、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）で測定される個数平均粒子径は、透過型電子顕微像において粒子の長軸と短軸の平均値を粒径とし、ランダムに選んだ粒子１００個の当該粒径の平均値である。

[0031] 図２Ａ、図３Ａ及び図４Ａに示した本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ’，１０ｂ’，１０ｃ’のいずれについても、同様に、基板状（チップ状）のもの、粒子状のもの、又は粒子状のものが基板に固定されたもののとして構成されてよい。そのいくつかの例を、図８（Ａ）、図９（Ａ）、図１０（Ａ）、図１１（Ａ）に、それぞれ、検出対象の分析センサ作製用

基材１０ａ－Ｃ’，１０ａ－Ｐ’，１０ｃ－Ｐ’，１０ｂ－ＰＣ’として模式的に示す。これらの図に示される本開示の検出対象の分析センサ作製用基材は、それぞれ、図５（Ｂ）、図６（Ｂ）、図７（Ｂ）、図８（Ｂ１），（Ｂ２）、図９（Ｂ）、図１０（Ｂ）、図１１（Ｂ）に模式的に示す検出対象の分析用センサの作製に用いられる。

[0032] 図５（Ａ）、図６（Ａ）、図７（Ａ）、図８（Ａ）、図９（Ａ）、図１０（Ａ）、図１１（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｃ’，１０－Ｐ’，１０－ＰＣ’，１０ａ－Ｃ’，１０ａ－Ｐ’，１０ｃ－Ｐ’，１０ｂ－ＰＣ’が、図５（Ｂ）、図６（Ｂ）、図７（Ｂ）、図８（Ｂ１），（Ｂ２）、図９（Ｂ）、図１０（Ｂ）、図１１（Ｂ）に示す検出対象の分析センサ１０－Ｃ，１０－Ｐ，１０－ＰＣ，１０ａ－Ｃ，$10a_1$－Ｃ，１０ａ－Ｐ，１０ｃ－Ｐ，１０ｂ－ＰＣの作製に用いられる際には、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’に、少なくとも標的に対する特異的結合性基４２（小型物質基）を結合させ、シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’にシグナル基４３を結合させる。

[0033] ［１－３．各構成要素］

以下、これらの検出対象の分析センサ作製用基材を構成するそれぞれの要素について詳述する。

[0034] ［１－３－１．分子インプリント凹部］

分子インプリント凹部２１，２１ｃは、本開示の検出対象の分析用センサにおけるセンサ場を提供する部分であり、検出対象の標的を受け入れるように形成されている。具体的には、分子インプリント凹部２１，２１ｃは、分子インプリント重合法において用いられる鋳型（後述の鋳型６０，６０ｃ）によってポリマーが型取られた部分であり、当該鋳型の表面形状の一部に対応する形状を有する。凹部２１，２１ｃは、少なくとも検出対象の標的を受け入れ可能な大きさで形成されていればよい。また、凹部２１，２１ｃは、分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する。

[0035] 分子インプリント凹部２１，２１ｃが「検出対象の標的を受け入れ可能な

大きさ」とは、標的に対する特異的結合性基４２が導入されて分析用センサとなった場合に、検出対象の少なくとも一部（例えば、少なくとも、後述の検出対象７０の標的７２における特異的結合性基４２との特異的結合部位）が分子インプリント凹部２１，２１ｃ内に進入し特異的結合性分子にアプローチして結合可能となる程度に分子インプリント凹部２１，２１ｃが十分な大きさで開口していることをいう。

[0036] 従って、凹部２１，２１ｃは、検出対象又は検出対象の標的と同じ大きさの物質、又は検出対象よりもサイズが大きい物質を鋳型とするものであってよい。好ましくは、凹部２１，２１ｃは、検出対象又は検出対象の標的よりもサイズが大きい物質を鋳型とするものである。

[0037] ［１－３－２．標的に対する特異的結合性分子の結合用基］

標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’は、標的に対する特異的結合性基（図１Ｂ－１、図１Ｂ－２、図２Ｂ－１、図２Ｂ－２、図３Ｂ、図４Ｂ中の特異的結合性基４２）を結合させることにより標的に対する特異的結合性分子を導入可能とする基である。ユーザは、標的を自由に選択することができ、選択した標的に対する特異的結合性分子を結合用基２２’，２２ｂ’へ導入することができる。

[0038] 本明細書において、特異的結合性分子とは、標的に対して高い親和性・選択性を有する結合性分子である。

[0039] また、本開示の分析用センサ作製用基材が基板３０を含むものである場合、（例えば、図示された態様の中では、図５（Ａ）、図７（Ａ）、図８（Ａ）、図１１（Ａ）に示す本開示の検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｃ’，１０－ＰＣ’１０ａ－Ｃ’，１０ｂ－ＰＣ’等の場合）、１個の基板３０上で、一の凹部２１，２１ｃに対し一の種類の特異的結合性分子を導入し、他の凹部２１，２１ｃに対し他の種類の特異的結合性分子（つまり、一の種類の特異的結合性分子と特異的結合性基が異なる分子）を導入することによって、１個の基板３０において複数種の異的結合性基を用いた検出対象の分析が可能となるようにカスタマイズすることもできる。

[0040] なお、１個の基板３０へ複数種の特異的結合性分子を導入する具体的な方法は、基板３０上の領域を複数の領域に分画し、分画された領域毎に異なる特異的結合性分子を導入する方法等が挙げられる。分画の方法としては、基板３０上に、分子インプリントポリマーからなるポリマー膜（例えば、図５（Ａ）、図８（Ａ）の膜状の分子インプリントポリマー２０，２０ａ）又はポリマー粒子（例えば、図７（Ａ）、図１１（Ａ）の粒子状の分子インプリントポリマー２０，２０ｂ）が不在の部分を設ける方法；分子インプリントポリマーからなるポリマー膜（例えば、図５（Ａ）、図８（Ａ）の膜状の分子インプリントポリマー２０，２０ａ）上に凹部２１が不在の部分を設ける方法；分子インプリントポリマーからなるポリマー膜（例えば、図５（Ａ）、図８（Ａ）の膜状の分子インプリントポリマー２０，２０ａ）上にポリマー等で障壁を凸設する方法等が挙げられる。

[0041] このようなカスタマイズの具体例としては、一の凹部２１，２１ｃに対し特定の小型細胞外小胞の表面タンパク質に結合する特異的結合性分子を導入し、他の凹部２１，２１ｃに対し特定のタンパク質（小型細胞外小胞の表面に発現していないタンパク質）に結合する特異的結合性分子を導入することによって、１個の基材３０上で、小型細胞外小胞と当該タンパク質との両方の分析が可能となる。また、カスタマイズの別の具体例としては、一の凹部２１，２１ｃに対し特定の小型細胞外小胞の表面タンパク質Ａに結合する特異的結合性分子を導入し、他の凹部３１に対し当該特定の小型細胞外小胞の表面タンパク質Ｂに結合する特異的結合性分子を導入することによって、１個の基材３０上で、小型細胞外小胞上の異なる種類の表面タンパク質の分析が可能となる。また、一方の凹部に細胞種Aに由来する細胞外小胞A’上に発現する物質に対する特異的結合分子を導入し、他方に細胞種Bに由来する細胞外小胞B’上に発現する物質に対する特異的結合分子を導入することで、1個の基材上で異なる細胞種由来の小型細胞外小胞の分析が可能となる。これらの具体例は、異なる種類の表面タンパク質だけでなく、異なる種類の表面標的（たとえば、タンパク質と糖鎖等）にも適用できる。

[0042] 本開示において、標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’は、１個の分子インプリント凹部２１，２１ｃ当たり複数設けられている。

[0043] 特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’としては、一般的に結合性官能基として知られているものから特に制限なく選択される。

[0044] 特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’のうち、特異的結合性分子の結合用基２２’としては、一般的に結合性官能基として知られている基の中から、可逆的連結基（後述の第１の可逆的連結基２２）を形成可能な基が選択される。可逆的連結基とは、切断（開裂）及び結合が可逆的である直接結合又は二価以上の基をいう。可逆的連結基（後述の第１の可逆的連結基２２）の可逆的部分の結合様式は、共有結合及び非共有結合を問わない。特異的結合性分子の結合用基２２’の具体例としては、下記表１の第１－１欄に示す基が挙げられ、対応する可逆的連結基（後述の第１の可逆的連結基２２）の具体例としては、下記表１の第１－３欄に示す基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0045]

[表1-1]

1－1	1－2	1－3	1－4
結合性官能基	結合性官能基	可逆的連結基	可逆部分の結合の様式
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基 22'）	（結合性基 22''）	（第１の可逆的連結基 22）	
（シグナル物質の結合用基 23'）	（結合性基 23''）	（第２の可逆的連結基 23）	
（結合性基 26b'）	（結合性基 26b''）	（第３の可逆的連結基 26b）	
チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	ジスルフィド基	共有結合
ボロニル基	糖基（cis ジオール基）	ボロン酸 cis ジオールエステル	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基	イミノ結合基	共有結合
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基		
カルボキシル基	ヒドロキシル基	カルボン酸エステル基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基		
アミノオキシ基	カルボキシ基・アルデヒド基	オキシム基	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基		
カルボキシ基・アルデヒド基	ヒドロキシル基	アセタール基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシ基・アルデヒド基		

[表1-2]

金属錯体（Ni-NTA(ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基)等）	ポリヒスチジン(His)タグ（6×His, 8 ×His,10×His等）	配位結合	非共有結合
塩基性基（アミノ基、環状２級アミノ基（たとえば、ピロリジル基）、ピペリジ基、ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、	酸性基（カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基等）	水素結合	非共有結合
水酸基			
酸性基	塩基性基		非共有結合
（カルボキシル基等）	（アミノ基、環状２級アミノ基（たとえば、ピロリジル基、ピペリジ基）、ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、水酸基		
芳香族基（アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	芳香族基（アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	疎水結合	非共有結合
ヒドラジド	カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラゾン結合	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド		
アビジン（ニュートラアビジン、ストレプトアビジン）	ビオチン（ビオシチン、デスチオビオチン）	アビジン−ビオチン結合	非共有結合
ビオチン（ビオシチン、デスチオビオチン）	アビジン（ニュートラアビジン、ストレプトアビジン）		

[表1-3]

グルタチオン(GSH)	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)-グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)結合	非共有結合
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)		
Phos-tag	リン酸イオン	配位結合	非共有結合
リン酸イオン	Phos-tag		

[0046] これらの結合性官能基の中でも、特異的結合性分子の結合用基２２’としては、共有結合又は配位結合による可逆的連結基を形成する基であることが好ましい。共有結合又は配位結合による可逆的連結基は、水素結合及び疎水結合に比べて比較的安定であり、重合反応時にも安定的に維持され、分子インプリント凹部２１，２１ｃの形成を容易にする一方で、還元剤、比較的低温での加熱、比較的穏和な条件での加水分解、光照射などにより切断され易いことから、重合反応後における鋳型の除去が容易でもある。

[0047] さらに、これらの結合性官能基の中でも、特異的結合性分子の結合用基２２’の好適な例としては、金属錯体、より好ましくはニッケル錯体、さらに好ましくはニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基等が挙げられる。このような特異的結合性分子の結合用基２２’が好適である場合としては、検出対象の分析センサ作製用基材の分子インプリントポリマーがポリマー膜を構成している場合（例えば、図５（Ａ）、図８（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｃ’，１０ａ－Ｃ’等の場合）が挙げられる。

[0048] また、これらの結合性官能基の中でも、特異的結合性分子の結合用基２２’の好適な他の例としては、チオール基又はピリジルジスルフィド基、より好ましくはチオール基が挙げられる。このような特異的結合性分子の結合用基２２’が好適である場合としては、検出対象の分析センサ作製用基材の分子インプリントポリマーが粒子状である場合（例えば、図６（Ａ）、図７（Ａ）、図９（Ａ）に示す検出対象の分析センサ作製用基材１０－Ｐ’，１０－ＰＣ’，１０ａ－Ｐ’等の場合）が挙げられる。

[0049] 特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’のうち、特異的結合性分子

の結合用基２２ｂ’としては、一般的に結合性官能基として知られている基の中から、可逆的又は非可逆的連結基（後述の連結基２２ｂ）を形成可能な基が選択される。特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）を安定的に結合する観点から、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’としては、共有結合による可逆的又は非可逆的連結基（後述の連結基２２ｂ）を形成可能な基であることが好ましい。このような特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’の具体例としては、下記表２の第２－１欄に示す基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0050] [表2-1]

2-1	2-2
結合性官能基	対応する結合性官能基
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基 22b'）	（結合性基 22b''）
（シグナル物質の結合用基結合性基 23b'）	（結合性基 23b''）
（結合性基 BG22'',BG23'',BG1',BG6''）	（結合性基 BG22',BG23',BG1'',BG6'）
アミノ基（１価アミノ基，２価アミノ基等）	カルボン酸活性エステル基（N-ヒドロキシスクシンイミド，ニトロフェノール，ペンタフルオロフェノールなどを用いた活性エステル基；NHS カルバメートなどのカルバミン酸活性エステル基）；カルボキシル基；アルデヒド基；イソシアネート基；イソチオシアネート基；エポキシ基;マレイミド基等
アミノ基	カルボキシル基
カルボキシル基	アミノ基
糖基（cis ジオール基）	ボロニル基
ボロニル基	糖基（cis ジオール基）
チオール基	マレイミド基，アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加形クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等

[表2-2]

マレイミド基，アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等	チオール基
カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基
アミノオキシ基	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドロキシル基
ヒドロキシル基	カルボニル基・アルデヒド基
水酸基，フェノール性水酸基	カルボン酸活性エステル基
ヒドラジド	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド
アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)	ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)
ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)	アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)
グルタチオン(GSH)	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	グルタチオン(GSH)

なお、本開示において、化学修飾されてできた結合性基を化学修飾していることがあり得る。

[0051] これらの結合性官能基の中でも、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’の好適な例としては、チオール基又はピリジルジスルフィド基、より好ましくはピリジルジスルフィド基が挙げられる。

[0052] ［１－３－３．シグナル物質の結合用基］

シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’は、シグナル基（図２Ｂ－１、図２Ｂ－２、図３Ｂ、図４Ｂ中のシグナル基４３）を結合させることによりシグナル物質を導入可能とする基である。ユーザは、シグナル物質を自由に選択することができ、結合用基２３’，２３ｂ’へ導入することができる。

[0053] 本開示において、シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’は、１個の分子インプリント凹部２１，２１ｃ当たり複数設けられることができる。

[0054] シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’としては、それぞれ、特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’と異なる基である限りにおいて、一般的に結合性官能基として知られているものから特に制限なく選択される。

[0055] シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’のうち、シグナル物質の結合用基２３’としては、一般的に結合性官能基として知られている基の中から、可逆的連結基（後述の第２の可逆的連結基２３）を形成可能な基が選択される。可逆的連結基（後述の第２の可逆的連結基２３）の可逆的部分の結合様式は、共有結合及び非共有結合を問わない。シグナル物質の結合用基２３’の具体例としては、上記表１の第１－１欄に示す基が挙げられ、対応する可逆的連結基（後述の第２の可逆的連結基２３）の具体例としては、上記表１の第１－３欄に示す基が挙げられる。

[0056] これらの結合性官能基の中でも、シグナル物質の結合用基２３’としては、共有結合又は配位結合による可逆的連結基を形成する基であることが好ましい。共有結合又は配位結合による可逆的連結基は、水素結合及び疎水結合に比べて比較的安定であり、重合反応時にも安定的に維持され、分子インプリント凹部２１，２１ｃの形成を容易にする一方で、還元剤、比較的低温での加熱、比較的穏和な条件での加水分解、光照射などにより切断され易いことから、重合反応後における鋳型の除去が容易でもある。

[0057] さらに、これらの結合性官能基の中でも、シグナル物質の結合用基２３’の好適な例としては、共有結合による可逆的連結基を形成する基、より好ましくはチオール基又はピリジルジスルフィド基、さらに好ましくはチオール基が挙げられる。

[0058] シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’のうち、シグナル物質の結合用基２３ｂ’としては、一般的に結合性官能基として知られている基の中から、可逆的又は非可逆的連結基（後述の連結基２３ｂ）を形成可能な基が選択される。シグナル物質（後述のシグナル物質Ｒ４３）を安定的に結合する観

点から、シグナル物質の結合用基２３ｂ’としては、共有結合による可逆的又は非可逆的連結基（後述の連結基２３ｂ）を形成可能な基であることが好ましい。このようなシグナル物質の結合用基２３ｂ’の具体例としては、上記表２の第２－１欄に示す基が挙げられる。

[0059] これらの結合性官能基の中でも、シグナル物質の結合用基２３ｂ’の好適な例としては、アミノ基が挙げられる。

[0060] ［１－３－４．機能性基］

上記の特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’は、機能性基２４ｂを構成している。機能性基２４ｂは、１個の基に特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’の両方を備えるため、検出対象の分析センサ作製用基材にこれらの基を近接させて設けることが容易となる。検出対象の分析センサ作製用基材において特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’及びシグナル物質の結合用基２３ｂ’を近接させて設けることは、即ち、検出対象の分析センサにおいて特異的結合性基４２及びシグナル基４３を近接させて設けることであり、これによって、検出対象の分析センサが検出対象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。

[0061] 図示した態様では、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’が機能性基２４ｂの先端側に位置し、シグナル物質の結合性基２３ｂ’が機能性基２４ｂの基端側に位置しているが、機能性基２４ｂにおいて、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’とシグナル物質の結合性基２３ｂ’との位置関係は、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’に結合した特異的結合性基４２が検出対象の標的と特異的結合でき、且つ、特異的結合した時に、シグナル物質の結合用基２３ｂ’に結合したシグナル基４３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、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’とシグナル物質の結合性基２３ｂ’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、検出対象の標的と特異的結合性基４２との特異的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／又は検出対象の標的と特異的結合性基４２との特的結合時により確実にシグナル基４３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、特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’が機能性基２４ｂの先端側に位置し、シグナル物質の結合性基２３ｂ’が機能性基２４ｂの基端側に位置していることが好ましい。

[0062] 機能性基２４ｂのより具体的な構造としては、下記式（１）で表される基が挙げられる。

[0063] [化7]

$$——R^2—L^1—R^1 \qquad (1)$$

[0064] 式（１）中、R^1は特異的結合性分子の結合用基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表し、R^2はシグナル物質の結合用基を含む連結基を表す。

[0065] 特異的結合性分子の結合用基R^1については、上記「１－３－２．標的に対する特異的結合性分子の結合用基」で述べた通りである。

[0066] 直接結合又は連結基L^1は、特異的結合性分子の結合用基R^1とシグナル物質の結合用基を含む連結基R^2との間に介在する。検出対象の分析用センサが検出対象を認識する時に、連結基R^2に含まれるシグナル物質の結合用基に結合するシグナル基４３と、特異的結合性分子の結合用基R^1に結合する特異的結合性基４２に対する検出対象の特異的認識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。

[0067] L^1が連結基である場合、当該連結基としては、ポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基（例えば、Ｃ１～８アルキレン基、又はポリオキシＣ１～３アルキレンＣ１～８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。分子設計の観点等から、当該連結基としては、好ましくはポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基とエステル結合及び／又はアミド結合との組み合わせ、より好ましくはポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基とエステル結合又はアミド結合との組み合わせ、さらに好ましくは１又は２以上の

アルキレン基（当該連結基に含まれる全てアルキレン基の炭素数の総数が、例えば１～８、好ましくは２～６、より好ましくは３～５、特に好ましくは４）とエステル結合又はアミド結合との組み合わせが挙げられる。

[0068] シグナル物質の結合用基を含む連結基R^2におけるシグナル物質の結合用基としては、上記「１－３－３．シグナル物質の結合用基」で述べた通りである。シグナル物質の結合用基を含む連結基R^2は、非分岐状又は分岐状の２価基である。

[0069] 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。

[0070] [化8]



(2)

[0071] 式（２）中、R^3は、水素、若しくは、ポリオキシアルキレン基を含んでよい炭素数１～８のアルキル基（例えば、Ｃ１～８アルキレン基、又はポリオキシＣ１～３アルキレンＣ１～８アルキレン基）であり、好ましくは水素を表す。

[0072] 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。

[0073] [化9]



(3)

[0074] 式（３）中、R^{21}は窒素原子又は炭化水素を表し、L^{21}は直接結合又は連結基を表し、R^{22}はシグナル物質の結合用基を表す。

[0075] 窒素原子又は炭化水素R^{21}が炭化水素である場合、R^{21}は、－Ｃ－R^{211}で表される炭化水素である。R^{211}としては特に限定されないが、例えば水素原子又はポリオキシアルキレン基を含んでよい炭素数１～８のアルキル基（例えば、Ｃ１－８アルキル基又はポリオキシＣ１～３アルキレンＣ１～８アルキル基）が挙げられ、好ましくは水素原子が挙げられる。

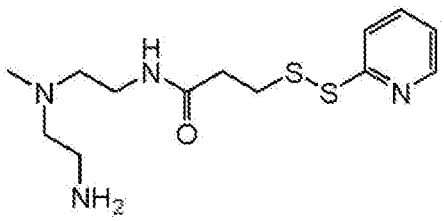
[0076] 直接結合又は連結基L^{21}としては、検出対象の分析用センサが検出対象を認識する時に、シグナル物質の結合用基R^{22}に結合するシグナル基４３と、特異的結合性分子の結合用基R^{1}に結合する特異的結合性基４２に対する検出対象の特異的認識との干渉をより効果的に抑制する観点から、連結基であることがより好ましい。

[0077] 直接結合又は連結基L^{21}が連結基である場合、当該連結基としては、ポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基（例えば、Ｃ１～８アルキレン基又はポリオキシＣ１～３アルキレンＣ１～８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。分子設計の観点等から、当該連結基としては、好ましくはポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基、より好ましくは炭素数１～６（好ましくは１～４、より好ましくは１～３、特に好ましくは２）のアルキレン基が挙げられる。

[0078] シグナル物質の結合用基R^{22}については、上記「１－３－３．シグナル物質の結合用基」で述べた通りである。

[0079] 上記式（１）で表される基の限定されない具体例として、以下の基が挙げられる。

[0080] [化10]



(1a)

[0081] ［１－３－５．相互作用基］

図４Ａに示す検出対象の分析センサ作製用基材１０ｃにおける相互作用基２５は、分子インプリント凹部２１ｃの鋳型における相互作用部位（後述の相互作用部位６５ｃ）と相互作用する基である。相互作用基２５に対応する鋳型（後述の相互作用部位６５ｃを有する鋳型）としては、タンパク質、糖タンパク質等の生体分子が挙げられる。

[0082] 相互作用基２５の具体例は、対応する鋳型の表面状態、つまり鋳型が有する相互作用基に応じて設計される。例えば、鋳型となるタンパク質又は糖タンパク質等を構成する特定のアミノ酸残基又は糖残基等との間で相互作用により水素結合、静電相互作用又は弱い共有結合等を形成可能な基、及び鋳型となる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。

[0083] 相互作用基２５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、及び／又は[7]ボロニル基（－Ｂ（ＯＨ）$_2$）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２５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。相互作用基２５と、対応する相互作用部位（後述の相互作用部位６５ｃ）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、下記表に示すが、これらに限定されるものではない。

[0084]

[表3]

3-1	3-2	3-3
相互作用基25	鋳型における相互作用部位65c	非共有結合的な結合の種類
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）	酸性アミノ酸残基 （カルボキシル基等）	非共有結合 （水素結合、静電相互作用）
酸性基 （カルボキシル基、スルホ基等）	塩基性アミノ酸残基 （アミノ基等）	非共有結合 （水素結合、静電相互作用）
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）	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）	非共有結合 （疎水性相互作用）
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）	疎水性領域	非共有結合 （疎水性相互作用）
ボロニル基	糖基（cisジオール基）	弱い共有結合 （ボロン酸cisジオールエステル基）

[0085] [1]置換又は無置換のアミノ基において、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。これらの置換又は無置換のアミノ基の中でも、好ましくは環状２級アミノ基が挙げられ、より好ましくはピロリジル基

が挙げられる。

[0086] [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。

[0087] [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。

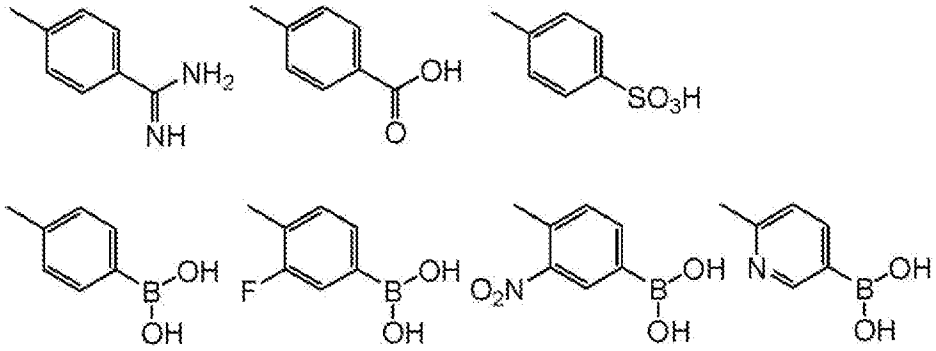
[0088] また、上記[1]～[7]の基から選択される２種以上の組み合わせを含む基としては、[1]～[7]の基のうちの１価の基である、[1]置換又は無置換のアミノ基、[251]含窒素アリール基、[252]非含窒素アリール基、[3]アミジノ基、[4]グアニジノ基、[5]カルボキシル基、[6]スルホ基、[7]ボロニル基と、[26]置換又は無置換のアリーレン基（[261]含窒素アリーレン基、[262]非含窒素アリーレン基）との組み合わせを含む基が挙げられる。

[0089] [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。

[0090] 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。

[0091]

[化11]



[0092] ［１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー］

分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃを構成するポリマーの構成成分としては特に限定されない。例えば、当該ポリマーは、生体適合性モノマー由来単位、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位、及び上記相互作用基２５を有する機能性モノマー由来単位からなる群より選択される構成単位を含む。なお、本明細書においては、鋳型を用いたインプリンティング重合によって合成されるポリマーを、便宜上、「分子インプリントポリマー」と記載するものとし、本開示では、鋳型として分子でないもの（たとえば膜構造を有する微小粒体）も許容するため、「分子インプリントポリマー」には、鋳型として分子ではないものを用いたインプリンティング重合によって合成されるポリマーも含まれるものとする。

[0093] （生体適合性モノマー由来単位）

分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃを構成するポリマーは、少なくとも生体適合性モノマー由来成分を含むことが好ましい。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。生体適合性モノマー（例えば、後述の生体適合性モノマーＭ２８として例示される）に由来する成分を含むことにより、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃ表面への非特異的吸着を良好に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。

[0094] 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

びカルボキシル基など）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級アンモニウム基など）に由来するカチオン基との両方を１分子中に含む。たとえば、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などが挙げられる。

[0095] より具体的には、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）などが挙げられる。

[0096] 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）などが挙げられる。

[0097] 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）などが挙げられる。

[0098] これらの双性イオンモノマーの中でも、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。

[0099] 分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃの全構成単位における生体適合性モノマー由来単位の割合としては、たとえば１モル％以上１００モル％以下が挙げられる。生体適合性モノマー由来単位の含有量が上記下限以上であることは、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃ表面における非特異性吸着を抑制する点で好ましい。また、上記生体適合性モノマー由来単位の割合の好ましい範囲は、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃの形状によって異なりうる。例えば、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃが膜状である場合、上記生体適合性モノマー由来単位の割合の好ましい範囲としては、３０モル

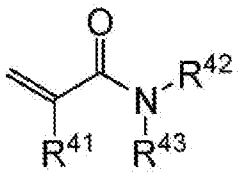
％以上、より好ましくは５０モル％以上、さらに好ましくは７０モル％以上、一層好ましくは８０モル％以上、より一層好ましくは９０モル％以上、特に好ましくは９５モル％以上が挙げられる。また、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃが粒子状である場合、上記生体適合性モノマー由来単位の割合の好ましい範囲としては、１～５０モル％、好ましくは２～３０モル％、より好ましくは３～１０モル％、さらに好ましくは４～６モル％、特に好ましくは４．５～５．５モル％が挙げられる。

[0100] （Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位）

分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃを構成するポリマーは、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位を含むことができる。特に、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃが粒子状である場合、構成ポリマーにＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位を含むことが好ましい。

[0101] Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド（例えば、後述の重合性モノマーＭ２９として例示される）は、下記式（４）で示される。

[0102] [化12]



(4)

[0103] 式（４）中、R^{41}は、水素又はメチル基、好ましくは水素を表し、R^{42}及びR^{43}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；また、R^{42}及びR^{43}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。

[0104] 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。

[0105] 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。

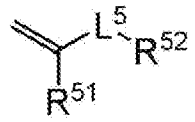
[0106] 分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃを構成するポリマーにＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位を含む場合、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃの全構成単位におけるＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位の割合としては、例えば１～９９モル％、好ましくは１０～９８モル％、より好ましくは３０～９６モル％、さらに好ましくは５０～９４モル％、一層好ましくは７０～９２モル％、より一層好ましくは８０～９０モル％、特に好ましくは８５～９０モル％が挙げられる。

[0107] （機能性モノマー由来単位）

分子インプリントポリマー２０ｃを構成するポリマーは、機能性モノマー由来単位を含む。機能性モノマーとしては、上記「１－３－５．相互作用基」で述べた相互作用基２５を有するモノマーであれば特に限定されない（例えば、後述の鋳型との相互作用基を含むモノマーＭ２５として例示される）。

[0108] 機能性モノマーの限定されない例として、下記式（５）に示すモノマーが挙げられる。

[化13]



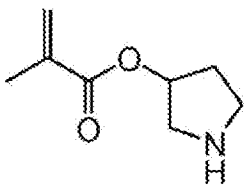
(5)

[0109] 式（５）中、R^{51}は、水素又はメチル基、好ましくは水素を表し、L^{5}は直接結合又は連結基を表し、R^{52}は、上記「１－３－５．相互作用基」で述べた相互作用基２５を表す。

[0110] 直接結合又は連結基L^{5}が連結基である場合、当該連結基としては、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（－Ｏ－）、カルボニル基（－Ｃ（＝Ｏ）－）、エステル基（－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－または－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－）、アミド基（－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－または－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－）、スルホキシド基（－Ｓ（＝Ｏ）－）、スルホニル基（－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－）、及びこれら２以上が結合した基が挙げられる。これらの連結基の中でも、好ましくはエステル基（－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ）が挙げられる。

[0111] 上記式（５）で表されるモノマーの限定されない具体例として、以下のモノマーが挙げられる。

[0112] [化14]



(5a)

[0113] 分子インプリントポリマー２０ｃにおいて、能性モノマー由来単位は、少なくとも凹部２１ｃ表面に存在する。分子インプリントポリマー２０ｃにおいて、能性モノマー由来単位は、凹部２１ｃ表面だけでなく、内部にも存在し得る。分子インプリントポリマー２０ｃを構成するポリマーの全構成単位における機能性モノマー由来単位の割合としては特に限定されず、対応する鋳型の表面状態（相互作用２５と相互作用する部位の数）に依存する。一例として、分子インプリントポリマー２０ｃを構成するポリマーの全構成単位における機能性モノマー由来単位の割合として、例えば１～３０モル％、好ましくは３～２０モル％、より好ましくは５～１０モル％、更に好ましくは６～８モル％が挙げられる。

[0114] （その他のモノマー由来単位）

分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂを構成するポリマーの凹部２１表面には、更に、特異的結合性分子の結合用基を与えるモノマー（後述の特異的結合性分子の結合用基及び重合性官能基を含むモノマーＭ２２）由来単位、及び／又はシグナル物質の結合用基を与えるモノマー（後述のシグナル物質の結合用基を与えるモノマーＭ２３$_1$，Ｍ２３$_2$）由来単位も存在することができる。特異的結合性分子の結合用基を与えるモノマー由来単位が存在する場合としては、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂが粒子状である場合が挙げられる。シグナル物質の結合用基を与えるモノマー由来単位が存在する場合としては、分子インプリントポリマー２０，２０ａ，２０ｂが膜状である場合が挙げられる。

[0115] ［１－３－７．基板］

基板３０の材料は、例えば、金属、ガラス、及び樹脂からなる群から選択される材料であってよい。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）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。

[0116] 基板３０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、基材２０は、ガラスまたは樹脂の表面に、金属膜が設けられたものであってもよい。また、基材２０の形状としては、板状及び粒子状を問わない。好ましい例としては、金基板、ガラス基板、金ナノ粒子、二酸化珪素粒子（シリカ粒子、ガラスビーズ等）等が挙げられる。

[0117] ［１－４．他の形態］

本開示の検出対象の分析用センサ作製用基材は、特異的結合性分子及びシグナル物質の少なくともいずれかがユーザによってカスタマイズされるように構成されていればよい。したがって、他の態様として、特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’の方に、標的に対する特異的結合性基４２がすでに結合していてもよい。この場合、ユーザはシグナル物質を自由に選択して導入することができる。

[0118] なお、更に他の態様として、シグナル物質の結合用基２３’、２３ｂ’の方に、すでにシグナル基４３が結合していてもよい。この場合、ユーザは検出対象を自由にターゲティングすることができ、ターゲットとする検出対象を自由に選択し、検出対象の標的に対する特異的結合性分子を導入することができる。

[0119] ［２．検出対象の分析用センサ］

本開示の分析用センサは、上述の検出対象の分析用センサ作製用基材と；前記特異的結合性分子の結合用基に結合した前記検出対象の標的に対する特異的結合性基とを含み、前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である。あるいは、本開示の分析用センサは、上述の検出対象の分析用センサ作製用基材と；前記特異的結合性分子の結合用基に結合した前記検出対象の標的に対する特異的結合性基とを含み、分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有するものである。また、本開示

の分析用センサは、上述の検出対象の分析用センサ作製用基材がシグナル物質の結合用基を有する場合は、シグナル物質の結合用基に結合したシグナル基も含む。

[0120] 本開示の分析用センサの例を、図１Ｂ－１、図１Ｂ－２、図２Ｂ－１、図２Ｂ－２、図３Ｂ、図４Ｂに、検出対象の分析センサ１０，１０$_1$，１０ａ，１０ａ$_1$，１０ｂ，１０ｃとして示す。図示されるとおり、検出対象の分析センサ１０，１０$_1$，１０ａ，１０ａ$_1$，１０ｂ，１０ｃは、検出対象の分析センサ作製用基材１０’，１０ａ’，１０ｂ’，１０ｃ’の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２’ｂに、少なくとも標的に対する特異的結合性基４２が結合しており、シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’にシグナル基４３が結合している。

[0121] また、本開示の分析用センサのより具体的な例を、図５（Ｂ）、図６（Ｂ）、図７（Ｂ）、図８（Ｂ１），（Ｂ２）、図９（Ｂ）、図１０（Ｂ）、図１１（Ｂ）に、検出対象の分析センサ１０－Ｃ，１０－Ｐ，１０－ＰＣ，１０ａ－Ｃ，１０ａ$_1$－Ｃ，１０ａ－Ｐ，１０ｃ－Ｐ，１０ｂ－ＰＣとして示す。図示されるとおり、検出対象の分析センサ１０－Ｃ，１０－Ｐ，１０－ＰＣ，１０ａ－Ｃ，１０ａ－Ｐ，１０ａ$_1$－Ｃ，１０ｃ－Ｐ，１０ｂ－ＰＣの標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’，２２ｂ’に、少なくとも標的に対する特異的結合性基４２が結合しており、シグナル物質の結合用基２３’，２３ｂ’にシグナル基４３が結合している。

[0122] ［２－１．検出対象］

本開示の分析用センサの検出対象は、標的を含み、その標的が特異的結合性基４２への特異性結合能を有するものであれば原理上特に限定されるものではない。

[0123] 検出対象と標的との関係については、検出対象が標的そのもの（つまり、検出対象が標的からなっているもの；以下において、「態様１」とも記載する）であってもよいし、検出対象（例えば、後述の検出対象７０）の一部が標的（例えば、後述の標的７２）で構成されているもの（以下において、「

態様２」とも記載する）であってもよい。

[0124] 検出対象（態様１）又は検出対象の標的（態様２）の化学種としては特に制限されず、例えば、生物に由来しない低分子有機化合物及び高分子化合物、生物に由来する低分子有機化合物及び高分子化合物が挙げられる。これらの化学種の中でも好ましくは生物に由来する低分子有機化合物及び高分子化合物が挙げられ、より好ましくは動物に由来する低分子有機化合物及び高分子化合物が挙げられ、具体的には、糖又は糖鎖；脂質（例えばンリン脂質等）；糖タンパク質又は糖ペプチド；タンパク質又はペプチド；ヌクレオチド又はポリヌクレオチド等が挙げられる。

[0125] 由来元の生物としては、ヒト及びヒト以外の動物が挙げられ、ヒト以外の動物としては、脊椎動物が挙げられ、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。

[0126] また、検出対象（態様１）又は検出対象の標的（態様２）の機能種としても特に限定されず、血漿タンパク質、疾患マーカー、抗原、抗体、受容体、プリオン、膜構造を有する微小粒体等が挙げられる。また、膜構造を有する微小粒体を検出対象とする場合（態様２）、その標的としては、膜構造を有する微小粒体の表面に発現している、抗原、抗体、受容体、及び／又は疾患マーカー；膜構造を有する微小粒体が当該膜構造の内部に発現している、抗原、抗体、受容体、及び／又は疾患マーカー；並びに、膜構造を有する微小粒体が分泌する、抗原、抗体、受容体、及び／又は疾患マーカー等が挙げられる。

[0127] 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。疾患マーカーとしては、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）、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）が挙げられる。

[0128] 膜構造を有する微小粒体としては、細胞外小胞、細胞内小胞、オルガネラ、及び細胞が挙げられる。膜構造としては、脂質二重膜構造が挙げられる。細胞外小胞としては、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等が挙げられる。細胞内小胞としては、リソソーム、エンドソーム等が挙げられる。オルガネラとしては、ミトコンドリア等が挙げられる。細胞としては、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）等の癌細胞、その他の疾患関連細胞等が挙げられる。これらの膜構造を有する微小粒体の中でも、好ましくは細胞外小胞及び細胞が挙げられ、より好ましくはエクソソーム、癌関連細胞が挙げられる。

[0129] エクソソームの表面に発現している標的（エクソソーム特異的抗原又はエクソソーム抗原）としては、ＣＤ６３、ＣＤ９、ＣＤ８１、ＣＤ３７、ＣＤ５３、ＣＤ８２、ＣＤ１３、ＣＤ１１、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、Ｒａｂ５、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ、ＬＡＭＰ１、ＥｐＣＡＭ、ＨＥＲ２等のタンパク質；脂質；糖鎖等が挙げられる。

[0130] 癌細胞の表面に発現している標的（癌細胞特異的抗原）としては、Ｃａｖｅｏｌｉｎ－１、ＥｐＣＡＭ、ＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬ、Ｇａｌｅｃｔｉｎｅ３、ＣＤ１５１、Ｔｅｔｒａｓｐａｎｉｎ ８、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＲＰＮ２、ＣＤ４４、ＴＧＦ－β等のタンパク質；脂質；糖鎖等が挙げられる。

[0131] なお、後述のように、シグナル物質Ｒ４３を、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を引き起こす蛍光色素ペアの一方として構成する場合は、検出対象の標的には、予め当該蛍光色素ペアの他方を結合させておく。

[0132] ［２－２．検出対象の標的に対する特異的結合性基］

本開示において、特異的結合性基４２は、小型物質基であり、好ましくは分子量４５，０００以下の特異的結合性タンパク質基又はペプチド基である。分子量は、理論分子量（calculated molecular mass）を意味する。

[0133] 一つの実施形態では、小型物質基とは、分子量が、抗体より小さな分子が代表的であり、１５万未満の物質、好ましくは１０万以下の物質、より好ましくは４５，０００以下、さらに好ましくは２２，０００以下、一層好ましくは１６，０００以下、より一層好ましくは１０，０００以下の基であり、任意の物質が使用されるが、好ましくは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドであり得る。

[0134] 本開示においては、分子インプリント凹部内に設ける特異的結合性基４２として分子量が小さいものを選択することで、当該特異的結合性基４２の標的に対する生来的な結合能（分子インプリント凹部に設けられていない状態、例えば、遊離状態又は平面状に固定されている場合における結合能）に比べ、標的当たりの結合能が顕著に高められる（つまり、解離定数Ｋｄが顕著に低下する）。このような効果をより一層高める観点から、特異的結合性基４２の分子量としては、好ましくは４０，０００以下、より好ましくは３０．０００以下、さらに好ましくは２２，０００以下、一層好ましくは１６，０００以下、より一層好ましくは１０，０００以下、特に好ましくは８，０００以下が挙げられる。

[0135] 特異的結合性基４２は、検出対象の標的に対する特異的結合能を有し、且つ、小型物質基（但し、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、ｓｃＦｖは除外される）である限りにおいて特に限定されるものではない。特異的結合性基４２は、特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）によって導入される基であり、当該特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）の具体例としては、抗体ミメティック、リン脂質結合性タンパク質、及びレクチン等が挙げられる。これらの特異性結合性分子は、市販のもの又は当業者が当該技術分野の公知情報（例えばライブラリ情報等）を利

用して適宜作製又は選択できるものであり、当業者であれば容易に取得することができる。

[0136] ナノボディ（ＶＨＨ抗体）は、天然重鎖抗体構造を有し、単一の可変ドメイン（ＶＨＨ）及び２つの定常ドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）を含有する。具体的なナノボディとしては、抗ＥＧＦＲナノボディ、抗ＨＥＲ２ナノボディ、抗ＭＵＣ１ナノボディ、抗インテグリンナノボディ、抗ＴＮＦナノボディ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0137] 抗体ミメティックは、抗体と同様に抗原と特異的に結合することができるが、抗体とは構造的に関連しない任意の物質であり、（抗体結合ドメインを有しない）有機化合物が例示される。具体的な抗体ミメティックとしては、アフィボディ（足場タンパク質：プロテインＡのＺドメイン、分子量：約６，０００、非限定的具体例：抗Ｈｅｒ２アフィボディ、抗ＥＧＦＲアフィボディ、抗ＴＮＦ－αアフィボディ、抗ＨＳＡアフィボディ、抗トランスフェリンアフィボディ、抗フィブリノーゲンアフィボディ、抗ＩｇＭアフィボディ等）；アフィリン（足場タンパク質：γＢ－クリスタリン又はユビキチン、分子量：約２０，０００又は約１０，０００）；アフィマー（足場タンパク質：シスタチン、分子量：約１２，０００～１４，０００）；アフィチン（足場タンパク質：Ｓａｃ７ｄ、分子量：約７，０００）；アルファボディー（足場タンパク質：三重らせんコイルドコイル、分子量：約１０，０００）；アンチカリン（足場タンパク質：リポカリン、分子量：約２０，０００、非限定的具体例：抗ＣＴＬＡ－４アンチカリン、抗ＶＥＧＦアンチカリン等）；アビマー（足場タンパク質：膜受容体ドメイン、分子量：約９，０００～１８，０００）；ＤＡＲＰｉｎｓ（足場タンパク質：アンキリンリピートモチーフ、分子量：約１０，０００～１９，０００）；ファイノマー（足場タンパク質：ＦｙｎのＳＨ３ドメイン、分子量：約７，０００）；クニッツドメインペプチド（足場タンパク質：プロテアーゼ阻害剤のクニッツドメイン、分子量：約６，０００）；モノボディ（アドネクチンともいう。足場タンパク質：フィブロネクチンの１０番目のIII型ドメイン、分子量：約１０

，０００、非限定的具体例：抗ＥＧＦＲ１モノボディ、抗ＨＥＲ２のモノボディ等）；ｎａｎｏＣＬＡＰ（足場タンパク質：炭水化物結合モジュール３２－２（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ　ＮａｇＨ）、分子量：約１６，０００）、ナノボディ（例えば、ラクダやアルパカのもつVHH抗体の組換えタンパク質）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0138] リン脂質結合性タンパク質は、リン脂質に結合活性を示すタンパク質である。具体的なリン脂質結合性タンパク質の例としては、エベクチン２、アネキシンＡ２、アネキシンＶ、Ｔｉｍ４等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0139] レクチンは、糖鎖に結合活性を示すタンパク質である。具体的なレクチンの例としては、Ｃ型レクチン、キナーゼ様レクチン、Ｆボックスレクチン、Ｆ型レクチン、フィコリン・マンノース結合レクチン、ガレクチン、Ｘ－レクチン、Ｌ型レクチン、M型レクチン、Ｐ型レクチン、Ｒ型レクチン、タキレクチン、シアル酸結合レクチン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0140] タンパク質、ペプチド以外の検出対象の標的に対する特異的結合能を有する物質は、例えば以下のものが挙げることができる。

糖：糖としては、D-グルコースが、α-1,4グリコシド結合により連結した環状オリゴ糖であるα-シクロデキストリン（D-グルコースが6個連結）、β-シクロデキストリン（D-グルコースが７個連結）、γ-シクロデキストリン（D-グルコースが８個連結）がある。これらの環状構造の内部は疎水性の空洞となっている。その空洞サイズに合った分子を認識して疎水性相互作用で包接することから、検出対象の標的に対する特異的結合能を有する分子として用いることができる。；

硫酸基が付加した2糖の繰り返し構造をもつグリコサミノグルカン：例えば、ヒアルロン酸は、膜タンパク質であるCD44を認識して結合することから、CD44に対して特異的結合能を有する分子として使用可能である。別の例として

、ヘパリンは、細胞表面に存在し、ヘパリンバインディングドメインを有する種々の細胞外マトリクスタンパク質と相互作用している。従って、ヘパリンバインディングドメインをもつタンパク質に対する特異的結合能を有する分子として使用可能である。また、ペプチドに糖鎖が結合したプロテオグリカンも多く見られ、検出対象の標的に対する特異的結合能を有する分子として使用可能である。；

脂質：脂質は、例えば、リン酸エステルをもつリン脂質は、様々な官能基がリン酸エステルで結合可能で、リン脂質は、様々な生体分子と相互作用可能であることから、検出対象の標的に対する特異的結合能を有する分子として使用可能である。；

核酸：核酸は、特定の分子と特異的に結合する核酸分子として核酸アプタマーが知られている。in vitro selection法で自在に製造可能で、有機小分子や蛋白質、核酸、細胞、細胞組織、微生物といった様々な目標と特異的に結合するものが報告されていることから、検出対象の標的に対する特異的結合能を有する分子として使用可能である。

[0141] 本開示の分析用センサは、特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）の標的に対する生来的な結合能が、抗体の生来的な結合能より劣る（解離定数Ｋｄが抗体より大きい）ものであっても、分子インプリント凹部２１，２１ｃ内に特異的結合性基４２を設けることによって、標的当たりの結合能が顕著に高められ（つまり、解離定数Ｋｄが顕著に低下し）、その顕著に向上した結合能は、分子インプリント凹部２１，２１ｃ内に抗体を導入した場合の標的当たりの当該抗体の結合能をしのぐことさえある。つまり、本開示の分析用センサによれば、抗体よりも結合能が劣る特異的結合性基４２を分子インプリント凹部２１，２１ｃ内に導入しても、抗体を分子インプリント凹部２１，２１ｃ内に導入した分析用センサを上回る感度を発現させることが可能になる。このような観点から、本開示の分析用センサにおける特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）の一例として、それ自体の生来的な結合能

が、抗体の生来的な結合能より劣る（解離定数Ｋｄが抗体より大きい）ものが挙げられる。しかしながら、本開示の分析用センサは、標的当たりの特異的結合性基４２の結合能を顕著に高めるものであるため、特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）として、変異等の結合能を高める改変を施すことで、その生来的な結合能を高めたものを用いてもよい。

[0142] なお、図１Ｂ－２に示す検出対象の分析センサ10_1のように、特異的結合性基４２は、シグナル基４３がさらに結合した基（シグナル基を有する特異的結合性基）４４であってもよい。このようなシグナル基を有する特異的結合性基４４の具体例としては、特異的結合性基４２がシグナル基４３を修飾基として有する修飾タンパク質又はペプチド；特異的結合性基４２と、タンパク質又はペプチドであるシグナル基４３とが融合した融合タンパク質又はペプチド等が挙げられる。このようにシグナル基を有する特異的結合性基４４における特異的結合性基４２の生来的な結合能は、シグナル基４３の存在の影響によって、シグナル基４３を有しない特異的結合性基４２（例えば、図１Ｂ－１、図２Ｂ－１、図３Ｂ、図４Ｂの分析用センサ１０，１０ａ，１０ｂ，１０ｃにおける特異的結合性基４２）の生来的な結合能よりも劣る。しかしながら、本開示の分析用センサは感度向上効果に優れているため、シグナル基を有する特異的結合性基４４のように生来的な結合能が落ちている特異的結合性基を用いても、効果的に結合能を向上させ、優れた感度向上効果を奏することができる。本開示においては、図１Ｂ－２に示す検出対象の分析センサ10_1のように、特異的結合性基４２とシグナル基４３とを有する基４４を用いても、優れた感度（低い解離定数）での分析が可能であるが、再現性向上及び／又は検出限界値の引き下げの観点からは、シグナル基４３と特異的結合性基４２とは、互いに結合した態様よりも、図２Ｂに示すように分子インプリントの凹部の表面方向に離間しているか、図３Ｂに示すように機能性基２４ｂ（図３Ａ参照）を介在していることが好ましい。

[0143] さらに、図２Ｂ－２に示す検出対象の分析センサ$10a_1$のように、特異的

結合性基４２は、他のシグナル基ｓｇがさらに結合した基（他のシグナル基を有する特異的結合性基）４２$_1$であってもよい。上記の図１Ｂ－２に示す特異的結合性基４２に結合しているシグナル基４３が検出対象の分析センサ１０$_1$のセンシングに用いられることに対し、この図２Ｂ－２に示す特異的結合性基４２に結合している他のシグナル基ｓｇは、検出対象の分析センサ１０ａ$_1$のセンシングには用いられない点で異なる。特異的結合性基４２の分子量が小さいため、他のシグナル基ｓｇは、特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子（後述の特異的結合性分子Ｒ４２）のハンドリングを容易にする等の観点で付与されているに過ぎず、図２Ｂ－２に示す検出対象の分析センサ１０ａ$_1$のセンシングには、他のシグナル基ｓｇではなくシグナル基４３が用いられる。

[0144] このような他のシグナル基を有する特異的結合性基４２$_1$の具体例としては、特異的結合性基４２が他のシグナル基ｓｇを修飾基として有する修飾タンパク質又はペプチド；特異的結合性基４２と、タンパク質又はペプチドである他のシグナル基ｓｇとが融合した融合タンパク質又はペプチド等が挙げられる。このように他のシグナル基を有する特異的結合性基４２$_1$における特異的結合性基４２の生来的な結合能は、他のシグナル基ｓｇの存在の影響によって、他のシグナル基ｓｇを有しない特異的結合性基４２（例えば、図１Ｂ－１、図２Ｂ－１、図３Ｂ、図４Ｂの分析用センサ１０，１０ａ，１０ｂ，１０ｃにおける特異的結合性基４２）の生来的な結合能よりも劣る。しかしながら、本開示の分析用センサは感度向上効果に優れているため、他のシグナル基を有する特異的結合性基４２$_1$のように生来的な結合能が落ちている特異的結合性基を用いても、効果的に結合能を向上させ、優れた感度向上効果を奏することができる。

[0145] ［２－３．シグナル基］

シグナル基４３は、検出対象の標的と当該標的に対する特異的結合性基４２との結合情報を読み出すものとして機能する。シグナル基４３としては、分子インプリント凹部２１，２１ｃにおいて標的の結合により検知されるシ

グナル強度が変化したり、スペクトルが変化（例えばピークがシフト）したりするものであれば特に限定されない。たとえば、シグナル基４３を与えるシグナル物質（後述のシグナル物質Ｒ４３）としては、蛍光物質、放射性元素含有物質、磁性物質等が挙げられる。検出容易性等の観点から、シグナル物質としては蛍光物質であることが好ましい。蛍光物質としては、フルオレセイン色素、インドシアニン色素等のシアニン色素（ＤＹ６４７、Ｃｙ５、ＤＹ４９０等）、ローダミン色素（ＣＲ１１０、ＴＡＭＲＡ）、クマリン色素、ＥｖｏＢｌｕｅ色素、オキサジン色素（ＡＴＴＯ）、カルボピロニン色素、Ａｌｅｘａ色素、等の蛍光色素；ＧＦＰ等の蛍光タンパク質；金コロイド、量子ドット等のナノ粒子等が挙げられる。放射性元素含有物質としては、^{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^{19}ＦＭＲＩプローブなどが挙げられる。磁性物質としては、フェリクロームなどの磁性体を有するもの、フェライトナノ粒子、ナノ磁性粒子等が挙げられる。上記のシグナル物質の中でも、検出限界及び／又は感度を一層向上させる観点から、ローダミン色素が好ましい。

[0146] また、シグナル基４３は、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を引き起こす蛍光色素ペアの一方として構成することができる。ＦＲＥＴを引き起こす蛍光色素ペアとしては特に限定されず、シグナル基４３としてドナー色素及びアクセプター色素のいずれを選択するかも限定されない。好ましくは、シグナル基４３としてドナー色素を選択することができる。ＦＲＥＴを引き起こす蛍光色素のペアを構成するドナー色素／アクセプター色素の組み合わせの具体例としては、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）／テトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７／Ｃｙ５．５、ＨｉＬｙｔｅ　Ｆｌｕｏｒ６４７／Ｃｙ５．５、Ｒ－フィコエリトリン（Ｒ－ＰＥ）／アロフィコシアニン（ＡＰＣ）等が挙げられる。

[0147] ［２－４．用途］

本開示の分析用センサは、検出対象のセンシングに用いられる。より具体

的な用途としては、特異的結合性基の種類に応じて決定されるが、例えば、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目的又は治療モニタリング等の目的で用いることができる。

[0148] また、本開示の分析用センサは、分子インプリントポリマーが粒子であり且つ基板に固定されていない態様の場合、センシング試薬として、液状又は固形状（例えば粉末状）に製剤されていてもよい。センシング試薬は、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、滑沢剤等が挙げられる。

[0149] センシング用試薬は、本開示の分析用センサと、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。

[0150] センシング試薬の用途の一例としては、上記したものの他、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。

[0151] ｉｎ ｖｉｔｒｏイメージングの一例として、細胞内又は表面の検出対象に対応するセンシング試薬を作製し、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分子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。

[0152] ｉｎ ｖｉｖｏイメージングの一例として、体内に存在する検出対象に対応するセンシング試薬を作製し、実験動物、ヒト等の動物の循環器、例えば血液に投与し、検出対象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。ｉｎ ｖｉｖｏイメージングに用いられるセンシング試薬は、検出対象が血漿タンパク質（特にアルブミン）以外のものである場合、図１０（Ｂ）に示す分析用センサ１０ｃ－Ｐを有効成分として構成されることが好ましい。この場合、分析用センサ１０ｃ－Ｐは、分子インプリント凹部２１ｃが血漿タンパク質（特にアルブミン）を鋳型として型取られたものであり、且つ、相互作用基２５が当該血漿タンパク質（特にアルブミン）

の表面と特異的に相互作用する基として設計される。このようなｉｎ　ｖｉｖｏイメージングに用いられるセンシング試薬は、検出対象を腫瘍マーカーとして構成する場合、手術前に注射して手術中に腫瘍をｉｎ　ｖｉｖｏイメージングするナビゲーションドラッグとして用いることができる。

[0153] ［３．検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法］

本開示の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法としては、分子インプリントポリマーを合成し且つ分子インプリント凹部内に所定の官能基を導入する方法を特に制限なく用いることができる。以下に、本開示の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法のいくつかの例を挙げる。

[0154] ［３－１．基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法］

例えば、図５（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｃ’の製造方法は、以下の工程（１－１）～工程（１－４）を含む。

[0155] ・基板に、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）；

・前記特異的結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）；

・重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）；及び

・前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記特異的結合性分子の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）。

但し、前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である。

[0156] また、図５（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｃ’に更にシグナル物質の結合用基２３’を含む、図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法は、更に以下の限定が加わる。

[0157] ・前記工程（１－３）の前に、前記鋳型の表面を、第２の可逆的連結基を介して重合性官能基で修飾する修飾工程を含み；

・前記工程（１－３）において、前記重合性モノマー及び前記重合性官能基を基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、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し；

・前記工程（１－４）において、前記第１の可逆的連結基及び前記第２の可逆的連結基を開裂させてそれぞれ前記特異的結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する。

[0158] 図１２－１～図１２－５に、図８（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法を模式的に示す。具体的には、図１２－１（図１２－１ａ及び図１２－２ｂ）、図１２－２、図１２－３、図１２－４、並びに図１２－５は、それぞれ、鋳型を用意する工程、工程（１－１）、工程（１－２）、工程（１－３）、及び工程（１－４）を模式的に示す。つまり、図示された態様において、検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’を製造する方法は、以下の工程を含む。

[0159] （ｉ）

・基板３０に、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’と重合開始性基ＩＮＩとを表面に有する単分子膜ＳＡＭを形成する単分子膜形成工程（１－１）；・特異的結合性分子の結合用基２２’に対し、第１の可逆的連結基２２を介して、鋳型６０を導入する工程（１－２）；

・重合性モノマーＭ２８を加え、重合性モノマーＭ２８を基質とし、重合開始性基ＩＮＩを重合性開始剤として、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０ａを合成することで基板３０表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）；

・第１の可逆的連結基２２を開裂させて特異的結合性分子の結合用基２２’へ変換するとともに鋳型６０を除去する工程（１－４）；但し、

（ｉｉ）

・鋳型６０の表面を、第２の可逆的連結基２３を介して重合性官能基２７で

修飾する修飾工程を含み；

・前記工程（１－３）において、重合性モノマーＭ２８及び重合性官能基２７を基質とし、重合開始性基ＩＮＩを重合性開始剤として、鋳型６０の前記表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０ａを合成し；

・前記工程（１－４）において、第１の可逆的連結基２２及び前記第２の可逆的連結基２３を開裂させてそれぞれ特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質の結合用基２３’へ変換するとともに鋳型６０を除去する。

[0160] 以下、各工程について図を参照しながら詳述する。なお、以下に詳述する基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法から、上記の（ＩＩ）の限定を除外すれば、図５（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｃ’の製造方法となる。

[0161] ［３－１－１．鋳型を用意する工程］

以下の図１２－２～図１２－５に示す基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’の製造方法で用いる鋳型は、必要に応じて、適当な表面修飾がなされたものとして用意する。

[0162] （鋳型）

鋳型６０は、検出対象又は検出対象の標的と同じ物質であってもよいし、検出対象又は検出対象の標的とは異なる物質であってもよい。また、検出対象又は検出対象の標的とは異なる物質である場合における鋳型６０としては、生体分子であってもよいし、粒子コア（人工粒子とも呼ばれている。）であってもよい。

[0163] 生体分子としては、好ましくは血漿タンパク質（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。また、生体分子の分子量としては、特異的結合性基４２の分子量の例えば１．８～１５倍、好ましくは３～１４倍、より好ましくは４～１３．５倍、７～１３倍、８～１２．５倍、又は１０～１２倍が挙げられる。より好ましい生体分子としては、アルブミンが挙げられる。

[0164] 粒子コアとしては、分子インプリントにおける鋳型として用いることがで

きる限度において特に限定されず、人工的に製造された無機粒子及び有機粒子が挙げられる。無機粒子としては、金属、金属の酸化物、窒化物、フッ化物、硫化物、ホウ化物、及びそれらの複合化合物、並びに、ハイドロキシアパタイト等が挙げられ、好ましくは、二酸化珪素（シリカ）が挙げられる。また、有機粒子としては、ラテックス硬化物、デキストラン、キトサン、ポリ乳酸、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリスチレン、ポリエチレンイミン等が挙げられる。

[0165] 図１２－２～図１２－５に示す態様においては、鋳型６０として、粒子コアを用いることが好ましい。粒子コアは、工業生産品であり粒径制御されていることから、分析用センサ作製用基材に形成する凹部のサイズの制御及び均質化が容易であり、得られる分析用センサ作製用基材から、より一層分析特性に優れた分析用センサを作製することができる点で好ましい。また、粒子コアとしては、表面に所望の結合性基を有するよう表面改質されたものを用いることができる。

[0166] 分子インプリント凹部２１の大きさが鋳型６０の大きさに依存するため、鋳型６０の大きさは検出対象又は検出対象の標的の大きさに応じて適宜決定することができる。目的の検出対象又は検出対象の標的を受け入れるための凹部２１を形成するためには、当該検出対象又は検出対象の標的と同程度か又はそれ以上の大きさを有する鋳型６０を用いればよい。例えば、鋳型６０の平均粒子径としては、例えば１ｎｍ～１０μｍ、好ましくは５０～１μｍ、より好ましくは１００～５００ｎｍ、さらに好ましくは１５０～２５０ｎｍ、一層好ましくは１８０～２２０ｎｍが挙げられる。あるいは、鋳型６０の平均粒子径をＲ（ｎｍ）、特定基結合性基４２の分子量をＭとすると、鋳型６０の平均粒子径としては、パラメータＲ／Ｍが、例えば０．００５～０．０５、好ましくは０．０１～０．０４、より好ましくは０．０１２～０．０３５、０．０１３～０．０３５、０．０２～０．０３５、又は０．０３～０．０３４を満たす粒子径が挙げられる。なお、平均粒子径とは、動的光散乱法により測定されるＺ平均粒子径を指す。

[0167] （鋳型の表面修飾）

鋳型６０は、図１２－１ａ、図１２－１ｂの鋳型６０_1、鋳型６０_2として示すように、その表面が結合性基２２’’で修飾された形態で用意することができる。

[0168] このような鋳型を用意する方法としては、図１２－１ａに示すように、鋳型６０_1の表面を、結合性基２２’’に加えて結合性基２３’’で修飾する態様、及び、図１２－１ｂに示すように、鋳型６０_2の表面を、結合性基２２’’に加えて可逆的連結基２３を介して重合性官能基で修飾する方法等が挙げられる。

[0169] たとえば、図１２－１ａの例では、表面に結合性基ＢＧ２２’’と結合性基ＢＧ２３’’とを有する鋳型６０_1を用い、結合性基ＢＧ２２’’に対応する結合性基ＢＧ２２’と結合性基２２’’とを含む分子、及び、結合性基ＢＧ２３’’に対応する結合性基ＢＧ２３’と結合性基２３’’とを含む分子を適宜反応させ、これによって、表面に結合性基２２’’に加えて結合性基２３’’で修飾された鋳型６０_1を得る。

[0170] 図１２－１ａにおいて、結合性基ＢＧ２２’’としては特に限定されないが、例えば、上記表２の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはカルボキシル基が挙げられる。結合性基ＢＧ２２’としても特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄で示される基が挙げられ、好ましくは、結合性基ＢＧ２２’としてアミノ基が挙げられる。結合性基２２’’としては特に限定されず（但し、結合性基ＢＧ２２’とは異なる基）、上記表１の第１－２欄で示される基が挙げられ、好ましくはポリヒスチジンタグが挙げられる。また、結合性基ＢＧ２３’’としては特に限定されないが、例えば、上記表２の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはカルボキシル基が挙げられる。結合性基ＢＧ２３’としても特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄で示される基が挙げられ、好ましくは、結合性基ＢＧ２３’としてアミノ基が挙げられる。結合性基２３’’としては特に限定されず（但し、結合性基２２’とは異なる基）、上記表１の第１－２欄で示される基

が挙げられ、好ましくはチオール基が挙げられる。

[0171] また、図１２－１ｂの例では、表面に結合性基ＢＧ２２’’と結合性基ＢＧ２３’’とを有する鋳型６０$_2$を用い、結合性基ＢＧ２２’’に対応する結合性基ＢＧ２２’と結合性基２２’’とを含む分子、及び、結合性基ＢＧ２３’’に対応する結合性基ＢＧ２３’と第２の可逆的連結基２３と重合性官能基２７とを含む重合性モノマーＭ２３$_2$を適宜反応させ、重合性官能基２７及び第２の可逆的連結基２３、並びに第１の可逆的連結基２２を形成可能な結合性基２２’’を有する鋳型６０$_2$を得る。図１２－１ｂの例では、鋳型を用意する工程に、鋳型６０の表面を第２の可逆的連結基２３を介して重合性官能基２７で修飾する修飾工程が含まれる。

[0172] 図１２－１ｂにおいて、結合性基ＢＧ２２’’としては特に限定されないが、例えば、上記表２の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはカルボキシル基が挙げられる。結合性基ＢＧ２２’としても特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄で示される基が挙げられ、好ましくは、結合性基ＢＧ２２’としてアミノ基が挙げられる。また、結合性基２２’’としては特に限定されず（但し、結合性基ＢＧ２２’とは異なる基）、上記表１の第１－２欄で示される基が挙げられ、好ましくはポリヒスチジンタグが挙げられる。結合性基ＢＧ２３’’としても特に限定されず、例えば、上記表１の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはアミノ基が挙げられる。重合性モノマーＭ２３$_2$における結合性基ＢＧ２３’としても特に限定されず、例えば、上記表１の第２－２欄で示される基が挙げられ、好ましくはカルボン酸活性エステル基が挙げられる。第２の可逆的連結基２３としても特に限定されず、例えば、上記表１の第１－３欄で示される基が挙げられ、好ましくはジスルフィド結合が挙げられる。

[0173] 図１２－１ｂにおいて、重合性官能基２７としては、ビニル基を含有していればよく、好ましくは（メタ）アクリロイル基が挙げられる。

[0174] 図１２－１ｂに示すように、予め、表面に結合性基ＢＧ２３’’を有している鋳型６０$_2$を用いることで、第２の可逆的連結基２３を鋳型６０の表面の

みにデリバリすることができる。

[0175] 以上のようにして、表面が結合性基２２’’（及び必要に応じて結合性基２３’’又は第２の可逆的連結基を介した重合性官能基２７）で修飾された鋳型６０$_1$，６０$_2$（以下において、まとめて「鋳型６０」とも記載する）を得ることができる。

[0176] なお、鋳型６０として採用する物質によっては、生得的に、結合性基２２’’を有しているものもある（例えば、鋳型として糖タンパク質を選択する場合、糖タンパク質が生得的に有している糖基を結合性基２２’’として用いることができる場合がある、等）。このような場合、鋳型６０には上述のような工程は要しない。

[0177] ［３－１－２．工程（１－１）］

工程（１－１）では、図１２－２に示すように、基板３０に、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’と重合開始性基ＩＮＩとを表面に有する単分子膜ＳＡＭを形成する。

[0178] 図示された例では、具体的にはまず、基材３０表面に、重合性開始基ＩＮＩと結合性基ＢＧ１’とを表面に有する単分子膜ＳＡＭを形成する。この単分子膜は、重合性開始基ＩＮＩを末端に有する分子と、重合性開始基ＩＮＩとは異なる結合性基ＢＧ１’を末端に有する分子とを用いた混成自己組織化による混成自己組織化単分子膜（mixed SAMs）として形成することができる。

[0179] 重合開始性基ＩＮＩとしては、重合開始剤として機能しうる構造を有していれば特に限定されず、後述の重合工程において用いる重合反応に応じて当業者が適宜決定することができる。例えば、重合開始性基ＩＮＩとしては、重合反応時にラジカルを発生する構造を有する基、具体的には有機ハロゲンに由来する炭素－ハロゲン結合基（－ＣＸ基；Ｘはハロゲン原子を示す。）、アゾ化合物に由来するアゾ基（－Ｒ－Ｎ＝Ｎ－Ｒ’－基）、RAFT剤に由来するRAFT重合用基（例えばチオカルボニルチオ基等）、およびTEMPOに由来する基が挙げられる。図示された態様では、重合開始性基ＩＮＩが－ＣＢｒ基

である場合を例示している。

[0180] 結合性基ＢＧ１’としては、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’を延設可能な基が適宜選択される。例えば、上記表２の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはアミノ基が挙げられる。結合性基ＢＧ１’に、特異的結合性分子の結合用基２２’を延設するための物質を結合させることで、単分子膜ＳＡＭの表面にさらに特異的結合性分子の結合用基２２’が導入される。例えば、特異的結合性分子の結合用基２２’を延設するための物質としては、特異的結合性分子の結合用基２２’を形成可能な基と結合性基ＢＧ１’に対応する結合性基ＢＧ１’’を有する分子、又は、特異的結合性分子の結合用基２２’と結合性基ＢＧ１’に対応する結合性基ＢＧ１’’を有する分子が挙げられる。結合性基ＢＧ１’に対応する結合性基ＢＧ１’’としては、例えば、上記表２の第２－２欄で示される基が挙げられる。図示された態様においては、特異的結合性分子の結合用基２２’を形成可能な基と結合性基ＢＧ１’に対応する結合性基ＢＧ１’’を有する分子の例として、アミノポリカルボン酸系キレート剤であるニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ）を用い、ＮＴＡを結合させることでＮＴＡ由来基を導入し、さらに、ＮＴＡ由来基にニッケルイオンを配位させることで、特異的結合性分子の結合用基２２’の限定されない一例であるニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基が形成される。

[0181] なお、図１２－２の例では、結合性基ＢＧ１’を表面に有する混成自己組織化単分子膜を一旦作成した後に、結合性基ＢＧ１’に結合性基ＢＧ２２’を延設することで、特異的結合性分子の結合用基２２’と重合開始性基ＩＮＩとを表面に有する単分子膜ＳＡＭを段階的に形成する態様を示したが、本開示はこの態様に限定されるものではない。例えば、基材３０表面に、重合性開始基ＩＮＩを末端に有する分子と、結合性基ＢＧ２２’とを末端に有する分子とを用いて混成自己組織化により混成自己組織化単分子膜（mixed SAMs）を形成することで、特異的結合性分子の結合用基２２’と重合開始性基ＩＮＩとを表面に有する単分子膜ＳＡＭを一段階で形成することもできる。

[0182] 以上のようにして、基板３０に、特異的結合性分子の結合用基２２’と重合開始性基ＩＮＩとを表面に有する単分子膜ＳＡＭが形成される。

[0183] ［３－１－３．工程（１－２）］

工程（１－２）では、図１２－３ａ及び図１２－３ｂに示すように、基板３０上の特異的結合性分子の結合用基２２’に対し、第１の可逆的連結基２２を介して、鋳型６０を導入する。

[0184] 第１の可逆的連結基２２は、基板３０上の特異的結合性分子の結合用基２２’と鋳型６０上の結合性基２２’との結合により形成されるものであり、例えば、上記表１の第１－３欄に示す基が挙げられ、好ましくは配位結合が挙げられる。

[0185] 図１２－３ａに示す例は、図１２－１ａで得た鋳型６０_1を用いる場合を示し、図１２－３ｂに示す例は、図１２－１ｂで得た鋳型６０_2を用いる場合を示している。

[0186] 図１２－３ａに示す例においては基板３０上の特異的結合性分子の結合用基２２’に対し、第１の可逆的連結基２２を介して、まだ重合性官能基２７が導入されていない状態の鋳型６０を導入し、その後、鋳型６０が基板３０に固定された状態で、シグナル物質の結合用基２３’及び重合性官能基２７を有する重合性モノマーＭ２３_1を用いて、基板３０に固定された鋳型６０_1の表面を修飾することができる。図１２－３ａの例では、鋳型を導入する工程の後に、鋳型６０の表面を第２の可逆的連結基２３を介して重合性官能基２７で修飾する修飾工程が含まれる。

[0187] 重合性モノマーＭ２３_1におけるシグナル物質の結合用基２３’については、「１－３－３．シグナル物質の結合用基」において述べた通りであり、好ましくはピリジルジスルフィド基が挙げられる。重合性官能基２７としては、ビニル基を含有していればよく、好ましくは（メタ）アクリロイル基が挙げられる。

[0188] ［３－１－４．工程（１－３）］

工程（１－３）では、図１２－４に示すように、重合性モノマーＭ２８を

加え、重合性モノマーＭ２８及び重合性官能基２７を基質とし、重合開始性基ＩＮＩを重合性開始剤として、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０ａを合成することで基板３０表面にポリマー膜を形成する。

[0189] 図示された例では、重合性モノマーとして１種類のみ示しているが、重合性モノマーとして複数種組み合わせて用いてもよい。また、重合性モノマーとしては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の中で述べた通りである。図示された例において用いられる重合性モノマーＭ２８は、好ましくは生体適合性モノマーであり、生体適合性モノマーについては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の「（生体適合性モノマー由来単位）」の中で述べたとおりである。

[0190] 基材３０表面上で、重合性官能基２７、重合性モノマーＭ２８、重合開始性基ＩＮＩ及び鋳型６０が共存する重合反応系が構築されることにより、表面開始原子移動ラジカル重合（ＳＩ－ＡＴＲＰ）が進行する。当該重合反応系には、さらに、重合触媒として、遷移金属または遷移金属化合物と配位子とから形成される遷移金属錯体を含むことが好ましく、さらに還元剤を用いることがより好ましい。

[0191] 遷移金属または遷移金属化合物としては、金属銅又は銅化合物が挙げられ、銅化合物としては塩化物、臭素化物、ヨウ素化物、シアン化物、酸化物、水酸化物、酢酸化物、硫酸化物、硝酸化物、好ましくは臭素化物が挙げられる。配位子としては、多座アミンが好ましく、具体的には二座～六座配位子が挙げられる。これらの中でも、好ましくは二座配位子が挙げられ、より好ましくは２，２－ビピリジル、４，４’－ジ－（５－ノニル）－２，２’－ビピリジル、Ｎ－（ｎ－プロピル）ピリジルメタンイミン、Ｎ－（ｎ－オクチル）ピリジルメタンイミン等が挙げられ、より好ましくは２，２－ビピリジルが挙げられる。

[0192] 還元剤としては、アルコール、アルデヒド、フェノール類及び有機酸化合

物等が挙げられ、好ましくは有機酸化合物が挙げられる。有機化合物としては、クエン酸、シュウ酸、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、アスコルビン酸エステル等が挙げられ、好ましくはアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、アスコルビン酸エステル等が挙げられ、より好ましくはアスコルビン酸が挙げられる。

[0193] 溶媒としては、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、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。

[0194] ラジカル発生源である重合開始性基ＩＮＩから重合性モノマーＭ２８を基質としてポリマー鎖が伸長し、ポリマー膜の厚みを増すと共に、伸長ポリマー鎖が鋳型６０表面に達すると、当該表面に修飾された重合性官能基２７も基質として取り込むことで、鋳型６０の表面形状に沿った形状の凹部２１が形成されるように分子インプリントポリマー２０ａが合成される。分子インプリントポリマー２０ａのポリマー膜は、基材３０に導入された鋳型６０の上下径（図面の上方を上とした場合）の１／３～１／２程度に相当する厚みまで成長させることができる。これによって、分子インプリントポリマー２０ａのポリマー膜が得られる。

[0195] ［３－１－５．工程（１－４）］

工程（１－４）では、図１２－５に示すように、第１の可逆的連結基２２を開裂させて標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’へ変換し、第２の可逆的連結基２３を開裂させてシグナル物質の結合用基２３’へ変換することで、鋳型６０を除去する。上述の表面修飾工程で第２の可逆的連結基２３が鋳型６０の表面のみにデリバリされているため、鋳型６０が除去された跡である分子インプリント凹部２１には、特異的結合性分子の結合用基２２’が残るとともに、凹部２１内にのみ、第２の可逆的連結基２３から生じたシグナル物質の結合用基２３’が配置される。これによって、分析用セン

サ作製用基材１０ａ－Ｃ’が得られる。

[0196] ［３－２．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－１］

例えば、図６（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法は、以下の工程（１－１１）～工程（１－１３）を含む。

[0197] ・表面が、第１の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（１－１１）；

・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（１－１２）と；及び

・前記第１の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し、前記特異的結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）。

但し、前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である。

[0198] 図１３－１～図１３－３に、図６（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’の製造方法を模式的に示す。具体的には、図１３－１、図１３－２、及び図１３－３は、それぞれ、工程（１－１１）、工程（１－１２）、及び工程（１－１３）を模式的に示す。つまり、図示された態様において、検出対象の分析用センサ作製用基材１０－Ｐ’を製造する方法は、以下の工程を含む。

[0199] ・表面が、第１の可逆的連結基２２を介して重合性官能基２７で修飾された、分子インプリントの鋳型６０を用意する工程（１－１１）；

・重合性官能基２７を基質とし、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０を合成する工程（１－１２）と；及び

・第１の可逆的連結基２２を開裂させて分子インプリントポリマー２０から鋳型６０を除去し、特異的結合性分子の結合用基２２’を生じる工程（１－１３）。

以下、各工程について図を参照しながら詳述する。

[0200] ［３－２－１．工程（１－１１）］

工程（１－１１）では、図１３－１（図１３－１ａ及び図１３－１ｂ）に示すように、表面が、第１の可逆的連結基２２を介して重合性官能基２７で修飾された、分子インプリントの鋳型６０を用意する。

[0201] 図１３－１ａでは、表面が結合性基２２’’で修飾された、分子インプリントの鋳型６０_1の表面を、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及び重合性官能基２７を含むモノマー$Ｍ２２_1$を作用させることで、結合性基２２’’と特異的結合性分子の結合用基２２’との反応で形成される第１の可逆的連結基２２を介して重合性官能基２７で修飾する。

[0202] 図１３－１ａにおいて、結合性基２２’’としては特に限定されないが、例えば上記表１の第１－２欄に示す基が挙げられ、好ましくはチオール基が挙げられる。重合性モノマー$Ｍ２２_1$における結合用基２２’としても特に限定されず、例えば上記表１の第１－１欄に示す基が挙げられ、好ましくはピリジルジスルフィド基が挙げられる。第１の可逆的連結基２２としても特に限定されず、例えば上記表１の第１－３欄に示す基が挙げられ、好ましくはジスルフィド結合が挙げられる。

[0203] また、図１３－１ｂの例では、表面に結合性基ＢＧ２２’’を有する鋳型６０_2を用い、結合性基ＢＧ２２’’に対応する結合性基ＢＧ２２’と第１の可逆的連結基２２と重合性官能基２７とを含む重合性モノマー$Ｍ２２_2$を反応させ、第１の可逆的連結基２２を介して結合性基２２’’で修飾された鋳型６０_2を得る。

[0204] 図１３－１ｂにおいて、結合性基ＢＧ２２’’としては特に限定されないが、例えば、上記表２の第２－１欄で示される基が挙げられ、好ましくはアミノ基が挙げられる。重合性モノマー$Ｍ２２_2$における結合性基ＢＧ２２’としても特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄で示される基が挙げられ、好ましくは、結合性基ＢＧ２２’としてカルボン酸活性エステル基が挙げられる。また、第１の可逆的連結基２２としても特に限定されず、例えば、上記表１の第１－３欄で示される基が挙げられ、好ましくはジスルフィ

ド結合が挙げられる。

[0205] 図１３－１ａ及び図１３－１ｂにおいて、重合性官能基２７としては、ビニル基を含有していればよく、好ましくは（メタ）アクリロイル基が挙げられる。

[0206] 図１３－１ａ及び図１３－１ｂにおいて、鋳型６０$_1$，鋳型６０$_2$（以下、まとめて「鋳型６０」と記載する）については、上記「３－１－２．鋳型及び修飾工程」の「（鋳型）」で述べた通りである。

[0207] 以上のようにして、表面に、第１の可逆的連結基２２を介した重合性官能基２７で修飾された鋳型６０を得る。

[0208] ［３－２－２．工程（１－１２）］

工程（１－１２）では、図１３－２に示すように、重合性官能基２７を基質とし、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０を合成する。

[0209] 図示された態様では、重合性モノマーとしてＭ２８及びＭ２９を用いる例を示しているが、重合性モノマーとして３種以上組み合わせて用いてもよい。また、重合性モノマーとしては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の中で述べた通りである。図示された例において用いられる重合性モノマーＭ２８は生体適合性モノマーであり、生体適合性モノマーについては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の「（生体適合性モノマー由来単位）」の中で述べたとおりである。図示された例において用いられる重合性モノマーＭ２９はＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドであり、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドについては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の「（Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位）」の中で述べたとおりである。

[0210] 重合反応液中の鋳型６０の濃度としては特に限定されないが、例えば１～１０μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは３～８μｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは４．５～７μｍｏｌ／Ｌ、さらに好ましくは５．５～６．５μｍｏｌ／Ｌが挙げら

れる。

[0211] 重合反応液中の重合性モノマーＭ２８の濃度としては特に限定されないが、例えば１～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは３～８ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは４．５～７ｍｍｏｌ／Ｌ、さらに好ましくは５．５～６．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型６０に対する重合性モノマーＭ２８の使用量としては、鋳型６０の１μｍｏｌ当たりの重合性モノマーＭ２８の使用量として、例えば０．１～２ｍｍｏｌ、好ましくは０．３～１．８ｍｍｏｌ、より好ましくは０．５～１．５ｍｍｏｌ、さらに好ましくは０．８～１．２ｍｍｏｌが挙げられる。

[0212] 重合反応液中の重合性モノマーＭ２９の濃度としては特に限定されないが、例えば、５０～２００ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは８０～１３０ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１００～１１５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型６０に対する重合性モノマーＭ２９の使用量としては、鋳型６０の１μｍｏｌ当たりの重合性モノマーＭ２９の使用量として、好ましくは例えば、８～３５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１３～２２ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１７～２０ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。さらに、重合性モノマーＭ２８に対する重合性モノマーＭ２９の使用量としては、重合性モノマーＭ２８の１モルに対する重合性モノマーＭ２９の使用量として、８～３５モル、好ましくは１３～２２モル、より好ましくは１７～２０モルが挙げられる。

[0213] 重合反応液中には、適宜、架橋剤、開始剤、及び溶媒が含まれる。

[0214] 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（６）で示されるものが挙げられる。

[0215] [化15]

W-Z-W (6)

[0216] 式（６）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。

[0217] 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、１～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは３～８ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは４．５～７ｍｍｏｌ／Ｌ、さらに好ましくは５．５～６．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。

[0218] 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。

[0219] 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、４～４０ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１２～３２ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは１８～２８ｍｍｏｌ／Ｌ、さらに好ましくは２２～２６ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。

[0220] 溶媒としては、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、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。

[0221] 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。

[0222] このような重合反応系中で重合反応が進行することで、分子インプリントポリマー２０が合成され、鋳型６０の表面形状と相補的な分子インプリント凹部２１が形成される。また、鋳型６０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凹部２１が形成される。

[0223] ［３－２－３．工程（１－１３）］

工程（１－１３）では、図１３－３に示すように、第１の可逆的連結基２２を開裂させて分子インプリントポリマー２０から鋳型６０を除去し、特異的結合性分子の結合用基２２’を生じる。これによって、分析用センサ作製用基材１０’（１０－Ｐ’）が得られる。

[0224] ［３－３．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－２］

例えば、図１０（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’の製造方法は、以下の工程（１－２１）～工程（１－２４）を含む。

[0225] ・表面が第３の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の表面を用意する工程（１－２１）；

・前記重合性官能基及び前記鋳型との相互作用基を含むモノマーを基質とし、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（１－２２）；

・前記第３の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（１－２３）；及び

・検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）。

但し、前記特異的結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である

。

[0226] なお、図１１の１０ｂ－ＰＣ’のように鋳型との相互作用基２５を含まないものの場合は、上記工程（１－２２）における基質から鋳型との相互作用基を含むモノマーを除外すればよい。

[0227] 図１４－１～図１４－４に、図１０（Ａ）に示した基板状の検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’の製造方法を模式的に示す。具体的には、図１４－１、図１４－２、図１４－３、及び図１４－４は、それぞれ、工程（１－２１）、工程（１－２２）、工程（１－１３）、及び工程（１－１４）を模式的に示す。つまり、図示された態様において、検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’を製造する方法は、以下の工程を含む。

[0228] ・表面が第３の可逆的連結基２６ｂを介して重合性官能基２７で修飾された、分子インプリントの鋳型６０ｃを用意する工程（１－２１）；

・重合性官能基２７及び鋳型６０ｃとの相互作用基２５を含むモノマーＭ２５を基質とし、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０ｃを合成する工程（１－２２）；

・第３の可逆的連結基２６ｂを開裂させて分子インプリントポリマー２０ｃから鋳型６０ｃを除去する工程（１－２３）；及び

・検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質の結合用基２３’を含む機能性基２４ｂを有する機能性分子Ｒ２４を、第３の可逆的連結基２６ｂを介して導入する工程（１－２４）。

以下、各工程について図を参照しながら詳述する。

[0229] ［３－３－１．工程（１－２１）］

工程（１－２１）では、図１４－１に示すように、表面が第３の可逆的連結基２６ｂを介して重合性官能基２７で修飾された、分子インプリントの鋳型６０ｃを用意する。

[0230] 鋳型６０ｃとしては、上記「３－１－２．鋳型及び修飾工程」の「（鋳型）」で述べたものが挙げられるが、好ましくは、生体分子が挙げられ、より好ましくは血漿タンパク質（アルブミン、γ－グロブリン、フィブリノゲン

等）が挙げられ、より好ましくはアルブミンが挙げられる。

[0231] 図示された態様では、鋳型６０ｃは、それ自体、表面に相互作用部位６５ｃと結合性基ＢＧ６’’とを含む。相互作用部位６５ｃとしては特に限定されないが、例えば上記表３の第３－２欄に示す基が挙げられ、好ましく酸性アミノ酸残基が挙げられ、より好ましくはカルボキシル基が挙げられる。結合性基ＢＧ６’’としても限定されず、例えば上記表２の第２－１欄に示す基が挙げられ、好ましくはアミノ基が挙げられる。

[0232] 鋳型６０ｃに、結合性基ＢＧ６’’に対応する結合性基ＢＧ６’と第３の可逆的連結基２６ｂと重合性官能基２７とを含むモノマーＭ２７を作用させることによって、表面が第３の可逆的連結基２６ｂを介して重合性官能基２７で修飾された、分子インプリントの鋳型６０ｃが得られる。

[0233] 結合性基ＢＧ６’としては特に限定されないが、例えば例えば上記表２の第２－２欄に示す基が挙げられ、好ましくはカルボン酸活性エステル基が挙げられる。可逆的連結基２６ｂとしても特に限定されず、例えば上記表１の第１－３欄に示す基が挙げられ、好ましくはジスルフィド基が挙げられる。重合性官能基２７としては、ビニル基を含有していればよく、好ましくは（メタ）アクリロイル基が挙げられる。

[0234] ［３－３－２．工程（１－２２）］

工程（１－２２）では、図１４－２に示すように、重合性官能基２７を基質とし、鋳型６０の表面の一部に対する分子インプリントポリマー２０ｃを合成する。

[0235] 図示された態様では、重合性モノマーとして、鋳型６０ｃとの相互作用基２５を含むモノマーＭ２５と共に、重合性モノマーＭ２８、Ｍ２９を用いる例を示しているが、モノマーＭ２５以外の重合性モノマーとして３種以上組み合わせて用いてもよい。また、モノマーＭ２５以外の重合性モノマーとしては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の中で述べた通りである。図示された例において用いられる重合性モノマーＭ２８は生体適合性モノマーであり、生体適合性モノマーについては、上

記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の「（生体適合性モノマー由来単位）」の中で述べたとおりである。図示された例において用いられる重合性モノマーＭ２９はＮ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドであり、Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミドについては、上記の「１－３－６．分子インプリントポリマーを構成するポリマー」の「（Ｎ－置換又は無置換の（メタ）アクリルアミド由来単位）」の中で述べたとおりである。

[0236] 鋳型６０ｃとの相互作用基２５を含むモノマーＭ２５において、相互作用基２５については、上記「１－３－５．相互作用基」で述べた通りであり、好ましくはピロリジル基が挙げられる。

[0237] 重合反応液中の鋳型６０ｃの濃度；重合性モノマーＭ２８の濃度及び鋳型６０ｃに対する重合性モノマーＭ２８の使用量；並びに重合性モノマーＭ２９、鋳型６０ｃに対する重合性モノマーＭ２９の使用量、及び重合性モノマーＭ２８対する重合性モノマーＭ２９の使用量としては、上記「３－２－２．工程（１－１２）」で述べた重合反応液中の鋳型６０の濃度；重合性モノマーＭ２８の濃度及び鋳型６０に対する重合性モノマーＭ２８の使用量；並びに重合性モノマーＭ２９、鋳型６０に対する重合性モノマーＭ２９の使用量、及び重合性モノマーＭ２８対する重合性モノマーＭ２９の使用量と同様である。

[0238] 相互作用基２５を含むモノマーＭ２５の濃度としては特に限定されないが、例えば、例えば１．５～１５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは４．５～１２ｍｍｏｌ／Ｌ、より好ましくは６～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、さらに好ましくは８．５～９．５ｍｍｏｌ／Ｌが挙げられる。また、鋳型６０に対する相互作用基２５を含むモノマーＭ２５の使用量としては、鋳型６０の１μｍｏｌ当たりのモノマーＭ２５の使用量として、例えば０．１５～３ｍｍｏｌ、好ましくは０．４５～２．７ｍｍｏｌ、より好ましくは０．７５～２．２ｍｍｏｌ、さらに好ましくは１．２～２．２ｍｍｏｌが挙げられる。また、重合性モノマーＭ２８に対するモノマーＭ２５の使用量としては、重合性モノマーＭ２８

１モルに対するモノマーＭ２５の使用量として、例えば０．３～３モル、好ましくは０．５～２．５モル、より好ましくは１～２モル、更に好ましくは１．３～１．７モルが挙げられる。さらに、重合性モノマーＭ２９に対するモノマーＭ２５の使用量としては、重合性モノマーＭ２９の１００モルに対するモノマーＭ２５の使用量として、例えば２～２０モル、好ましくは５～１３モル、より好ましくは８～９モルが挙げられる。

[0239] 重合反応液中には、適宜、架橋剤、開始剤、及び溶媒が含まれる。架橋剤、開始剤、及び溶媒の詳細、それらの使用量、重合反応の種類については、上記「３－２－２．工程（１－１２）」で述べたものと同様である。

[0240] 工程（１－２２）の重合反応系においては、図１４－２に示すように、モノマー成分のうちの鋳型６０ｃとの相互作用基２５を含むモノマーＭ２５が、相互作用基２５を介して鋳型６０ｃの相互作用部位６５ｃと特異的に相互作用することで、モノマーＭ２５－鋳型６０ｃ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６０ｃの表面形状と相補的な分子インプリント凹部２１ｃが形成されるとともに、第３の可逆的連結基２６ｂを分子インプリント凹部２１ｃ表面に存在させることができる。また、鋳型６０ｃが親水性のためポリマー界面近傍により一層存在しやすいことでより一層効率的に分子インプリント凹部２１ｃが形成される。

[0241] 工程（１－２２）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、モノマーＭ２５－鋳型６０ｃ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℃の低温条件に供してもよい。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１０～２０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６０ｃ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、分子インプリント凹部２１ｃの特異性を効果的に獲得することができる。

[0242] このようにして、分子インプリントポリマー２０ｃが合成され、分子インプリントポリマー２０ｃと鋳型６０ｃとの複合体を得る。分子インプリントポリマー２０ｃと鋳型６０ｃとの複合体は、相互作用基２５と鋳型６０ｃの相互作用部位６５ｃとの間の非共有結合的な結合により形成されている。

[0243] ［３－３－３．工程（１－２３）］

工程（１－２３）では、図１４－３に示すように、第３の可逆的連結基２６ｂを開裂させて分子インプリントポリマー２０ｃから鋳型６０ｃを除去する。これによって、分子インプリントポリマー２０ｃの凹部２１ｃ表面に相互作用基２５と結合性基２６ｂ’とが配される。結合性基２６ｂ’は、第３の可逆的連結基２６ｂの開裂により生じる基であり、具体的には、上記表１の第１－１欄に示す基が挙げられ、好ましくはチオール基が挙げられる。

[0244] ［３－３－４．工程（１－２４）］

工程（１－２４）では、図１４－４に示すように、検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質の結合用基２３’を含む機能性基２４ｂを有する機能性分子Ｒ２４を、第３の可逆的連結基２６ｂを介してポリマー２０ｃの凹部２１ｃに導入する。

[0245] 検出対象の標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’及びシグナル物質の結合用基２３’を含む機能性基２４ｂについては、上記「１－３－４．機能性基」で述べた通りである。機能性基２４ｂを有する機能性分子Ｒ２４は、結合性基２６ｂ’に対する結合性基２６ｂ’’を有する分子であり、下記式（７）で表される。

[0246] [化16]

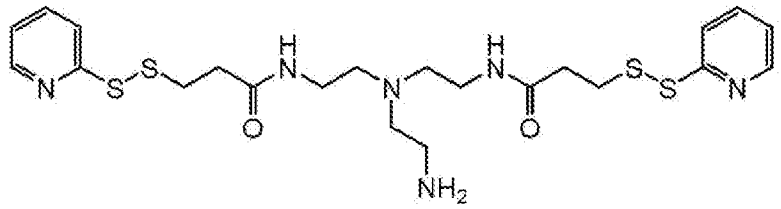
$$R^7—L^7—R^2—L^1—R^1 \qquad (7)$$

[0247] 式（７）中、R^1は特異的結合性分子の結合用基を表し、L^1は直接結合又は連結基を表し、R^2はシグナル物質の結合用基を含む連結基を表し、これらの基の詳細については、上記「１－３－４．機能性基」で述べた通りである。

[0248] 式（７）中、R^7は結合性基２６ｂ’’であり、L^7は直接結合又は連結基を表す。結合性基２６ｂ’’は、結合性基２６ｂ’に対する結合性を有していれば特に限定されず、例えば、上記表１の第１－２欄に示す基が挙げられる。直接結合又は連結基L^7が連結基である場合、当該連結基の具体例としては、ポリオキシアルキレン基を含んでよいアルキレン基（例えば、Ｃ１～８アルキレン基、又はポリオキシＣ１～３アルキレンＣ１～８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。分子設計の観点等から、当該連結基としては、好ましくはアルキレン基とエステル結合及び／又はアミド結合との組み合わせ、より好ましくはアルキレン基とエステル結合又はアミド結合との組み合わせ、さらに好ましくは１又は２以上のアルキレン基（当該連結基に含まれる全てアルキレン基の炭素数の総数が、例えば１～８、好ましくは２～６、より好ましくは３～５、特に好ましくは４）とエステル結合又はアミド結合との組み合わせが挙げられる。

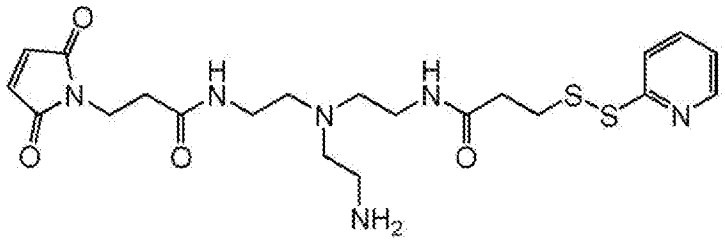
[0249] 機能性基２４ｂを有する機能性分子Ｒ２４の限定されない具体例としては、下記式（７ａ），（７ｂ），（７ｃ）に示す化合物が挙げられる。

[0250] [化17]



(7a)

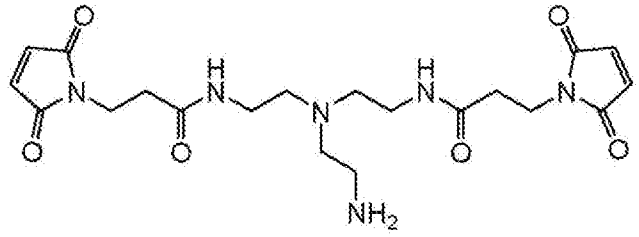
[0251] [化18]



(7b)

[0252]

[化19]



(7c)

[0253] 以上のようにして、機能性基２４ｂを有する機能性分子Ｒ２４が、第３の可逆的連結基２６ｂを介してポリマー２０ｃの凹部２１ｃに導入され、これによって、分析用センサ作製用基材１０ｃ’（１０ｃ－Ｐ’）が得られる。

[0254] ［３－４．粒子が基板に固定された検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法］

図７（Ａ）、図１１（Ａ）のように、粒子が基板に固定された検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法は、上記の「３－２．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－１」及び「３－３．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－２」で述べた製造方法と、ポリマー粒子を基板３０上に固定する方法とを適宜組み合わせればよい。

[0255] ポリマー粒子を基板３０上に固定する工程は、上記の「３－２．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－１」及び「３－３．粒子状の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法－２」で述べた製造方法において、鋳型（例えば鋳型６０，６０ｃ）が除去され分子インプリントポリマー（例えば、分子インプリントポリマー１０，１０ｃ）の粒子が形成された後であればいつでも行うことができる。例えば、上記の「３－２－３．工程（１－１３）」の後、上記の「３－３－３．工程（１－２３）」の後（好ましくは、上記の「３－３－３．工程（１－２３）」と上記の「３－３－４．工程（１－２４）」との間）等に、得られた分子インプリントポリマー１０，１０ｃ）の粒子を基板３０上に固定することができる。分子インプリントポリマーの粒子を基板３０上に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。

[0256] 図１５に、上記の「３－３－３．工程（１－２３）」と上記の「３－３－４．工程（１－２４）」との間に、分子インプリントポリマー２０ｃの粒子を基板３０上に固定する工程を模式的に示す。図１５に示す例においては、基板３０表面に、結合性基ＢＧ９’’を表面に有する分子膜を形成しておき、結合性基ＢＧ９’’に、分子インプリントポリマー２０ｃの表面に存在する結合性基ＢＧ９’を結合させることによって、分子インプリントポリマー２０ｃを基板３０上に固定する。

[0257] 基板３０に形成された分子膜表面の官能基ＢＧ９’’としては特に限定されないが、例えば、上記表２の第２－２欄に示す基が挙げられ、好ましくはカルボン酸活性エステル基が挙げられる。分子インプリントポリマー２０ｃの表面に存在する結合性基ＢＧ９’としても特に限定されず、例えば、上記表２の第２－１欄に示す基が挙げられる。分子インプリントポリマー２０ｃの表面に存在する結合性基ＢＧ９’は、分子インプリントポリマー２０ｃの合成に用いたモノマーに由来する基、及び／又は分子インプリントポリマー２０ｃの構成するポリマーの末端に残存する開始剤由来の基等が挙げられる。

[0258] ［４．検出対象の分析用センサの製造方法］

本開示の検出対象の分析用センサの製造方法は、以下の工程を含む。

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）；及び

前記特異的結合性分子の結合用基に、前記特異的結合性分子を結合する工程（２）。

[0259] 図１３－４に、本開示の検出対象の分析用センサ１０（１０－Ｐ）の製造方法を模式的に示す。つまり、図１３－４に示された態様において、検出対象の分析用センサ１０（１０－Ｐ）の製造方法は以下の工程を含む。

[0260] 検出対象の分析用センサ作製用基材１０’（１０－Ｐ’）の製造方法を行う工程（１）；及び

特異的結合性分子の結合用基２２’に、特異的結合性分子Ｒ４２を結合する工程（２）。

[0261] また、検出対象の分析用センサ作製用基材がシグナル物質の結合用基を含む場合の本開示の検出対象の分析用センサの製造方法は、以下の工程を含む。

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）；

前記特異的結合性分子の結合用基に、前記特異的結合性分子を結合する工程（２）；及び

前記シグナル物質結合用基にシグナル物質を結合する工程（３）。

[0262] 図１２－６、図１４－５に、本開示の検出対象の分析用センサ１０ａ－Ｃ，１０ｃ（１０ｃ－Ｐ）の製造方法を模式的に示す。つまり、図１２－６、図１４－５に示された態様において、検出対象の分析用センサ１０ａ－Ｃ，１０ｃ（１０ｃ－Ｐ）の製造方法は以下の工程を含む。

[0263] 検出対象の分析用センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’，１０ｃ’（１０ｃ－Ｐ’）の製造方法を行う工程（１）；

特異的結合性分子２２’の結合用基に、特異的結合性分子Ｒ４２を結合する工程（２）；及び

シグナル物質結合用基２３’にシグナル物質Ｒ４３を結合する工程（３）。

[0264] 工程（１）については、上記「３．検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法」に記載の通りである。本開示の検出対象の分析用センサの製造方法が工程（３）を行う場合、工程（２）及び工程（３）の順番としては、いずれを先に行ってもよいし、同時に行ってもよい。

[0265] 特異的結合性分子Ｒ４２は、検出対象の標的に対する特異的結合性基４２と結合性基２２’’，２２ｂ’’とを含む。検出対象の標的に対する特異的結合性基４２については、上記「２－２．検出対象の標的に対する特異的結合性基」で述べた通りである。なお、図示されていないが、分析用センサ１０a_1－Ｃ（図８（Ｂ２））の製造方法では、特異的結合性分子Ｒ４２として、他のシグナル基ｓｇが特異的結合性基４２に結合した、他のシグナル基を有する特異性結合性基４２_1（図２Ｂ－２参照）と結合性基２２’’とを含む

分子を用いることを除いて、図１２－６と同様の手順を行えばよい。

[0266] また、結合性基２２’’としては、特異的結合性分子の結合用基２２’に対する結合性を有していれば特に限定されず、例えば、上記表１の第１－２欄に示す基が挙げられる。結合性基２２ｂ’’としては、特異的結合性分子の結合用基２２’に対する結合性を有していれば特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄に示す基が挙げられる。

[0267] シグナル物質Ｒ４３は、シグナル基４３と結合性基２３’’，２３ｂ’’とを含む。シグナル基４３については、上記「２－３．シグナル基」で述べた通りである。また、結合性基２３’’としては、シグナル物質の結合用基２３’に対する結合性を有していれば特に限定されず、例えば、上記表１の第１－２欄に示す基が挙げられる。結合性基２３ｂ’’としては、シグナル物質の結合用基２３’に対する結合性を有していれば特に限定されず、例えば、上記表２の第２－２欄に示す基が挙げられる。

[0268] 基板状且つシグナル基４３を有する本開示の検出対象の分析用センサ（一例として、上述の検出対象の分析用センサ１０ａ－Ｃ等）の製造方法においては、基板３０上のセンサ場となる分子インプリント凹部のみにシグナル物質結合用基が配されているため、シグナル基４２は、シグナル物質Ｒ４２の結合性基の反応特性によって分子インプリント凹部のみに配置されることができる。

[0269] また、基板状且つシグナル基４３を有する本開示の検出対象の分析用センサに対しては、１個の基板３０上の全ての分子インプリント凹部に１種類の特異的結合性基４２と１種類のシグナル基４３とを導入してもよいし、一の分子インプリント凹部に対し一の種類の特異的結合性基４２を導入し、他の分子インプリント凹部に対し他の種類の特異的結合性基４２を導入するとともに、それぞれ特異的結合性基４２の種類に対応して異なる種類のシグナル基４３を導入してもよい。

[0270] ［５．対象物質の分析法］

本開示の検出対象の分析法は、検出対象の分析用センサに、検出対象を含

む試料を接触させ、前記特異的結合性基に前記検出対象を結合する工程と；前記特異的結合性基と前記検出対象との結合を検出する工程と、を含む。

[0271] ［５－１．検出対象の分析用センサ］

検出対象の分析用センサについては、上記「２．検出対象の分析用センサ」で述べた通りである。

[0272] ［５－２．検出対象］

検出対象としては、検出対象の標的が特異的結合性基４２と特異的に結合する対象であれば特に限定させるものではなく、上記「２－１．検出対象」で述べたとおりのものが挙げられる。

[0273] 検出対象を含む分析試料液の態様としては特に限定されないが、分析の迅速性の観点から、検出対象を分離する処理を経ていないものが挙げられる。検出対象を分離する処理としては、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、サイズフィルターを用いたろ過、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。

[0274] 検出対象を含む分析試料液としては、（検出対象が細胞または細胞外小胞である場合は）検出対象が存在している環境から得られる試料、又は、（検出対象が細胞外小胞であって、細胞からの産生物又は排出物である場合は）検出対象が生じうる環境から得られる試料であってよい。具体的には、細胞を含む生体試料であってよい。検出対象がエクソソームなどの細胞外小胞である場合、検出対象を産生又は排出する細胞としては、がん細胞、肥満細胞、樹状細胞、網赤血球、上皮細胞、Ｂ細胞、神経細胞、粘膜細胞等が挙げられる。より具体的には、検出対象を含む分析試料液としては、血液、乳汁、尿、唾液、リンパ液、髄液、羊水、涙液、汗、鼻漏、咽頭ぬぐい液、鼻咽頭液等の体液が挙げられ、さらに、これらの体液を、不要成分を除去する等の前処理を行った処理液、及びこれらの体液に含まれる細胞を培養して得られた培養液も挙げられる。これらの分析試料液のうち、尿、唾液、涙液、汗、鼻漏等の体液は、非侵襲性及び採取容易性の点で特に好ましい。

[0275] 検出対象の分析用センサに、検出対象を含む試料を接触させると、検出対

象又は検出対象の標的が分子プリント凹部内の特異的結合性基４２に特異的に捕捉される。

[0276] ［５－３．ターゲティングとセンシング］

検出対象又は検出対象の標的が分子プリント凹部内の特異的結合性基４２に特異的に捕捉されると、特異的結合性基と前記検出対象との結合を検出する。

[0277] 例えば、図１Ｂ－１に示した検出対象の分析用センサ１０のように、検出対象の分析用センサが分子プリント凹部内にシグナル基４３を有しない場合は、当該結合を表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、反射干渉分光法等によって検出することができる。

[0278] また、検出対象の分析用センサが分子プリント凹部内にシグナル基４３を有する場合は、結合の瞬間、シグナル基４３が検出対象又は検出対象の標的によって環境変化を受けるため、特異的な捕捉の前後でシグナル変化をもたらす。つまり、この場合、分析用センサは、センシング対象となる検出対象又は検出対象の標的の結合情報をシグナル変化で読み出すことができ、このシグナル変化によって検出対象又は検出対象の標的が検出される。検出対象又は検出対象の標的の捕捉とシグナル変化とがほぼ同時に起こるため、結合の検出のために試薬を加える必要もなく、検出を迅速に行うことができる。

[0279] また、分析用センサを、シグナル基４３が蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を引き起こす蛍光色素ペアの一方となるように構成し、且つ、検出対象又は検出対象の標的に予め当該蛍光色素ペアの一方を結合させておく場合、検出対象又は検出対象の標的が分子インプリント凹部内の特異的結合性基４２に特異的に捕捉されると、その瞬間、シグナル基４３における蛍光色素と検出対象における蛍光色素とが近接するため、ＦＲＥＴにより蛍光が放射される。このＦＲＥＴによる蛍光放射によって検出対象が検出される。検出対象又は検出対象の標的の捕捉とＦＲＥＴによる蛍光放射とがほぼ同時に起こるため、検出対象の検出のために試薬を加える必要もなく、検出を迅速に行うことができる。ＦＲＥＴを引き起こす蛍光色素ペアとしては特に限定さ

れず、シグナル基４３としてドナー色素及びアクセプター色素のいずれを選択するかも限定されない。好ましくは、シグナル基４３としてドナー色素を選択することができる。ＦＲＥＴを引き起こす蛍光色素のペアを構成するドナー色素／アクセプター色素の具体例としては、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）／テトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７／Ｃｙ５．５、ＨｉＬｙｔｅ　Ｆｌｕｏｒ６４７／Ｃｙ
５．５、Ｒ－フィコエリトリン（Ｒ－ＰＥ）／アロフィコシアニン（ＡＰＣ）等が挙げら
れる。

[0280] ［５－４．二重ターゲティングとセンシング］

また、図１０（Ｂ）に示す検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐが、アルブミン（他の血漿タンパク質でもよい）を鋳型６０ｃとする分子インプリント凹部２１ｃ及びアルブミンとの特異的な相互作用基２５を有し上記「２－４．用途」に示す用途に用いられる場合のターゲティング動向を、図１６－１及び図１６－２に模式的に示す。図示された例では、分析用センサ１０ｃ－Ｐの検出対象７０がエクソソームのような膜構造を有する微小粒体であり、直接的なターゲットである標的７２が当該微小粒体の表面に発現している腫瘍マーカータンパク質である場合（上記「２－１．検出対象」の「態様２」である場合の具体例）を挙げて示している。また、図１６－１及び図１６－２には、いずれも、分子インプリント凹部２１ｃの拡大図（ｉ）と、（ｉ）に対応する検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの全体図（ｉｉ）との両方を模式的に示している。

[0281] 図１６－１に示すように、分析用センサ１０ｃ－Ｐが血中に投与されると、まず、血中に多量に存在する血漿タンパク質であるアルブミン（鋳型６０ｃと同じ物質）が、分析用センサ１０ｃ－Ｐにおけるアルブミンを鋳型とする分子インプリント凹部２１ｃ及びアルブミンとの特異的な相互作用基２５により特異的に捕捉される。これによって、分析用センサ１０ｃ－Ｐはｉｎ

ｖｉｖｏでステルス性を獲得する。この場合、特異的結合性基４２は、捕捉されたアルブミン（鋳型６０ｃと同じ物質）によって遮蔽される。

[0282] 一方で、ステルス性を獲得した分析用センサ１０ｃ－Ｐが腫瘍組織に到達すると、腫瘍組織ではアルブミン濃度が下がるため、図１６－２に示すように、捕捉されていたアルブミンが外れて異的結合性基４２が露出し、露出した異的結合性基４２に腫瘍マーカータンパク質（標的７２）が特異的に結合する。この結合情報が、シグナル基に基づくシグナル変化として検出される。なお、図１６－２（ｉｉ）に示すように、検出対象７０が膜構造を有する微小粒体であり、その標的７２を直接的な捕捉対象とする場合、分子インプリント凹部２１ｃは、検出対象７０全体を受け入れ可能な大きさでなくてよく、標的７２をその特異的結合部位近傍を受け入れ可能な大きさであればよい。

[0283] このように、図１６－１及び図１６－２に示される態様では、分析用センサ１０ｃ－Ｐは、それが晒された環境（アルブミン濃度）の違いによって、二重ターゲティングも可能とする。このような二重ターゲティングを目的とする場合、分子インプリント凹部２１ｃの鋳型６０ｃ及び相互作用基２５と特異的結合性基４２との組み合わせは、図１６－１及び図１６－２に示される態様に限定されず、任意に選択することができる。

[0284] 上述においては、検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐが、アルブミンを鋳型６０ｃとする分子インプリント凹部２１ｃ及びアルブミンとの特異的な相互作用基２５を有し、且つ、血中に投与され腫瘍近傍まで送達される場合を挙げて説明したが、二重ターゲティングは、この例に限定されるものではない。検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐが、分子インプリント凹部２１ｃとその鋳型との相互作用基２５を有するものであれば、鋳型６０ｃがどのようなものであっても、分子インプリント凹部２１ｃの鋳型６０ｃの濃度が高い環境中では図１６－１に示す態様、分子インプリント凹部２１ｃの鋳型６０ｃの濃度が低い環境中では図１６－２に示す態様となる。

[0285] １つの実施形態において、本開示の分析用センサを用いて被験体を診断ま

たは検査する方法であって、該診断方法は、

A）被験体から試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を採取する工程、

B）前記試料を前記分析用センサと接触させる工程、

C）前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記シグナルを分析してから前記被験体を診断する（例えば、疾患の有無若しくは進行を判定する）工程

を含む。

[0286] 1つの実施形態において、本開示の分析用センサを備える診断または検査システムを用いて被験体を診断または検査する方法をコンピュータに実行させるプログラムであって、該方法は、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を前記診断または検査システムに提供する工程、

B）前記診断または検査システムが、前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する工程、

C）前記診断または検査システムが、前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記診断または検査システムが、前記シグナルを分析してから前記被験体を診断または検査する（例えば、検出結果から疾患の有無または進行を判定する）工程

を含む。

[0287] 1つの実施形態において、本開示の分析用センサを用いて被験体を診断または検査する方法をコンピュータに実行させるプログラムを格納した記録媒体であって、該方法は、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を前記診断または検査システムに提供する工程、

B）前記診断または検査システムが、前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する工程、

C）前記診断または検査システムが、前記分析用センサからのシグナルを検出する工程、および

D）前記診断または検査システムが、前記シグナルを分析してから該被験体を診断または検査する（例えば、検出結果から疾患の有無または進行を判定する）工程

を含む。

[0288] １つの実施形態において、診断または検査システムであって、該システムでは、

A）前記被験体から得られた試料（例えば、尿、髄液、汗、鼻水、唾液、血液または涙を含む）を提供する提供部、

B）前記試料を前記分析用センサと接触させるように起動する起動部、

C）前記分析用センサからのシグナルを検出する検出部、および

D）前記シグナルを分析してから該被験体を診断または検査する（例えば、検出結果から疾患の有無または進行を判定する）診断部

を含む。

[0289] 前記工程B）から工程D)は、すべて全自動で行うことができ、これらを全自動で行う場合、機械学習および／または人工知能を用いて行うことができ、これらを実現する方法、プログラム、これを記録した記録媒体、システムもまた本開示の範囲内である。

[0290] 一般に、本開示の様々な例示的な実施形態は、ハードウェアもしくは専用回路、ソフトウェア、ロジック、またはそれらの任意の組合せで実装されてもよい。いくつかの態様はハードウェアで実装されてもよく、他の態様は、コントローラ、マイクロプロセッサ、または他のコンピューティングデバイスによって実行され得るファームウェアまたはソフトウェアで実装されてもよい。本開示の例示的な実施形態は、ブロック図、フローチャートとして、または他のいくつかの図形表現を使用して示すことができるが、本明細書に記載のブロック、装置、システム、技法、または方法は、非限定的な例として、ハードウェア、ソフトウェア、ファームウェア、専用回路もしくはロジ

ック、汎用ハードウェアもしくはコントローラ、もしくは他のコンピューティングデバイス、またはそれらの何らかの組合せで実装されてもよいことが理解される。

[0291] 一つの実施形態では、本開示はまた、本開示の技術を実現する、非一時的コンピュータ可読記憶媒体上に有形に記憶された少なくとも１つのコンピュータプログラム製品も提供する。コンピュータプログラム製品は、本明細書に記載された方法／プロセスを実行するために、対象となる実プロセッサ上または仮想プロセッサ上のデバイスで実行される、プログラムモジュールに含まれるものなどのコンピュータ実行可能命令を含む。一般に、プログラムモジュールには、特定のタスクを実行する、または特定の抽象データ型を実装するルーチン、プログラム、ライブラリ、オブジェクト、クラス、コンポーネント、データ構造などが含まれる。プログラムモジュールの機能は、様々な実施形態において所望されるように、プログラムモジュール間で組み合わされるか、または分割されてもよい。プログラムモジュール用のコンピュータ実行可能命令は、ローカルデバイスまたは分散デバイス内で実行されてもよい。分散デバイスでは、プログラムモジュールはローカルとリモートの両方の記憶媒体に配置されてもよい。

[0292] 本開示の記録媒体は、コンピュータ可読媒体であり得、コンピュータ可読媒体は、コンピュータ可読信号媒体またはコンピュータ可読記憶媒体でもよい。コンピュータ可読媒体には、電子、磁気、光学、電磁気、赤外線、もしくは半導体の、システム、装置、もしくはデバイス、または上記の任意の適切な組合せが含まれるが、これらに限定されない。コンピュータ可読記憶媒体のより具体的な例には、１つまたは複数のワイヤを有する電気接続、ポータブルコンピュータディスケット、ハードディスク、ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）、読み取り専用メモリ（ＲＯＭ）、消去可能プログラマブル読み取り専用メモリ（ＥＰＲＯＭまたはフラッシュメモリ）、光ファイバ、ポータブルコンパクトディスク読み取り専用メモリ（ＣＤ－ＲＯＭ）、光学式記憶デバイス、磁気記憶デバイス、または上記の任意の適切な組合せが含ま

れる。

[0293] 本明細書に開示される方法を実行するためのコンピュータプログラムコードは、１つまたは複数のプログラミング言語の任意の組合せで書かれてもよい。プログラムコードがプロセッサまたはコントローラによって実行されると、フローチャートおよび／またはブロック図で指定された機能／動作が実行されるように、プログラムコードは、汎用コンピュータ、専用コンピュータ、または他のプログラム可能なデータ処理装置のプロセッサまたはコントローラに提供されてもよい。プログラムコードは、完全にコンピュータ上で実行されるか、スタンドアロンソフトウェアパッケージとして部分的にコンピュータ上で実行されるか、部分的にコンピュータ上かつ部分的にリモートコンピュータ上で実行されるか、または完全にリモートコンピュータ上もしくはサーバ上で実行されてもよい。プログラムコードは、本明細書で一般に「モジュール」と呼ばれ得る特別にプログラムされたデバイスに配布されてもよい。モジュールのソフトウェアコンポーネント部分は、任意のコンピュータ言語で書かれてもよく、モノリシックコードベースの一部分であってもよく、またはオブジェクト指向コンピュータ言語で典型的であるような、より離散的なコード部分で開発されてもよい。加えて、モジュールは、複数のコンピュータプラットフォーム、サーバ、端末、モバイルデバイスなどにわたって分散されてもよい。さらに、説明された機能が別個のプロセッサおよび／またはコンピューティングハードウェアプラットフォームによって実行されるように、所与のモジュールが実装されてもよい。

[0294] 動作は特定の順序で示されているが、望ましい結果を得るために、そのような動作が、示された特定の順序で、もしくは順次に実行されること、またはすべての図示された動作が実行されることを要求するものとして理解されるべきではない。一定の状況では、マルチタスクおよび並列処理が有利な場合がある。同様に、上記の説明にいくつかの特定の実装の詳細が含まれているが、これらは本開示の範囲に対する制限として解釈されるべきではなく、むしろ特定の実施形態に特有であり得る特徴の説明として解釈されるべきで

ある。別個の実施形態の文脈で説明される一定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせて実装されてもよい。逆に、単一の実施形態の文脈で説明される様々な特徴は、複数の実施形態において別々に、または任意の部分的組合せで実装されてもよい。

[0295] 本開示の技術を使用する場合、それはヒトだけに使用することを意図するのではなく、ヒト以外のその他の動物（ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、コウモリ、キツネ、マングース、アライグマ等）にも使用することが可能である。

[0296] （応用例）

1. 愛玩動物（ネコ、イヌ、鳥類など）の動物のがんを含む疾病の検査
2. 家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなど）の保有する感染症原因ウイルスや感染性タンパク質（プリオンなど）、その他の病原性/感染性因子の検出
3. 有害動物（鳥類、コウモリ、キツネ、マングース、アライグマ等）の保有する感染症原因ウイルスや感染性タンパク質（プリオンなど）、その他の病原性/感染性因子の検出
4. 水産物の品質や鮮度チェック
5. 農産物の品質や鮮度チェック
6. 植物や樹木などの病原菌・ウイルスチェック

[0297] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0298] 以下に、実施例に基づいて本開示を詳細に説明するが、本開示はこれらによって限定されるものではない。使用される試薬は、各々記載されるように入手可能であるが、これ以外にもMerck、Sigma-Aldrich、フナコシおよびコスモバイオのものも使用され得る。

[0299] なお、細胞の顕微鏡観察にはCKX31 (OLYMPUS, Tokyo, Japan)、遠心分離器にはKUBOTA2800 (KUBOTA, Tokyo, Japan)、インキュベーターにはCO2 WATER JACKETED INCUBATOR (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA)、オートクレーブにはKS-243 (TOMY SEIKO Co,Ltd., Tokyo, Japan)、クリーンベンチにはバイオクリーンベンチ (ORIENTAL GIKEN INC, Tokyo, Japan)をそれぞれ使用した。エクソソーム濃度測定にはqNano Gold (Izon Science Ltd., Christchurch, New Zealand)を使用した。また、金基板のUVオゾン処理にはUV Ozone Cleaner (BioForce Nanosciences, Inc.)、蛍光測定にはSIC自動分注装置 (SYSTEM INSTRUMENTS Co.,Ltd., Tokyo, Japan) つき蛍光顕微鏡 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) および分光学ソフトウェアとしてAndor SOLIS (Andor Technology Ltd, Belfast, Northern Ireland)を用いた。

[0300] また、MALDI-TOF-MS には MALDI-TOF/MS (MALDI-7090、島津製作所)を、解析ソフトは(MALDI Solutions、島津製作所)、キャリブレーションは protein calibration standard I (ブルカー)を用いた。マトリックスにはシナピン酸を用いた。CD スペクトルには J- 725 型円二色性分散計(日本分光, Tokyo, Japan) を用いた。Buffer調製のために卓上 pH メーター F-52(HORIBA, Kyoto, JAPAN)により pH を測定した。蛍光スペクトル測定は、日立ハイテクノロジー製の蛍光分光光度計（Fluorescence spectrophotometer）F-2500 (Tokyo,Japan)を使用して行った。限外濾過に使用した限外濾過膜はアミコンウルトラ-4（10ｋDa）を使用した。吸収スペクトル測定には Thermo Scientific™ Nano dropTM One 超微量紫外可視分光光度計（Thermo Fisher）を用いた。作製した粒子の平均粒子径および多分散指数(PDI)は ZETASIZER NANO-ZS MAL500735 (Malvern, UK)にて動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS)により測定し、解析ソフトとして Zetasizer software を用いた。ＴＥＭ解析には透過型電子顕微鏡(JEM-1230、日本電子製) を用いた。

[0301] ［実施例１：基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃ（特異的結合性物質

として抗ＨＥＲ２アフィボディ、シグナル物質としてAlexa　Fluor　647を導入）］

本実施例では、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃ（シグナル物質としてAlexaFluor　647を導入）を作製した。この基板状の検出対象の分析センサは、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。また、シグナル物質としてAlexa　Fluor　647を導入した。更に、得られた基板状の検出対象の分析センサを用いて検出対象の分析を行った。

[0302] 基板状の検出対象の分析センサの作製方法については、図１２－１ａ、図１２－２、図１２－３ａ、図１２－４、図１２－５に従って、基板状の検出対象の分析センサ作製用基板１０ａ－Ｃ’を作製し、さらに、図１２－６（但し、特異的結合性分子Ｒ４２として、他のシグナル基ｓｇが特異的結合性基４２に結合した、他のシグナル基を有する特異性結合性基４２$_1$（図２Ｂ－２参照）と結合性基２２’’とを含む分子を用いた。）に従って、検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃを作製した。

[0303] ［１］ポリシスチジンタグ及びチオール基で修飾されたシリカ粒子の作製

図１２－１ａに準じて、ポリヒスチジンタグ及びチオール基で修飾された鋳型シリカ粒子の作製を行った。

[0304] ［１－１］試薬

・Ｓｉｃａｓｔａｒ㈱－ｒｅｄ　Ｆ（ｍｉｃｒｏｍｏｄ；平均粒子径は２００ｎｍ；固形分濃度は２５ｍｇ／ｍＬ；粒子表面の官能基はカルボキル基（１μｍｏｌ／ｇ）；蛍光特性は励起５６９ｎｍ、蛍光５８５ｎｍ）

・・鋳型６０：シリカ粒子

・・結合性基ＢＧ２２’’：カルボキシル基

・２－アミノエタンチオール塩酸塩（東京化成工業）

・・結合性基ＢＧ２３’：アミノ基

・・結合性基２３’’：チオール基

・ポリヒスチジンタグ（サーモフィッシャーサイエンティフィック；Ｈｉｓ－ｔａｇ；Ａｃ－ＫＨＨＨＨＨＨ－NH_2；Ａｃはアセチル基、Ｋはリシン残基、Ｈはヒスチジン残基を表す。）

・・結合性基ＢＧ２２’：アミノ基

・・結合性基２２’’：ポリヒスチジン

・ＤＭＴ－ＭＭ（４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド；トリアジン系縮合剤）

[0305] ［１－２］実験手順

Ｓｉｃａｓｔａｒ(R)－ｒｅｄ　Ｆ表面のカルボキシル基に対して20等量の２－アミノエタンチオール塩酸塩、ポリヒスチジンタグ、及びＤＭＴ－ＭＭを加え、振盪（２５℃、終夜）することで、ポリヒスチジンタグ及びチオール基で修飾されたシリカ粒子を作製した。その後、遠心分離（１０，０００ｇ，１５分）で分散媒を水に置換した。さらに、遠心分離（１０，０００ｇ，１０分）で分散媒を水に置換する操作を２回行った。作製したシリカ粒子を１００μＬ採取し、乾燥重量を測定した。得られたシリカ粒子の固形分濃度は７．４１ｍｇ／ｍＬであった。

[0306] ［２］単分子膜の形成（工程（１－１））

図１２－２に準じて、基板に、ＮＴＡ－Ｎｉ錯体と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成した。

[0307] ［２－１］試薬

・Amino-EG_6-undecanethiol　hydrochloride（同仁化学研究所）

・・結合性基ＢＧ１’：アミノ基

・2-(2-bromoisobutyryloxy)　undecyl　thiol（ＳＵＲＦ　ＭＯＤＳ）

・・重合性開始基ＩＮＩ：－ＣＢｒ基

・Isothiocyanobenzyl-NTA（同仁化学研究所）、無水$NiCl_2$（ナカライテスク）

・・特異的結合性分子の結合用基２２’：ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基

[0308] ［２－２］実験手順

金スパッタガラス基板をエタノールで洗浄後、ＵＶオゾン処理（２０分）を行い、金基板表面の有機物を分解した。その後、０．５ｍＭのamino-EG_6-undecanthiol hydrochloride及び０．５ｍＭの2-(2-bromoisobutyryloxy) undecyl thiolを含むエタノール溶液に基板を浸漬させ静置（２５℃、終夜）し、混成自己組織化単分子膜（mixed SAMs）を形成した。

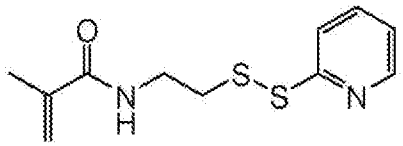
[0309] 基板を純水で洗浄後、５ｍＭのisothiocyanobenzyl-NTA溶液（５０μＬのＤＭＳＯに溶解し４６ｍＭに調製後、１０ｍＭ，ｐＨ９．２の炭酸バッファーで希釈して調製したもの）３５μＬを基板に滴下し静置（室温，２時間）した。基板を純水で洗浄後、４ｍＭのＮｉＣｌ$_2$水溶液に浸漬させ、静置（室温，１５分）することで、基板表面のmixed SAM上にＮＴＡ－Ｎｉ錯体（ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基）を形成し、その後、基板を純水で洗浄した。

[0310] ［３］鋳型の導入（工程（１－２））

図１２－３ａに準じて、基板に鋳型を導入し、鋳型の表面をメタクリロイル基で修飾した。

[0311] ［３－１］試薬等

・Ｍ２３$_1$：2-(2-pyridyl)dithioethyl methacrylamide



2-(2-pyridyl)dithioethyl methacrylamide

・・シグナル物質の結合用基２３’：ピリジルジスルフィド基（チオール基に変換される）

・・重合性官能基２７：メタクリロイル基

・・第１の可逆的連結基２２：配位結合

・・第２の可逆的連結基２３：ジスルフィド基

[0312] ［３－２］実験手順

上記［１］で作製したポリヒスチジンタグ及びチオール基で修飾されたシリカ粒子を基板に滴下し、静置（室温，１時間）させることでシリカ粒子を固定化した。

[0313] 基板を純水で洗浄後、2-(2-pyridyl)dithioethyl methacrylamideを５０μＬのＤＭＳＯに溶解させ、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で希釈することで、2-(2-pyridyl)dithioethyl methacrylamideを１００μＭ含むＰＢＳ溶液を調製した。基板をこの溶液に浸漬し、静置（２５℃、終夜）することで、ジスルフィド交換反応によりシリカ粒子表面にメタクリロイル基を導入した。

[0314] ［４］分子インプリントポリマーの合成（工程（１－３））

図１２－４に準じて、分子インプリントポリマーのポリマー膜を合成した。

[0315] ［４－１］試薬及び重合レシピ

・Ｍ２８：２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）

[0316] [表4]

試薬	濃度
2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC)	50 mM
2,2'-Bipyridyl	2 mM
$CuBr_2$	1 mM
L-Ascorbic acid	0.5 mM
PBS (10 mM phosphate,140 mM NaCl, pH7.4)	10 mL

[0317] ［４－２］実験手順

表４の重合レシピに従い、表面開始原子移動ラジカル重合（ＳＩ－ＡＴＲＰ）系を、上記［３］で得られた基板上に構築し、分子インプリントポリマー２０ａのポリマー薄膜を合成した。具体的には、シュレンクフラスコに上記重合レシピのＬ－アスコルビン酸を除く溶液を調製し、上記［３］で得られた基板を入れて窒素置換した後、Ｌ－アスコルビン酸をシリンジで注入し重合を開始した。重合は４０℃で３時間行い、その後、基板を純水で洗浄した。

[0318] ［５］鋳型の切り出し（工程（１－４））

図１２－５に準じて、分子インプリントポリマーから鋳型を切り出し、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃ’を得た。

[0319] 上記［４］で得られた基板に１００ｍＭのＥＤＴＡ－４Ｎａの水溶液を滴下して静置（室温，１５分）することでCu^{2+}を除去した。次に、基板を純水で洗浄し、５０ｍＭのＴＣＥＰ水溶液を滴下して静置（室温，３時間）することでジスルフィド結合を還元し、チオール基（シグナル物質の結合用基２３’）へ変換した。その後、基板を純水で洗浄し、０．５ｗｔ％のＳＤＳを含有する５０ｍＭ酢酸バッファー（ｐＨ４．０）に浸漬させ、振盪（２５℃，終夜）することで基板上のＮＴＡ－Ｎｉ錯体とシリカ粒子上のポリヒスチジンタグとのキレート（配位結合）を切断し、Ｎｉ－ＮＴＡ基（標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’）へ変換し、シリカ粒子を除去した。これによって、基板状の検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’を得た。

[0320] ［６］抗ＨＥＲ２アフィボディ及びAlexa Fluor 647の導入（工程（２）及び工程（３））

図１２－６に準じて、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃ’に、Alexa Fluor 647及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した。

[0321] ［６－１］試薬

・Ｒ４３：Alexa Fluor 647 C2-maleimide（サーモフィッシャーサイエンティフィク）

・・シグナル基４３：Alexa Fluor 647

・・結合性基２３’’：マレイミド基

・Ｒ４２：Z342-EGFP-Histag

・・特異的結合性基４２：抗ＨＥＲ２アフィボディ

・・結合性基２２’’：ポリヒスチジンタグ

・・他のシグナル基ｓｇ：ＥＧＦＲ

Z342-EGFP-Histagにおける抗ＨＥＲ２アフィボディのＨＥＲ２に対する生来的なＫｄは、ＥＧＦＲが融合している影響によって、ＥＧＦＲが融合して

いない抗ＨＥＲ２アフィボディのＨＥＲ２に対する生来的なＫｄに比べて大きい（つまり、ＥＧＦＲが融合していない抗ＨＥＲ２アフィボディよりも結合能が劣る）。実際にZ342-EGFP-Histagにおける抗ＨＥＲ２アフィボディ分子のＨＥＲ２に対する生来的なＫｄは、１．０６×１０$^{-10}$Ｍであった。

[0322] ［６－２］実験手順

上記［５］で得られた基板状の検出対象の分析センサ作製用基材１０ａ－Ｃ’を純水で洗浄し、１００μＭのAlexa Fluor 647 C_2 Maleimide（２０％ＤＭＳＯ水溶液中）を滴下して静置（室温、１時間）することで、分子インプリント凹部２１内のチオール基（シグナル物質の結合用基２３’）を利用して蛍光基Alexa Fluor 647（シグナル基４３）を導入した。

[0323] 基板を純水で洗浄後、０．３μＭのZ342-EGFP-Histagを含むＰＢＳ（１０ｍＭ phosphate，１４０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）溶液を滴下して静置（室温，１時間）することで、分子インプリント凹部２１内のニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基（特異的結合性分子の結合用基２２’）を利用して抗ＨＥＲ２アフィボディ（特異的結合性基４２）を導入した。これによって、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃを得た。

[0324] ［７］蛍光測定による検出対象の分析

上記［６］で得られた基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃを用い、SIC自動分注装置つき蛍光顕微鏡によるエクソソーム捕捉試験を行った。

[0325] ［７－１］実験手順

ＳＫ－ＢＲ－３細胞株（Ｈｅｒ２高発現）培養上清から次のようにしてエクソソーム（ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソーム）を精製した。

[0326] ＤＭＥＭ培地（１０％ＦＢＳ（エクソソームフリー），１％ペニシリン含有）で３日間ＳＫ－ＢＲ３細胞を培養した上清を１５００ｇで１０分，３０００Ｇで１０分遠心分離した上清を限外ろ過（５００Ｇで１０分×２回）した。限外ろ過によって得られたエクソソーム溶液を、エクソソーム抽出キットｑＥＶ（メイワフォーシス）を用いて精製した。エクソソームの粒子径及び濃度は、ｑ－Ｎａｎｏを用いて測定した。

[0327] 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、３．３３×１０$^{-17}$Ｍ、８．３３×１０$^{-17}$Ｍ、１．６７×１０$^{-16}$Ｍ、３．３３×１０$^{-16}$Ｍ、８．３３×１０$^{-16}$Ｍ、１．６７×１０$^{-15}$Ｍ、３．３３×１０$^{-15}$Ｍ、及び１．６７×１０$^{-14}$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［６］で得られた基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃに添加した。

[0328] 蛍光顕微鏡の測定条件については、測定地点は基板上の９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。

[0329] ［７－２］相対蛍光強度とエクソソーム濃度との関係

相対蛍光強度を下記式に従って算出し、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１７Ａに示す。

[0330] [数1]

$$\Delta I = \frac{I - I_0}{I_0}$$

ΔI ：相対蛍光強度、I_0：エクソソーム濃度０の蛍光強度、I：各濃度の蛍光強度

[0331] 図１７Ａに示すように、Alexa Fluor 647及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃでは、エクソソーム濃度３．３３×１０$^{-17}$Ｍ～１．６７×１０$^{-14}$Ｍで２％弱～３％弱程度の消光が確認された。一方、後述の比較例１に示すように、抗ＨＥＲ２アフィボディを導入しない比較用の検出対象の分析センサでは、すべてのエクソソーム濃度において蛍光強度の変化は見られなかった。このことから、Alexa Fluor 647及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－ＣによってＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームが検出されたことが示された。

[0332] ［７－３］解離定数の導出

蛍光強度変化に基づいて、解離定数K_dを、DeltaGraphを用いたカーブフィッティングによって算出した。算出式は以下の通りである。

[0333] [数2]

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

Y：蛍光強度変化、H：エクソソーム濃度、G：ホスト分子の初濃度、
D：最大蛍光強度変化、K：結合定数（ただし、G = 0.01と仮定した。）

[0334] 結果、本実施例のAlexa Fluor 647を導入した基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃによる解離定数Ｋｄは、６．１×１０$^{-18}$Ｍであり、本実施例で用いた抗ＨＥＲ２アフィボディの生来的なＫｄ（１．０６×１０$^{-10}$）に対して８．５オーダーもの各段の向上効果が得られており、後述の比較例２と比較して驚異的な結合能向上効果が認められた。また、本実施例による結合能向上効果は、後述の実施例３、５と比較しても顕著に優れていた。

[0335] ［比較例１：アフィボディを含まない基板状の検出対象の分析センサ］

アフィボディを導入しないことを除いて実施例１と同様にして比較用の検出対象の分析センサを作製した。この比較用の検出対象の分析センサについて、実施例１と同様に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１７Ｂに示す。

[0336] 図１７Ｂに示すように、抗ＨＥＲ２アフィボディを導入しない比較用の検出対象の分析センサでは、すべてのエクソソーム濃度において蛍光強度の変化は見られなかった。

[0337] ［実施例２：基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃ（特異的結合性物質として抗ＨＥＲ２アフィボディ、シグナル物質としてローダミンを導入）］

本実施例では、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ$_1$－Ｃ（シグナル物質としてローダミンを導入）を作製した。この基板状の検出対象の分析センサは、実施例１と同様、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。また、シグナル物質としてローダミンを導入した。更に、得られた基板状の検出対象の分析センサを用いて検出対象の分析を行った。

[0338] ［１］実験手順

シグナル物質Ｒ４３としてAlexa Fluor 647 C2-maleimideの代わりにTetramethylrhodamine（ＴＡＭＲＡ）-5 C2 maleimideを用いたことを除いて、実施例１と同様の方法で作製した。同じようにして、合計３枚（Ｎ＝３）の基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃ（シグナル物質としてローダミンを導入）を作製した。

[0339] ［２］蛍光測定による検出対象の分析

上記［１］で得られた基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃ（シグナル物質としてローダミンを導入、Ｎ＝３）のそれぞれについて、実施例１と同様の方法でＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームの分析を行った。なお、エクソソームの濃度は、２．０×１０$^{-17}$M、５．０×１０$^{-17}$M、１．０×１０$^{-16}$M、２．０×１０$^{-16}$M、５．０×１０$^{-16}$M、１．０×１０$^{-15}$M、２．０×１０$^{-15}$M、及び１．０×１０$^{-14}$Mとした。蛍光顕微鏡の測定条件については、測定地点は７ポイント、フィルタはＧＷ（励起）－Ｃｙ３（蛍光）、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。結果を図１８に示す。

[0340] 結果、ローダミン及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃでは、実施例１のAlexa Fluor 647及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃに比べ、すべてのエクソソーム濃度において、１０倍以上の消光が確認され、顕著に高感度であることが認められた。例えば、エクソソーム濃度１．０×１０$^{-14}$Ｍでは、３０％強の消光が認められた。このような本実施例の感度は、後述の実施例３と比べても優れていた。更に、また、Ｎ＝３のいずれについてもこのような高感度検出が可能であり、再現性の点でも優れていることが分かった。この優れた再現性についても、前述の実施例１及び後述の実施例３と比べて顕著であった。

[0341] ［３］解離定数の導出

実施例１の［７］と同様に、蛍光強度変化に基づいて解離定数K_dを算出した。結果、本実施例のローダミン及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基

板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃによる解離定数K_dは、８．４１×１０$^{-18}$であり、本実施例で用いた抗ＨＥＲ２アフィボディの生来的なＫｄ（１．０６×１０$^{-10}$）に対して９オーダー弱ものという各段の向上効果が得られており、後述の比較例２と比較して驚異的な結合能向上効果が認められた。また、本実施例による結合能向上効果は、後述の実施例３、５と比較しても顕著に優れていた。

[0342] ［４］検出限界の導出

以下の式に従って検出限界（ＤＬ）も算出した。

[0343] [数3]

$$DL = 3.3s/a$$

s：エクソソーム濃度0の蛍光強度の標準偏差

a：濃度0，2.0×10^{-17}，5.0×10^{-17} [M] の平均蛍光強度による勾配

[0344] 結果、本実施例のローダミン及び抗ＨＥＲ２アフィボディを導入した基板状の検出対象の分析センサ１０a_1－Ｃによる検出限界（ＤＬ）は、５．１９×１０$^{-17}$Ｍであり、後述の実施例３と比較しても顕著に優れていた。

[0345] ［比較例２：抗体を導入した基板状の検出対象の分析センサ］

抗ＨＥＲ２アフィボディの代わりに抗Ｈｅｒ２抗体（この抗Ｈｅｒ２抗体の、Ｈｅｒ２に対する生来的な解離定数は、５．８×１０$^{-10}$Ｍ）を導入したことを除いて実施例１と同様にして分析用センサを作製した。具体的には、実施例１の［６］において、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃ’に、Z342-EGFP-Histagを結合する代わりに、以下の手順を行った。

[0346] ＰＢＳに溶解した１００μＭのポリヒスチジンプロテインＧを添加することで、ポリヒスチジンタグを介して抗体を結合可能なプロテインＧを固定化した。ＰＢＳに溶解した０．３μＭ　抗Ｈｅｒ２抗体を基板に添加することで、抗Ｈｅｒ２抗体をプロテインＧを介して固定化した。

[0347] 上記の点を除いて、実施例１と同様にして分析用センサを作製し、実施例２の［３］と同様にして解離定数を導出した。結果、本比較例の分析用センサによる解離定数K_dは、６．３４×１０$^{-16}$Ｍであり、本比較例で用いた抗Ｈ

ＥＲ２抗体の生来的なＫｄ（５．８×１０$^{-10}$）に対して６オーダーの向上効果にとどまった。

[0348] ［実施例３：基板状の検出対象の分析センサ（但し、特異的結合性基に融合したシグナル物質を利用する基板状の検出対象の分析センサ１０^{1}タイプのもの）］

本実施例では、基板状の検出対象の分析センサ（但し、特異的結合性基に融合したシグナル物質を利用する基板状の検出対象の分析センサ１０^{1}タイプのもの）を作製した。この基板状の検出対象の分析センサは、実施例１と同様、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。また、シグナル物質を導入せず特異的結合性基に融合したシグナル物質を利用した。更に、得られた基板状の検出対象の分析センサを用いて検出対象の分析を行った。

[0349] ［１］実験手順

Tetramethylrhodamine-5 C2 maleimideを導入する工程を除外したことを除いて、実施例３と同様にして基板状の検出対象の分析センサを作製した（Ｎ＝２）。つまり、本実施例の基板状の検出対象の分析センサは、実施例２の基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃと異なり、シグナル物質を導入していない。ここで、このセンサにおいては、特異的結合性基４２を与える特異的結合性分子Ｒ４２として上述（実施例１の欄）のとおりZ342-EGFP-His tag（蛍光基ＥＧＦＰが融合した抗ＨＥＲ２アフィボディとポリヒスチジンタグを有する分子）を用いているため、特異的結合性基４２は、厳密には、蛍光基ＥＧＦＰが融合した抗ＨＥＲ２アフィボディ、つまり、シグナル基４３が特異的結合性基４２に結合した特異的結合性基４４である。従って、本実施例の基板状の検出対象の分析センサは、特異的結合性基に融合したシグナル物質を利用する基板状の検出対象の分析センサ１０^{1}タイプのものである。

[0350] ［２］蛍光測定による検出対象の分析

上記［１］で得られた基板状の検出対象の分析センサ（抗ＨＥＲ２アフィボディに融合したＥＧＦＰを利用、Ｎ＝２）のそれぞれについて、実施例２と同様の方法及び条件（但し、フィルタはＥＧＦＰを測定するためＢＷ（励起）－Ｃｙ３（蛍光）に変更した）でＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームの分析を行った。結果を図１９に示す。

[0351] 結果、抗ＨＥＲ２アフィボディに融合したＥＧＦＰを利用した基板状の検出対象の分析センサ１０^{1}タイプのものでは、エクソソーム濃度１．０×１０$^{-14}$Ｍでの消光で、５％程度～１５％程度の振れ幅はあったが、高感度でエクソソームが検出された。

[0352] ［３］解離定数の導出

蛍光強度変化に基づいて、実施例１の［７］と同様にして解離定数K_dを算出した。結果、解離定数K_dは、２．２９×１０$^{-17}$であり、蛍光基ＥＧＦＰが融合した抗ＨＥＲ２アフィボディの生来的なＫｄ（１．０６×１０$^{-10}$）に対して各段に向上していた。

[0353] ［４］検出限界の導出

実施例２と同様にして検出限界（ＤＬ）も算出した。結果、検出限界（ＤＬ）は、３．７０×１０$^{-14}$Ｍであった。

[0354] ［実施例４：粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０－ＰＣ（特異的結合性物質として抗ＨＥＲ２アフィボディを導入）］

本実施例では、粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０－ＰＣを作製した。この粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサは、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。更に、得られた粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０－ＰＣを用いて検出対象の分析を行った。

[0355] 粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサの作製方法については、図１３－１ｂ、図１３－２、図１３－３、図１５に従って、基板状の検出

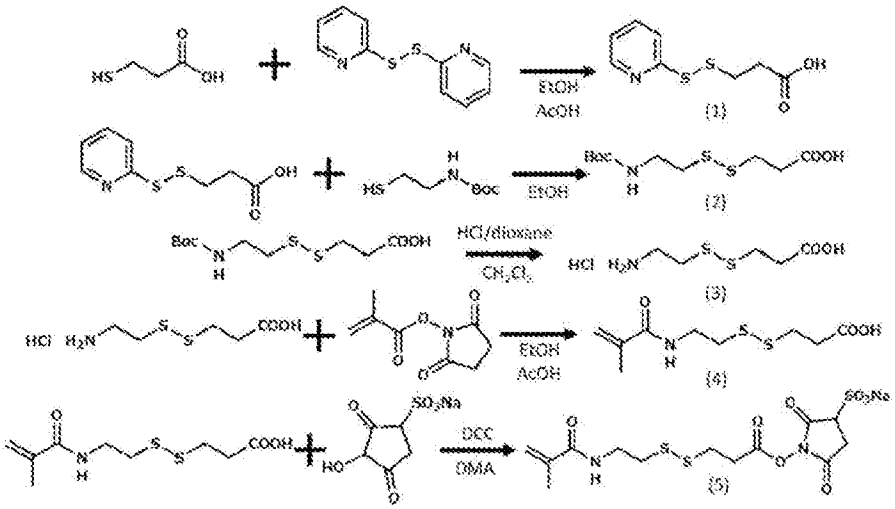
対象の分析センサ作製用基板１０－ＰＣ’を作製し、さらに、図１３－４に従って、検出対象の分析センサ１０－ＰＣを作製した。

[0356] ［１］ジスルフィド結合型メタクリロイル修飾試薬の合成

下記スキームに従って、後述の［２］で用いる、ジスルフィド結合型メタクリロイル修飾試薬（下記スキームの化合物（５））を合成した。本実施例では、この試薬を、結合性基ＢＧ２２’と第１の可逆的連結基２２重合性官能基２７とを含むモノマーＭ２２$_2$とし

て用いた。

[0357] [化20]



[0358] 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。

[0359] 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。

[0360] $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。

[0361] 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。

[0362] 精製した化合物（４）(290mg,1.16mmol, 1.1eq) とsulfo-NHS (230mg, 1.1mmol)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))

[0363] ［２］鋳型の修飾（工程（１－１１））

図１３－１ｂに準じて、ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基で修飾された鋳型ＨＳＡの作製を行った。

[0364] ［２－１］試薬

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

・・鋳型６０：ＨＳＡ

・・結合性基ＢＧ２２’’：アミノ基

・$M22_2$：上記［１］で合成された化合物（５）

・・結合性基ＢＧ２２’：カルボン酸活性エステル基

・・第１の可逆的連結基２２：ジスルフィド基

・・重合性官能基２７：メタクリロイル基

[0365] ［２－２］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、上記［１］で合成された化合物（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、ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基で修飾された鋳型ＨＳＡを得た。

[0366] ［３］分子インプリントポリマーの合成（工程（１－１２））

図１３－２に準じて、分子インプリントポリマーの粒子を合成した。

[0367] ［３－１］試薬及び重合レシピ

・Ｍ２８：２－メタクリロイロキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）

・Ｍ２９：Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＮＩＰＡｍ）

[0368] [表5]

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)
Pyrrolidyl acrylate (PyA)	63.6 mg (0.45 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

[0369] ［３－２］実験手順

表５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２０の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを合成した。

[0370] ［４］鋳型の除去（工程（１－１３））

図１３－３に準じて、分子インプリントポリマーから鋳型を除去した。

[0371] 分子インプリントポリマー２０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℃, 7500g, 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を還元して切断し、チオール基（標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’）を露出させた。

[0372] 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２０の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを得た。

[0373] ［５］粒子解析

得られたＭＩＰ－ＮＧｓについて、動的光散乱（ＤＬＳ）測定及び透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）測定を行った。ＴＥＭ測定では、透過型電子顕微像において粒子の長軸と短軸の平均値を粒径とし、ランダムに選んだ粒子１００個の当該粒径を測定してその平均値を個数平均粒子径とした。結果を下記表に示す。また、ＴＥＭ画像を図２０に示す。図２０中、スケールバーの長さは５０ｎｍである。

[0374] [表6]

DLS				TEM
Z 平均粒子径	体積平均粒子径	PDI	固形分濃度	個数平均粒子径
128.6 nm	156.4 nm	0.293	0.04	50-80nm

[0375] ［６］基板への粒子の固定

図１５（ただし、粒子状分子インプリントポリマー２０を、粒子状分子インプリントポリマー２０に読み替え）に準じて、上記［４］で得られた分子インプリントポリマー２０の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを基板に固定した。

[0376] 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ＢＧ９’’として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。これによって、検出対象の分析用センサ作製用基材１０－ＰＣ’を得た。

[0377] ［７］アフィボディの導入（工程（２））

図１３－４に準じて、上記［６］で得られた検出対象の分析用センサ作製用基材１０－ＰＣ’に、抗Ｈｅｒ２アフィボディを導入した。

[0378] ［７－１］試薬

・Anti-Her2 Affibody(R) Molecule （抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子、アブカム株式会社；この分子の生来的なＫｄは３．２×１０$^{-11}$M、分子量が６，０００程度である。）

・ジチオスレイトール

・・特異的結合性基４２：抗Ｈｅｒ２アフィボディ

・・結合性基２２’’：チオール基

[0379] ［７－２］実験手順

１ｍｇ／ｍＬ抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子の溶液（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Ｒ４２を得た。

[0380] 上記［６］で得た検出対象の分析用センサ作製用基材１０－ＰＣ’を、３．１ｍＭの２，２－ジピリジルジスルフィド溶液（エタノール：水＝１：１（体積比））に浸漬させ、２５℃で３時間インキュベートすることで、分子

インプリント凹部２１内のチオール基（標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’）をピリジルジスルフィド基（標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２’）に活性化させた。その後、ピリジルジスルフィド基に対して、１０μｇ／ｍＬの抗Ｈｅｒ２アフィボディを与える分子Ｒ４２の溶液を流速２０μＬ／分で７分インジェクトすることで抗Ｈｅｒ２アフィボディ基（特異的結合性基４２）を結合した。その後、１ｍｇ／ｍＬスキムミルク水溶液、１Ｍアミノエタノール（ｐＨ８．４）を順に反応させることで、基板表面（粒子の固定に用いられなかった結合性基ＢＧ９’’）のブロッキング処理を行った。これによって、検出対象の分析用センサ１０－ＰＣを得た。

[0381] ［８］ＳＰＲ測定による検出対象の分析

上記［７］で得られた粒子状かつ基板に固定された検出対象の分析用センサ１０－ＰＣを用い、ＳＰＲ測定を行った。

[0382] ［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、０×１０$^{-16}$Ｍ、０．０３２×１０$^{-16}$Ｍ、０．０６４×１０$^{-16}$Ｍ、０．１２５×１０$^{-16}$Ｍ、０．２５×１０$^{-16}$Ｍ、０．５×１０$^{-16}$Ｍ、１．０×１０$^{-16}$Ｍ、２．５×１０$^{-16}$Ｍ、５．０×１０$^{-16}$Ｍ、１０×１０$^{-16}$Ｍ、５０×１０$^{-16}$Ｍ、１００×１０$^{-16}$Ｍ、５００×１０$^{-16}$Ｍ、１０００×１０$^{-16}$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［７］で得られた粒子状かつ基板に固定された検出対象の分析用センサ１０－ＰＣに添加した。

[0383] ＳＰＲの測定条件については、以下の通りとした。

フローレート：２０μＬ／分

インジェクション量：１００μＬ

温度：２５℃

データポイント：インジェクション後６分経過時

ランニングバッファ：ＰＢＳ

[0384] ［８－２］結果

エクソソーム溶液のインジェクト直前及びインジェクト６分経過時におけるレゾナンスユニット（RU）値の差をレスポンスの変化量として、吸着等温線を作成した。その結果を図２１に示す。さらに、実施例１の［７］と同様にして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２．０×１０$^{-18}$（M）であり、本実施例で用いた抗ＨＥＲ２アフィボディ分子の生来的なＫｄ（３．２×１０$^{-11}$M）に対して各段に向上していた。

[0385] ［実施例５：粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣ（特異的結合性物質として抗ＨＥＲ２アフィボディ、シグナル物質としてＡＴＴＯ６４７Ｎを導入）］

本実施例では、粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣを作製した。この粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサは、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。また、シグナル物質として、ＡＴＴＯ６４７Ｎを導入した。更に、得られた粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣを用いて検出対象の分析を行った。

[0386] 粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣは、粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐが基板に固定されたものから、相互作用基２５が除外された態様のものである。従って、粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣの作製方法については、図１４－１、図１４－２（但し、相互作用基２５を有するモノマーＭ２５は用いない）、図１４－３、図１５、及び図１４－４に従って、粒子状の検出対象の分析センサ作製用基板１０ｂ－ＰＣ’を作製し、さらに、図１４－５に従って、検出対象の分析センサ１０ｂ－ＰＣを作製した。

[0387] ［１］鋳型の修飾（工程（１－２１））

図１４－１に準じて、ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基で修飾された鋳型ＨＳＡの作製を行った。

[0388] ［１－１］試薬

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

・・鋳型６０ｃ：ＨＳＡ

・・結合性基ＢＧ６’’：アミノ基

・Ｍ２７：実施例４の［１］で合成された化合物（５）

・・結合性基ＢＧ６’：カルボン酸活性エステル基

・・第３の可逆的連結基２６ｂ：ジスルフィド基

・・重合性官能基２７：メタクリロイル基

[0389] ［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、実施例４の［１］で合成された化合物（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、ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基で修飾された鋳型ＨＳＡを得た。

[0390] ［２］分子インプリントポリマーの合成（工程（１－２２））

図１４－２に準じて（但し、相互作用基２５を有するモノマーＭ２５は用いなかった）、分子インプリントポリマーの粒子を合成した。

[0391] 具体的には、実施例４の表５と同じ重合レシピに従い、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２０ｂ（分子インプリントポリマー２０ｃの相互作用基２５がない態様のもの）の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを合成した。

[0392] ［３］鋳型の除去（工程（１－２３））

図１４－３（但し、相互作用基２５は不在）に準じて、分子インプリント

ポリマーから鋳型を除去した。

[0393] 分子インプリントポリマー２０ｂ（分子インプリントポリマー２０ｃの相互作用基２５がない態様のもの）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を還元して切断し、チオール基（結合性基２６ｂ’）を露出させた。

[0394] 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２０ｂ（分子インプリントポリマー２０ｃの相互作用基２５がない態様のもの）の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを得た。

[0395] ［４］基板への粒子の固定

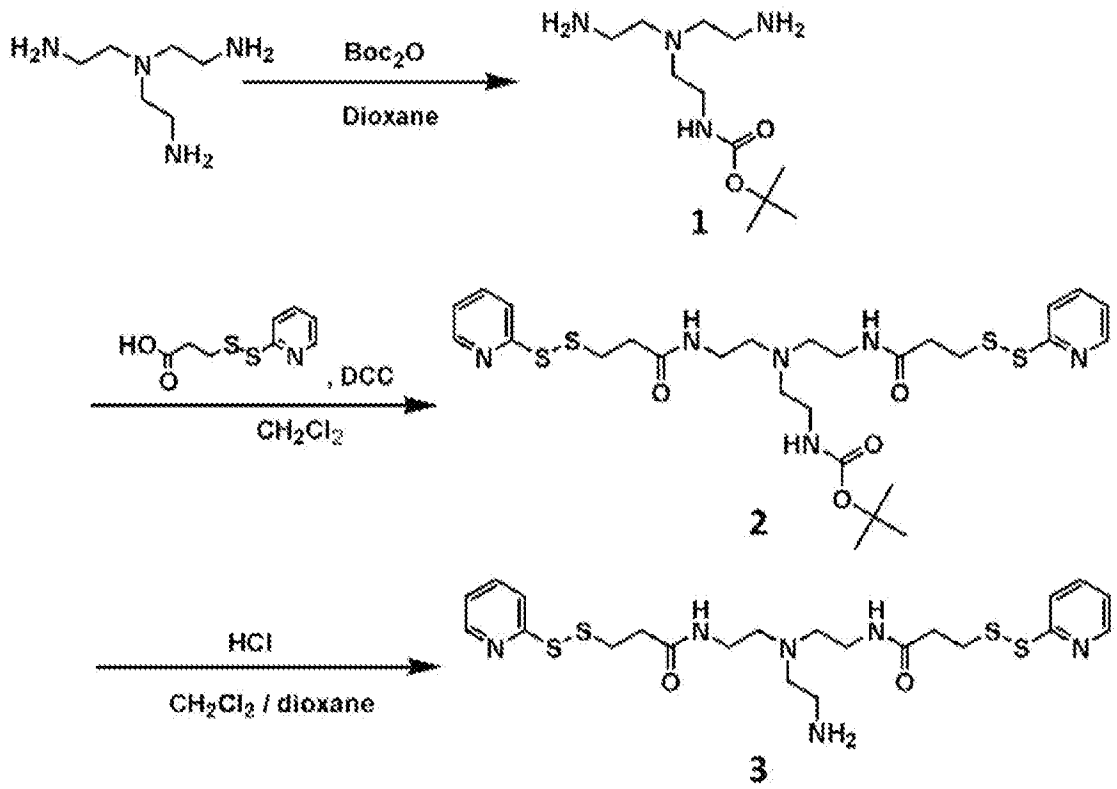
図１５（ただし、粒子状分子インプリントポリマー２０ｃを、粒子状分子インプリントポリマー２０ｂに読み替え）に準じて、上記［３］で得られた分子インプリントポリマー２０ｂ（分子インプリントポリマー２０ｃの相互作用基２５がない態様のもの）の粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを基板に固定した。具体的な実験手順は、実施例４の［６］と同様である。

[0396] ［５］機能性分子Ｒ２４の合成

下記スキームに従って、後述の［６］で用いる、機能性基２４ｂと標的に対する特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’とを有する機能性分子Ｒ２４を合成した。機能性分子Ｒ２４は、上記式（７ａ）で表される化合物である。

[0397]

[化21]



[0398] 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 oC→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)

[0399] (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)

[0400] 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-)

[0401] ［６］機能性基２４ｂの導入（工程（１－２４））

図１４－４（但し、相互作用基２５は不在）に準じ、機能性分子Ｒ２４を、分子インプリント凹部２１ｃ（但し、相互作用基２５は不在）の結合性基２６ｂ’’に導入した。

[0402] ［６－１］試薬

・機能性分子Ｒ２４：上記［５］で得られた、上記式（７ａ）で表される化合物

・・特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’：ピリジルジスルフィド基

・・シグナル物質の結合用基２３ｂ’：アミノ基

・・結合性基２６ｂ’’：ピリジルジスルフィド基

[0403] ［６－２］実験手順

上記［４］で得られた分子インプリントポリマー２０ｂ（分子インプリントポリマー２０ｃの相互作用基２５がない態様のもの）の粒子ＭＩＰ－ＮＧ

ｓが固定された基板を、機能性分子Ｒ２４の９００μｇ／ｍＬＰＢＳ溶液に浸漬し、機能性分子Ｒ２４のピリジルジスルフィド基（結合性基２６ｂ’’）と分子インプリントポリマー２０ｂのチオール基（結合性基２６ｂ’）とを、室温℃で２時間反応させた。これによって、検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｂ－ＰＣ’を得た。

[0404] ［７］アフィボディ及び蛍光物質の導入（工程（２）及び工程（３））

図１４－５（但し、相互作用基２５は不在）に準じ、検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｂ－ＰＣ’に、抗Ｈｅｒ２アフィボディと蛍光物質とを導入した。

[0405] ［７－１］試薬

・抗Ｈｅｒ２アフィボディを与える分子Ｒ４２：Anti-Her2 Affibody(R) Molecule （抗Ｈｅｒ２アフィボディ分子、アブカム株式会社）及びジチオスレイトールを用い、実施例４の［７－２］で合成された化合物

・・特異的結合性基４２：抗Ｈｅｒ２アフィボディ（この分子の生来的なＫｄは３．２×１０$^{-11}$M、分子量が６，０００程度である。）

・・結合性基２２ｂ’’：チオール基

・シグナル物質Ｒ４３：Atto647N-NHS (ATTO-TEC)

・・シグナル基４３：Atto647N

・・結合性基２３ｂ’’：カルボン酸活性エステル基

[0406] ［７－２］実験手順

抗Ｈｅｒ２アフィボディを与える分子Ｒ４２の１０μｇ／ｍＬＰＢＳ溶液を、上記［７］でえられた検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｂ－ＰＣ’と反応させ（室温、２時間）、ピリジルジスルフィド基（特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’）に抗Ｈｅｒ２アフィボディ（特異的結合性基４２）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（特異的結合性分子の結合用基２２ｂ’の残存基）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（シグナル物質の結合用基２３ｂ

’）にAtto647N（シグナル基４３）を導入した。これによって、検出対象の分析用センサ１０ｂ－ＰＣ（検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの相互作用基２５が無い態様のものが基板に固定されたもの）を得た。

[0407] ［８］蛍光測定による検出対象の分析

上記［７］で得られた検出対象の分析用センサ１０ｂ－ＰＣ（検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの相互作用基２５が無い態様のものが基板に固定されたもの）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。

[0408] ［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［７］で得られた検出対象の分析用センサに滴下した。

[0409] 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。

[0410] ［８－２］結果

相対蛍光強度を実施例１と同様にして、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２２に示す。

[0411] 図２２に示すように、上記［７］で得られた検出対象の分析用センサ１０ｂ－ＰＣ（検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの相互作用基２５が無い態様のものが基板に固定されたもの）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。

[0412] 実施例１の［７］と同様にして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）であり、本実施例で用いた抗ＨＥＲ２アフィボディ分子の生来的なＫｄ（３．２×１０$^{-11}$Ｍ）に対して各段に向上していた。また、実施例２の［４］と同様にして検出限界

を導出した。その結果、検出限界は５．９３×１０$^{-18}$（Ｍ）であった。

[0413] 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検出対象の分析用センサ１０ｂ－ＰＣ（検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐの相互作用基２５が無い態様のものが基板に固定されたもの）を得た。抗ＨＥＲ２アフィボディが導入された本実施例の分析用センサと、抗ＨＳＡアフィボディが導入された別の分析用センサとに対し、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２３に示す。

[0414] 図２３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本実施例の分析用センサによって特異的に検出された。

[0415] ［実施例６：基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃ（特異的結合性物質として抗ＨＥＲ２ナノボディ、シグナル物質としてAlexa Fluor 647を導入）］

抗ＨＥＲ２アフィボディの代わりに抗Ｈｅｒ２ナノボディを導入したことを除いて実施例１と同様にして、基板状の検出対象の分析センサ１０ａ－Ｃ（シグナル物質としてAlexa Fluor 647を導入）を作製した。抗Ｈｅｒ２ナノボディ分子の生来的なＫｄは、１×１０$^{-9}$Ｍである。

[0416] 実施例１の［７］と同様にして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５．８１×１０$^{-19}$（Ｍ）であり、本実施例で用いた抗ＨＥＲ２ナノボディ分子の生来的なＫｄ（１×１０$^{-9}$Ｍ）に対して各段に向上していた。

[0417] ［実施例７：基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐ（特異的結合性物質として抗ＨＥＲ２アフィボディ、シグナル物質としてＡＴＴＯ６４７Ｎを導入）］

本実施例では、粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐの基板に固定さ

れた態様のものを作製した。この粒子状且つ基板に固定された検出対象の分析センサは、検出対象を、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とし、検出対象の標的をＨＥＲ２とし、特異的結合性分子として抗ＨＥＲ２アフィボディを選択して導入した。また、シグナル物質として、ＡＴＴＯ６４７Ｎを導入した。また、この分析センサは、鋳型であるＨＳＡと相互作用する相互作用基２５も有する。更に、得られた基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐを用いて検出対象の分析を行った。

[0418] 基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐの作製方法については、図１４－１、図１４－２、図１４－３、図１５、及び図１４－４に従って、粒子状の検出対象の分析センサ作製用基板１０ｃ－Ｐ’の基板に固定された態様のものを作製し、さらに、図１４－５に従って、基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐを作製した。

[0419] ［１］鋳型の修飾（工程（１－２１））

図１４－１に準じて、ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基で修飾された鋳型ＨＳＡの作製を行った。

[0420] ［１－１］試薬

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

・・鋳型６０ｃ：ＨＳＡ

・・結合性基ＢＧ６’’：アミノ基

・・相互作用部位６５ｃ：カルボキシル基

・Ｍ２７：実施例４の［１］で合成された化合物（５）

・・結合性基ＢＧ６’：カルボン酸活性エステル基

・・第３の可逆的連結基２６ｂ：ジスルフィド基

・・重合性官能基２７：メタクリロイル基

[0421] ［１－２］実験手順

実施例５の［１－２］と同じ手順を行った。

[0422] ［２］分子インプリントポリマーの合成（工程（１－２２））

図１４－２に準じて、分子インプリントポリマーの粒子を合成した。

[0423] ［２－１］試薬及び重合レシピ

・Ｍ２５：ピロリジルアクリレート（ＰｙＡ）

・・相互作用基２５：ピロリジル基

・Ｍ２８：２－メタクリロイロキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）

・Ｍ２９：Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＮＩＰＡｍ）

[0424] [表7]

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)
Pyrrolidyl acrylate (PyA)	63.6 mg (0.45 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

[0425] ［２－２］実験手順

表７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２０ｃの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを合成した。

[0426] ［３］鋳型の除去（工程（１－２３））

図１４－３に準じて、分子インプリントポリマー２０ｃから鋳型を除去した。具体的な手順は、実施例５の［３］と同様である。

[0427] ［４］粒子解析

得られた分子インプリントポリマー２０ｃの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓについて、実施例４の［５］と同様にして、動的光散乱（ＤＬＳ）測定及び透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）測定を行った。測定結果を下記表に示す。また、ＴＥＭ画像を図２４に示す。図２４中、スケールバーの長さは５０ｎｍである。

[0428]

[表8]

DLS				TEM
Z 平均粒子径	体積平均粒子径	PDI	固形分濃度	個数平均粒子径
152.5 nm	27.96 nm	0.31	0.04	20-30nm

[0429] ［５］基板への粒子の固定

図１５に準じて、上記［３］で得られた分子インプリントポリマー２０ｃの粒子ＭＩＰ－ＮＧｓを基板に固定した。具体的な実験手順は、実施例４の［６］及び実施例５の［４］と同様である。これによって、基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ作製用基板１０ｃ－Ｐ’を得た。

[0430] ［６］機能性基２４ｂの導入（工程（１－２４））

図１４－４に準じ、機能性分子Ｒ２４を、分子インプリント凹部２１ｃの結合性基２６ｂ’’に導入した。具体的な実験手順は、実施例５の［６］と同様である。

[0431] ［７］アフィボディ及び蛍光物質の導入（工程（２）及び工程（３））

図１４－５に準じ、基板に固定された検出対象の分析用センサ作製用基材１０ｃ－Ｐ’に、抗Ｈｅｒ２アフィボディと蛍光物質（Atto647N-NHS）とを導入した。具体的な実験手順は、実施例５の［７］と同様である。これによって、基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐを得た。

[0432] ［８］蛍光測定による検出対象の分析

上記［７］で得られた、基板に固定された検出対象の分析用センサ１０ｃ－Ｐ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。

[0433] ［８－１］実験手順

ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームと、ＨＳＡとを、下記表に示す濃度で含む（ａ）～（ｄ）の試料液を調製した。

[0434]

[表9]

	SK-BR-3 細胞由来エクソソーム終濃度（M）	HSA 終濃度（M）
(a)	1.93×10^{-16}	0
(b)	1.93×10^{-16}	0.72×10^{-4}
(c)	1.93×10^{-16}	1.50×10^{-4}
(d)	1.93×10^{-16}	7.52×10^{-4}

[0435] 調製された試料液を、上記［７］で得られた基板に固定された粒子状の検出対象の分析センサ１０ｃ－Ｐに添加した。

[0436] 蛍光顕微鏡の測定条件については、各試料あたり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。

[0437] ［８－２］結果

相対蛍光強度を実施例１と同様にして、相対蛍光強度を算出した。結果を図２５に示す。図２５に示すように、試料液（ａ）～（ｄ）はいずれも同じ濃度の検出対象（ＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソーム）を含むに関わらず、試料液（ｄ）のようにＨＳＡがある程度の濃度ある場合は全く消光が確認されない一方で、試料液（ａ）～（ｃ）のようにＨＳＡ濃度がゼロ又は低い場合には消光が確認された。ＨＳＡがある程度の濃度である試料液（ｄ）では、図１６－１に示すように、ＨＳＡが相互作用基２５及びＨＳＡを鋳型とする分子インプリント凹部２１ｃによって捕捉され、これにより抗Ｈｅｒ２アフィボディ（特異的結合性基４２）が遮蔽される一方で、ＨＳＡ濃度がゼロ又は低い試料液（ａ）～（ｃ）では、図１６－２に示すようにＨＳＡが捕捉されず、抗Ｈｅｒ２アフィボディ（特異的結合性基４２）が露出し、検出対象であるＳＫ－ＢＲ－３細胞が発現するエクソソームが捕捉されるという、二重ターゲティングが奏された結果であると認められる。

[0438] 上記実施例１～７及び比較例２で作製した検出対象の分析用センサの概要を表１０に示す。

[表10]

	実施例 1	実施例 2	比較例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7
センサタイプ	$10a_1$-C	$10a_1$-C	実施例1,2の抗体置換タイプ	10_1	10-PC	10b-PC	10a-C	10c-P
MIPポリマー形状	膜	膜	膜	膜	粒子	粒子	膜	粒子
MIPポリマー粒子径 (nm)	-	-	-	-	体積平均:156.4 Z平均:128.6 個数平均:50-80		-	体積平均:27.96 Z平均:152.5 個数平均:20-30
センサ形状	基板	基板	基板	基板	基板	基板	基板	粒子
鋳型	シリカ粒子	シリカ粒子	シリカ粒子	シリカ粒子	HSA	HSA	シリカ粒子	HSA
鋳型大きさ(nm)	200	200	200	200	-	-	200	-
鋳型分子量	-	-	-	-	66500	66500	-	66500
シグナル基 43	Alexa Flour 647	ローダミン	Alexa Flour 647	融合EGFP	-	ATTO647N	Alexa Flour 647	ATTO647N
特異的結合性基 42	抗Her2アフィボディ	抗Her2アフィボディ	抗Her2抗体	抗Her2アフィボディ	抗Her2アフィボディ	抗Her2アフィボディ	抗Her2ナノボディ	抗Her2アフィボディ
他のシグナル基 sg	融合EGFP	融合EGFP	-	-	-	-	-	-
特異的結合性基 42 分子量	6,000	6,000	150,000	6,000	6,000	6,000	15,000	6,000
特異性結合性基の生来的な解離定数 (M)	1.06×10^{-10}	1.06×10^{-10}	5.8×10^{-10}	1.06×10^{-10}	3.2×10^{-11}	3.2×10^{-11}	1×10^{-9}	-
センサによる解離定数 (M)	**6.1×10^{-18}**	**8.41×10^{-18}**	**6.34×10^{-16}**	**2.29×10^{-17}**	**2.0×10^{-18}**	**1.0×10^{-17}**	**5.81×10^{-19}**	

[0439] ［実施例８：ＰＳＡ用センシング用粒子（非固定）を用いた免疫応答］

本実施例では、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。

[0440] 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、実施例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。

[0441] 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。

[0442] 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（実施例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。

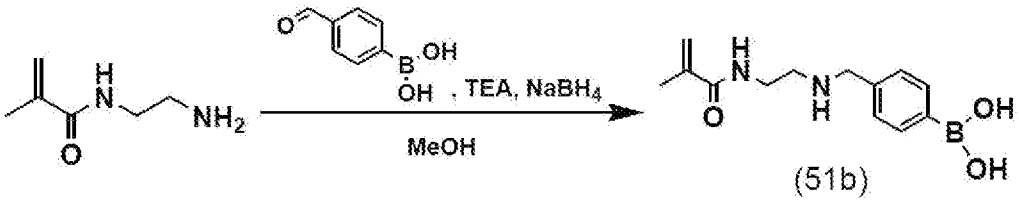
[0443] ［実施例９：センシング用ナノ粒子の合成－５］

本実施例では、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。

[0444] 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。

[0445] [化22]



(51b)

[0446] 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：ｕｎｉｖｅｒｓ

ａｌ　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)

[0447] 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　ＡＨＰ，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。

[0448] 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。

[0449] [表11]

		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	

[0450]　得られたＭＩＰ－ＮＧｓ（実施例５）及びＮＩＰ－ＮＧｓ（比較例４）に

ついて、実施例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。

[0451] 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。

[0452] 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。

[0453] 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

[0454] 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。

[0455] 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。

[0456] 本開示の好ましい実施形態は上記の通りであるが、本開示はそれらのみに限定されるものではなく、本開示の趣旨から逸脱することのない様々な実施形態が他になされる。本出願は、日本国で２０２０年９月２３日に出願された特願２０２０－１５９００８号および２０２１年３月１日に出願されたPCT JP2021/007726に対して優先権主張を伴うものであり、その内容は全てが参照として援用される。

符号の説明

[0457] 分析用センサ作製用基材…１０’，１０ａ’，１０ｂ’，１０ｃ’

分析用センサ作製用基材（基板状）…１０－Ｃ’，１０ａ－Ｃ’

分析用センサ作製用基材（粒子状）…１０－Ｐ’，１０ａ－Ｐ’，１０ｃ－Ｐ’

分析用センサ作製用基材（粒子固定基板状）…１０－ＰＣ’，１０ｂ－ＰＣ’

分析用センサ…１０，１０_{1}，１０ａ，１０ｂ，１０ｃ

分析用センサ（基板状）…１０－Ｃ，１０ａ－Ｃ，$１０ａ_{1}$－Ｃ

分析用センサ（粒子状）…１０－Ｐ，１０ａ－Ｐ，１０ｃ－Ｐ

分析用センサ（粒子固定基板状）…１０－ＰＣ，１０ｂ－ＰＣ

分子インプリントポリマー…２０，２０ａ，２０ｂ，２０ｃ

分子インプリント凹部…２１，２１ｃ

標的に対する特異的結合性分子の結合用基…２２’，２２ｂ’（チオール、ジスルフィド）

結合性基…２２’’（ジスルフィド）

特異的結合性分子の結合用基及び重合性官能基を含むモノマー…Ｍ２２

第１の可逆的連結基…２２

シグナル物質の結合用基…２３’，２３ｂ’

第２の可逆的連結基…２３

重合性モノマー（シグナル物質の結合用基を与えるモノマー）…$Ｍ２３_{1}$，$Ｍ２３_{2}$

機能性基…２４ｂ

機能性基と標的に対する特異的結合性分子の結合用基とを有する機能性分子…Ｒ２４（検出対象前記分子インプリント凹部の鋳型との）相互作用基…２５

鋳型との相互作用基を含むモノマー…Ｍ２５

結合性基…２６ｂ’’

第３の可逆的連結基２６ｂ

重合性官能基…２７

重合性モノマー…$M22_1$

重合性モノマー（例えば化合物（５））…$M22_2$

重合性モノマー（例えば生体適合性モノマー）…Ｍ２８

重合性モノマー（例えばアクリルアミドモノマー）…Ｍ２９

基板…３０

（基板上の）結合性基…ＢＧ１’

（標的に対する）特異的結合性基…４２

（標的に対する）特異的結合性分子…Ｒ４２

他のシグナル基…ｓｇ

他のシグナル基を有する特異的結合性基…42_1

シグナル基…４３

シグナル物質…Ｒ４３

シグナル基を有する特異的結合性基…４４

鋳型…６０，60_1，60_2，６０ｃ

（鋳型上の）相互作用部位…６５ｃ

（鋳型上の）結合性基…ＢＧ６’’，ＢＧ９’’ ＢＧ２２’’，ＢＧ２３’’

（ＢＧ６’’，ＢＧ９’’，ＢＧ２２’’，ＢＧ２３’’に対応する）結合性基…ＢＧ６’，ＢＧ９’ ＢＧ２２’，ＢＧ２３’

検出対象…７０

標的…７２

ＩＮＩ…重合開始性基

ＳＡＭ…単分子膜

請求の範囲

[請求項1] 検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、

前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する結合性分子の結合用基と

を有する分子インプリントポリマーを含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、

検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項2] 検出対象の標的を受け入れる分子インプリント凹部と、

前記分子インプリント凹部内に設けられた、前記標的に対する結合性分子の結合用基と

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凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項3] 前記分子インプリント凹部内に、更にシグナル物質の結合用基を有する、請求項１または２に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項4] 前記分子インプリント凹部表面において、前記結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が互いに独立している、請求項３に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項5] 前記分子インプリント凹部内において、前記結合性分子の結合用基及び前記シグナル物質の結合用基が、下記式（１）で示される機能性基を構成している、請求項３に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化23]

$$\text{---}R^2\text{---}L^1\text{---}R^1 \qquad (1)$$

[R^1は前記結合性分子の結合用基を表し、L^1は直接結合又は連結基

を表し、R^2は前記シグナル物質の結合用基を含む連結基を表す。]

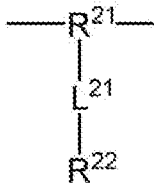
[請求項6] 前記シグナル物質の結合用基を含む連結基が、下記式（２）又は（３）で示される、請求項５に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[化24]



(2)

[化25]



(3)

[R^3は、水素、若しくは、ポリアルキレングリコール鎖を含んでよい炭素数１～８のアルキル基を表し、R^{21}は窒素原子又は炭化水素を表し、L^{21}は直接結合又は連結基を表し、R^{22}は前記シグナル物質の結合用基を表す。]

[請求項7] 前記結合性分子の結合用基が、アミノ基、カルボキシ基、ボロン酸基、cis-ジオール基、アルデヒド基、ケトン基、オキシアミノ基、ヒドラジド基、ビオチン(ビオシチン、デスチオビオチン)基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、およびピリジルジスルフィド基からなる群から選択される基である、請求項１～６のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項8] 前記結合性分子の結合用基が、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基、およびピリジルジスルフィド基からなる群から選択される基である、請求項１～７のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項9] 前記結合性分子の結合用基が、抗体のFcドメイン結合タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、請求項7に記載の結合用基を１つもしくは複数含むポリマー、デンドリマー、また

はオリゴDNAを介して小型物質に適合される、請求項１～８のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項10] 前記抗体のFcドメイン結合タンパク質が、プロテインA、プロテインG、プロテインL、またはプロテインA/Gである、請求項１～９のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項11] 前記分子インプリント凹部内に、前記検出対象又は前記分子インプリント凹部の鋳型との相互作用基を更に有する、請求項１～１０のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項12] 前記結合性分子が、特異的結合性分子である、請求項１～１１のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項13] 前記特異的結合性分子が、抗体ミメティック、リン脂質結合性タンパク質、人工(高分子)レセプター及びレクチンからなる群から選択される、請求項１～１２のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項14] 前記検出対象が、膜構造を有する微小粒体である、請求項１～１３のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項15] 前記分子インプリント凹部の鋳型が粒子コアまたは生体分子である、請求項１～１４のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項16] 前記分子インプリント凹部の鋳型がシリカ粒子または血清タンパク質である、請求項１～１５のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項17] 前記分子インプリント凹部の鋳型が血清タンパク質であり、前記検出対象が膜構造を有する微小粒体であり、前記標的が前記微小粒体の表面に発現している分子である、請求項１～１６のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項18] 基板と、前記基板の表面上に設けられたポリマー膜と、を含み

前記インプリントポリマーが前記ポリマー膜を構成している、請求

項１～１７のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項19] 前記インプリントポリマーが粒子状である、請求項１～１７のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項20] 粒子状の前記インプリントポリマーが、基板上に固定されている、請求項１９に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材。

[請求項21] 請求項１～２０のいずれか１項に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材と、

前記特異的結合性分子の結合用基に結合した前記検出対象の標的に対する特異的結合性基とを含み、

前記特異的結合性基が小型物質基である、検出対象の分析用センサ。

[請求項22] 前記シグナル物質の結合用基に結合したシグナル基をさらに含む、請求項２１に記載の検出対象の分析用センサ。

[請求項23] 請求項２１又は２２に記載の検出対象の分析用センサに、検出対象を含む試料を接触させ、前記特異的結合性基に前記検出対象を結合する工程と、

前記特異的結合性基と前記検出対象との結合を検出する工程と、

を含む、検出対象の分析法。

[請求項24] 基板に、検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）と、

前記結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）と、

重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、前記鋳型の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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）と、

前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記結合性分子の結合用基へ

変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）と、
を含み、
前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項25] 基板に、検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基と重合開始性基とを表面に有する単分子膜を形成する単分子膜形成工程（１－１）と、
前記結合性分子の結合用基に対し、第１の可逆的連結基を介して、鋳型を導入する工程（１－２）と、
重合性モノマーを加え、前記重合性モノマーを基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、前記鋳型の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ことで前記基板表面にポリマー膜を形成する工程（１－３）と、
前記第１の可逆的連結基を開裂させて前記結合性分子の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する工程（１－４）と、
を含み、
該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項26] 前記鋳型の前記表面を、第２の可逆的連結基を介して重合性官能基で修飾する修飾工程を含み、
前記工程（１－３）において、前記重合性モノマー及び前記重合性官能基を基質とし、前記重合開始性基を重合性開始剤として、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し、
前記工程（１－４）において、前記第１の可逆的連結基及び前記第２の可逆的連結基を開裂させてそれぞれ前記結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基へ変換するとともに前記鋳型を除去する、請求項１６に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項27] 表面が、第１の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（１－１１）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（１－１２）と、

前記第１の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し、前記結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）と、を含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項28] 表面が、第１の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（１－１１）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（１－１２）と、

前記第１の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し、前記結合性分子の結合用基を生じる工程（１－１３）と、を含み、

該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項29] 表面が第３の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（１－２１）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（１－２２）と、

前記第３の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（１－２３）と、

検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）と、を含み、

前記結合性分子の結合用基が小型物質に適合される基である、検出

対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項30] 表面が第３の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（１－２１）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（１－２２）と、

前記第３の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（１－２３）と、

検出対象の標的に対する結合性分子の結合用基及びシグナル物質の結合用基を含む機能性基を有する分子を、第３の可逆的連結基を介して導入する工程（１－２４）と、を含み、

該分子インプリント凹部が、小型物質に適合される形状または構成を有する、

検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項31] 前記工程（１－２２）において、前記鋳型との相互作用基を含むモノマーをさらに前記基質とする、請求項２９または３０に記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項32] 前記結合性分子が、特異的結合性分子である、請求項１７～２１のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法。

[請求項33] 請求項２４～３２のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

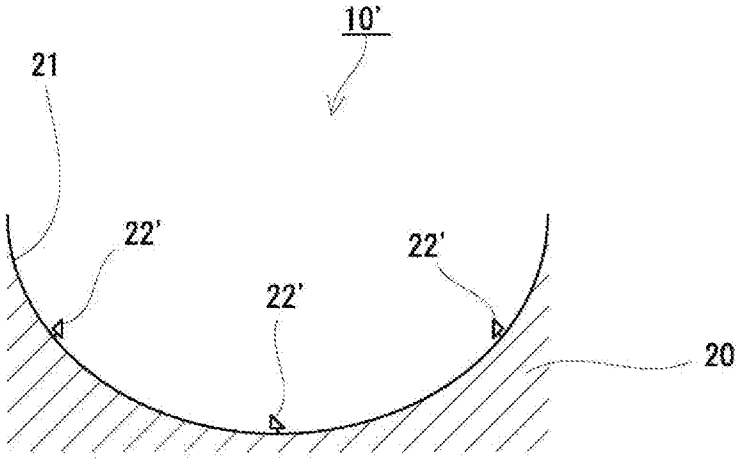
前記結合性分子の結合用基に、前記結合性分子を結合する工程（２）と、を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

[請求項34] 請求項２６、２９及び３１のいずれかに記載の検出対象の分析用センサ作製用基材の製造方法を行う工程（１）と、

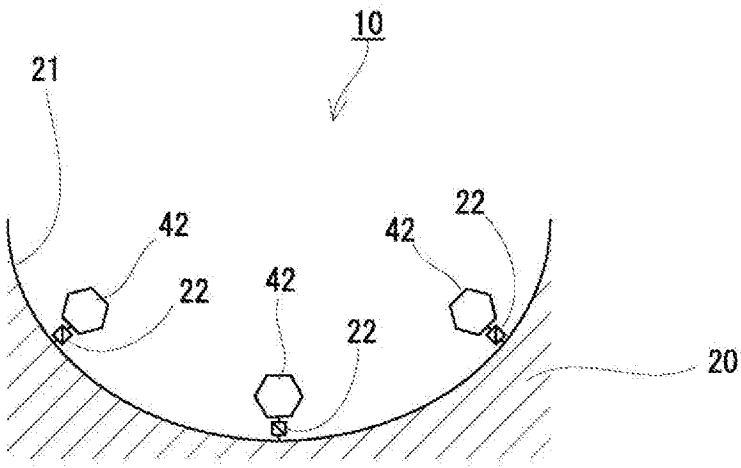
前記結合性分子の結合用基に、前記結合性分子を結合する工程（２）と、

前記シグナル物質結合用基にシグナル物質を結合する工程（３）を含む、検出対象の分析用センサの製造方法。

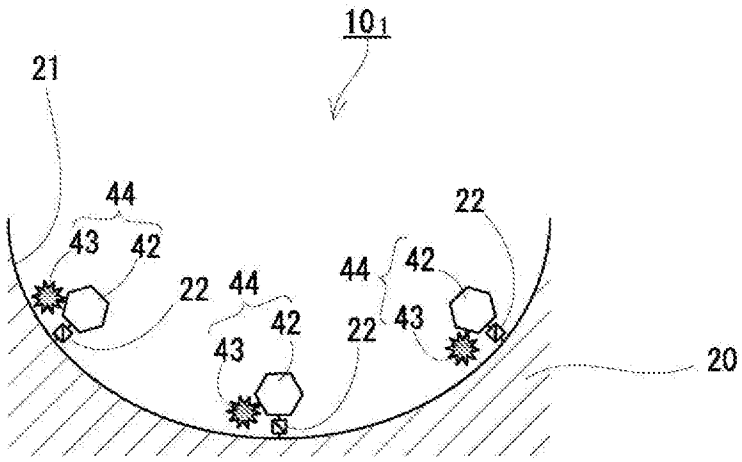
[図1A]



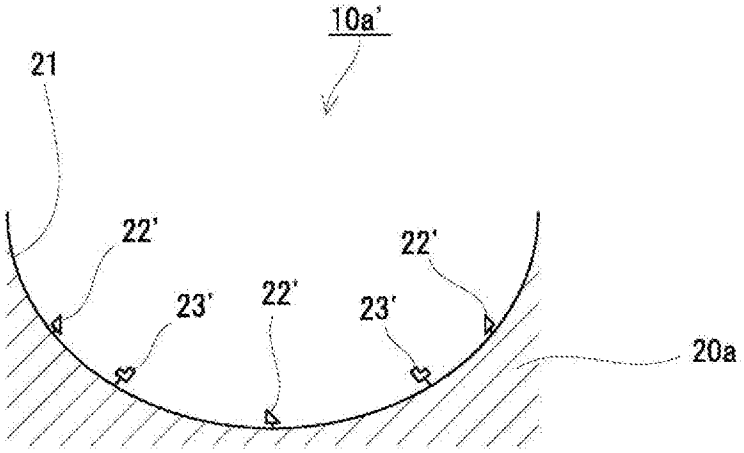
[図1B-1]



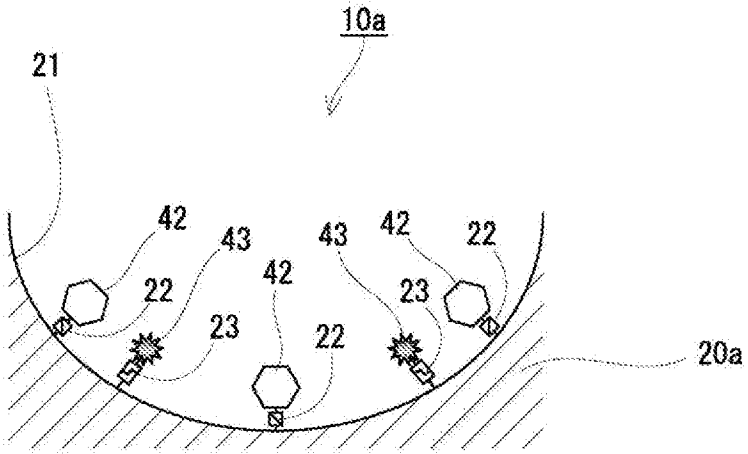
[図1B-2]



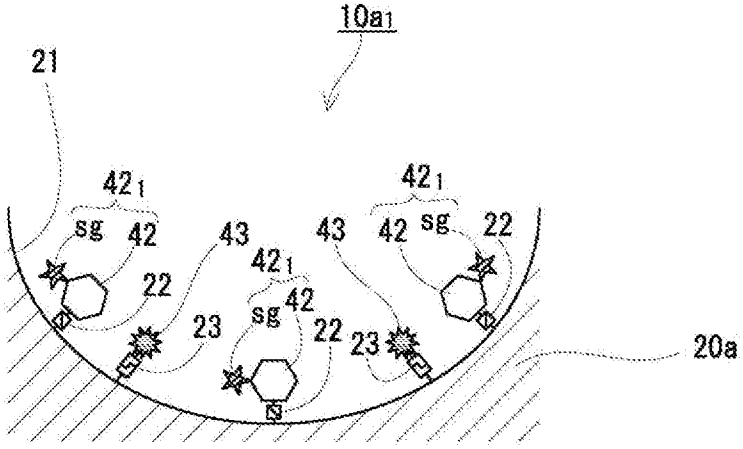
[図2A]



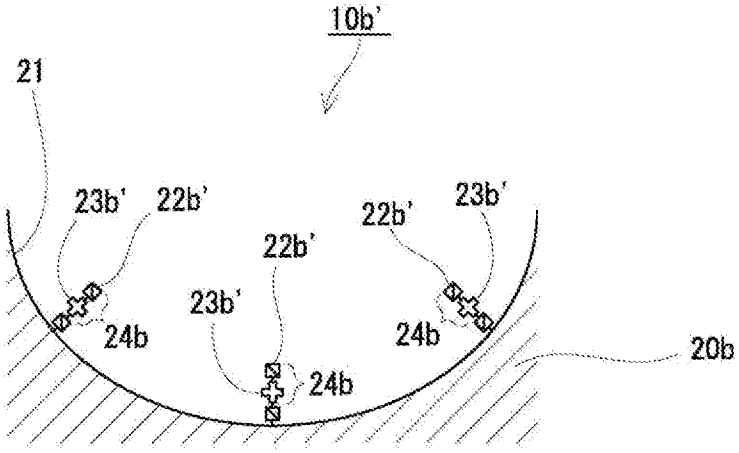
[図2B-1]



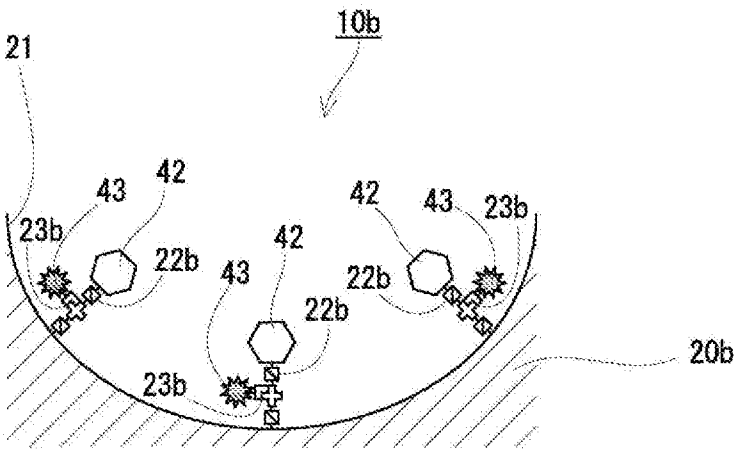
[図2B-2]



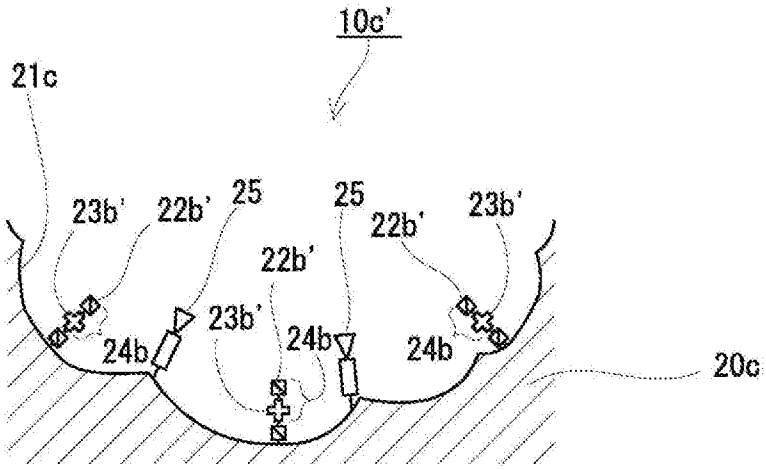
[図3A]


10b'
21
23b'
22b'
22b'
22b'
23b'
23b'
24b
24b
24b
20b

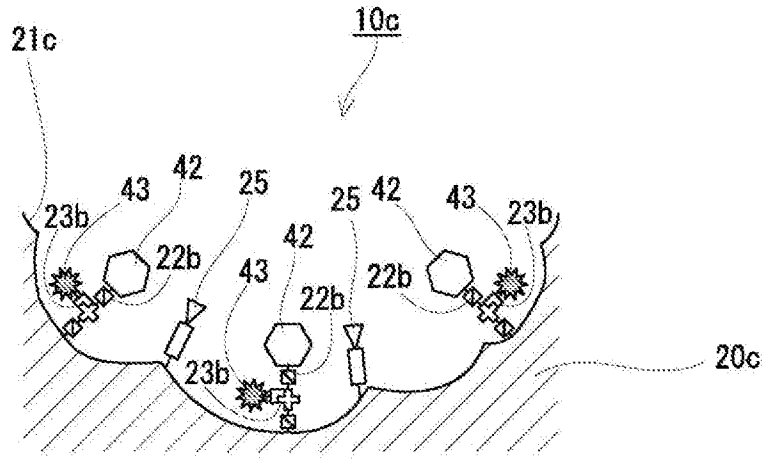
[図3B]


10b
21
43
42
23b
22b
42
43
23b
22b
42
43
22b
23b
20b

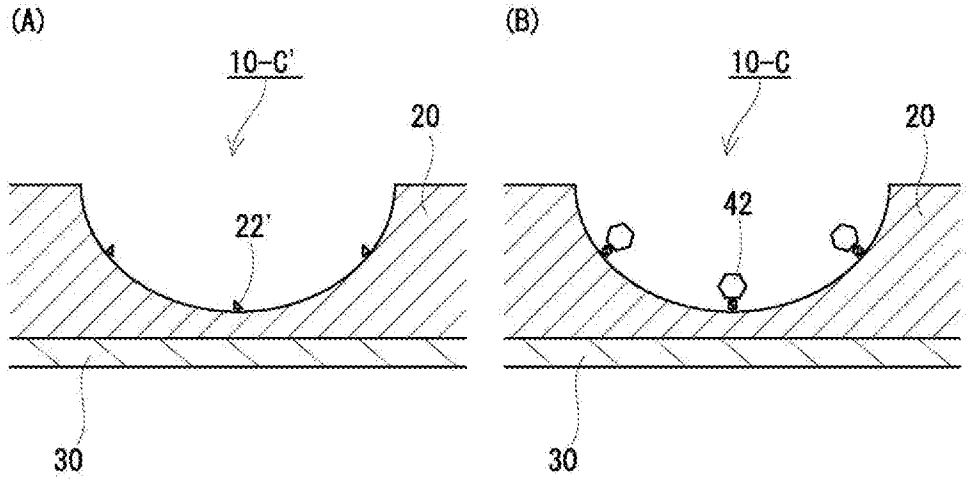
[図4A]


10c'
21c
23b'
22b'
25
25
22b'
22b'
23b'
23b'
24b
24b
24b
20c

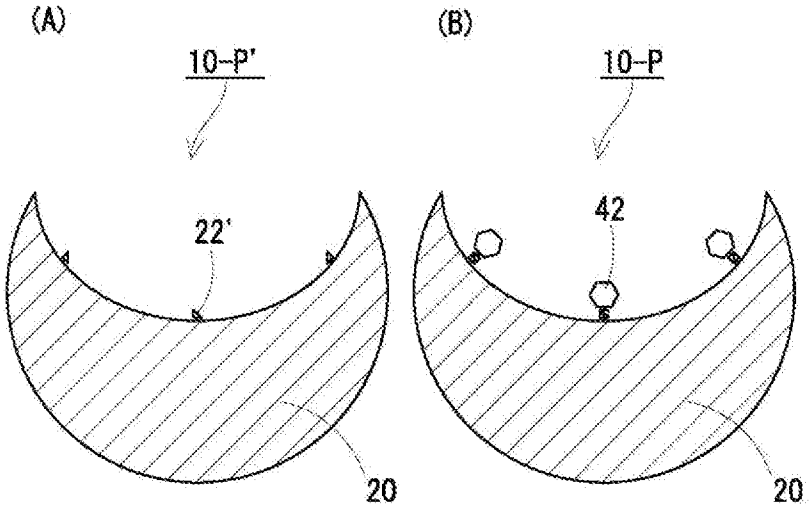
[図4B]


21c
10c
23b
43
42
25
22b
20c

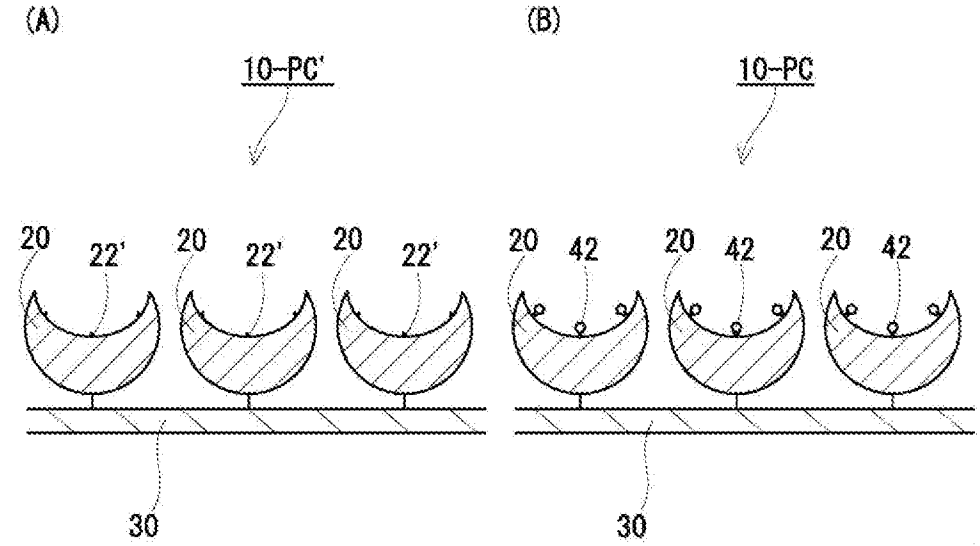
[図5]


(A)
(B)
10-C'
10-C
20
22'
42
30

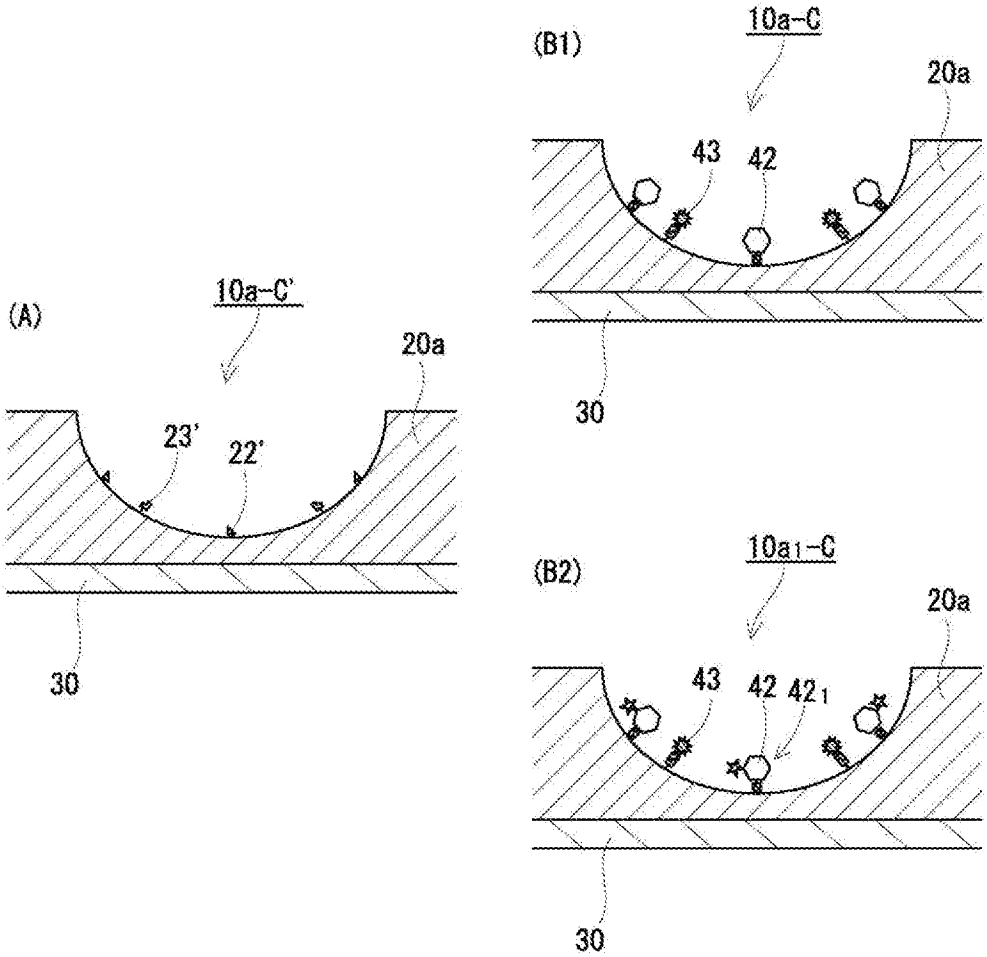
[図6]


(A)
(B)
10-P'
10-P
22'
42
20

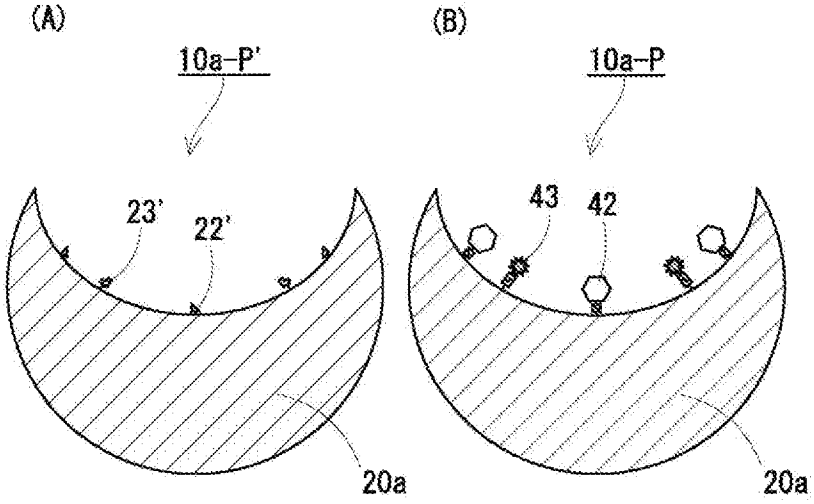
[図7]


(A)
10-PC'
20
22'
20
22'
20
22'
30
(B)
10-PC
20
42
20
42
20
42
30

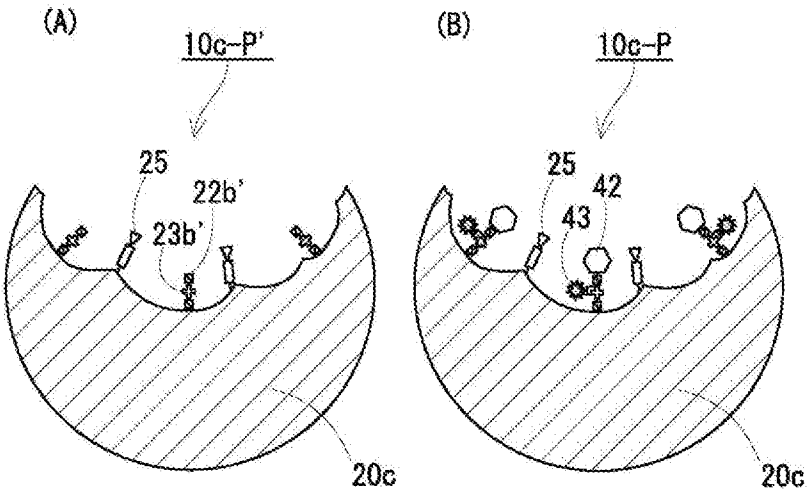
[図8]


(A)
10a-C'
20a
23'
22'
30
(B1)
10a-C
20a
43
42
30
(B2)
10a1-C
20a
43
42
42 1
30

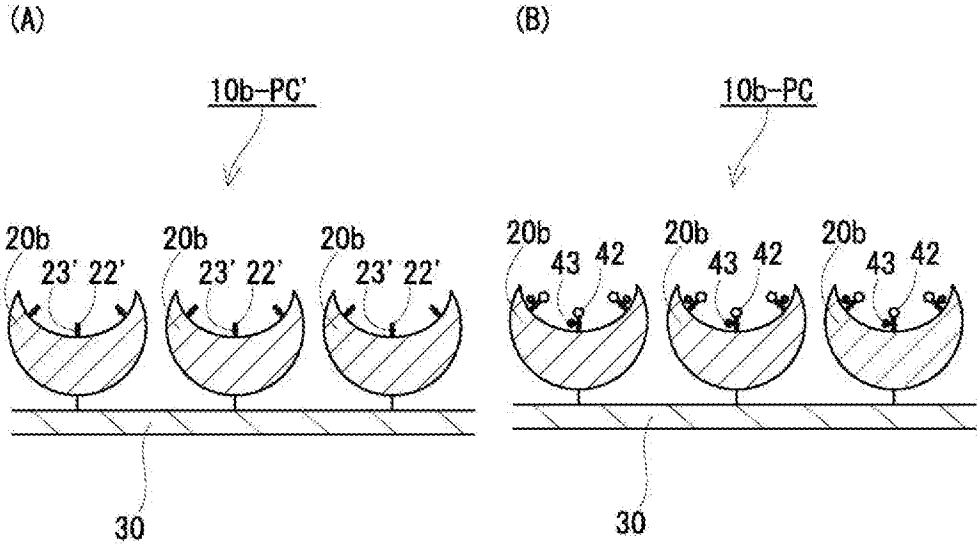
[図9]


(A)
(B)
10a-P'
10a-P
23'
22'
43
42
20a
20a

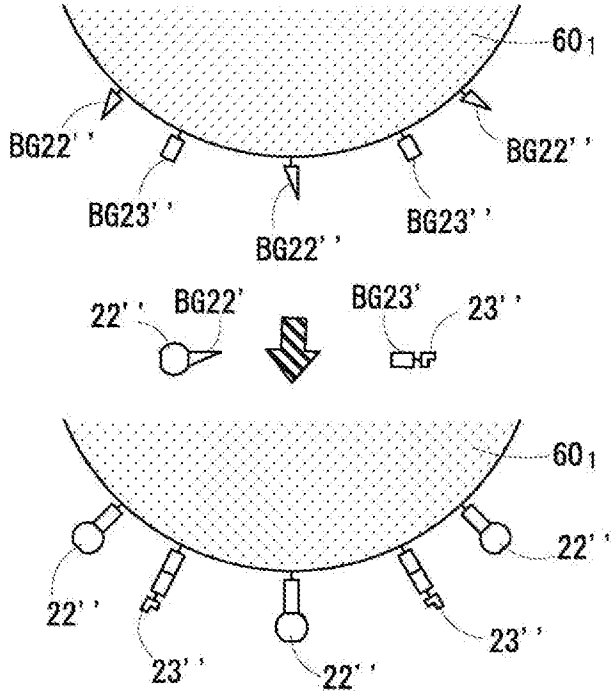
[図10]


(A)
(B)
10c-P'
10c-P
25
22b'
23b'
25
42
43
20c
20c

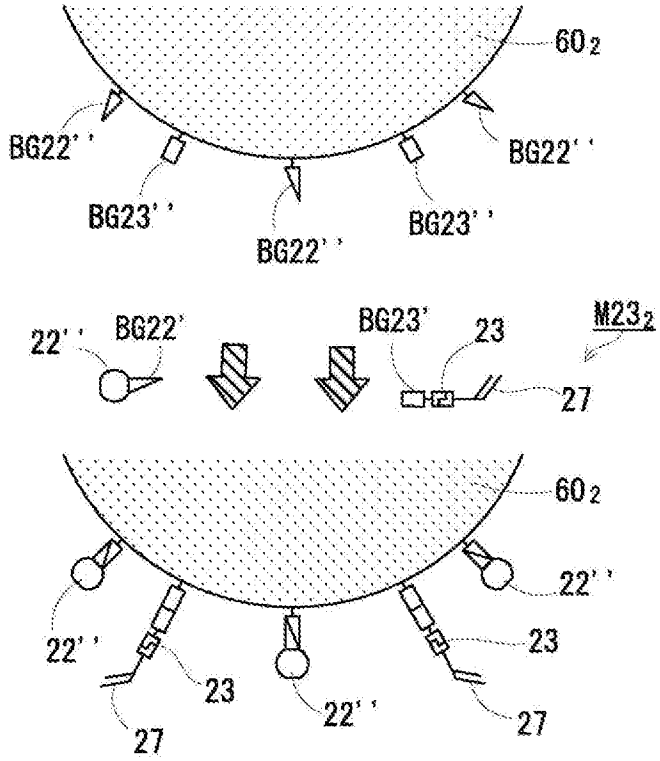
[図11]


(A)
(B)
10b-PC'
10b-PC
20b
23' 22'
20b
23' 22'
20b
23' 22'
20b
43 42
20b
43 42
20b
43 42
30
30

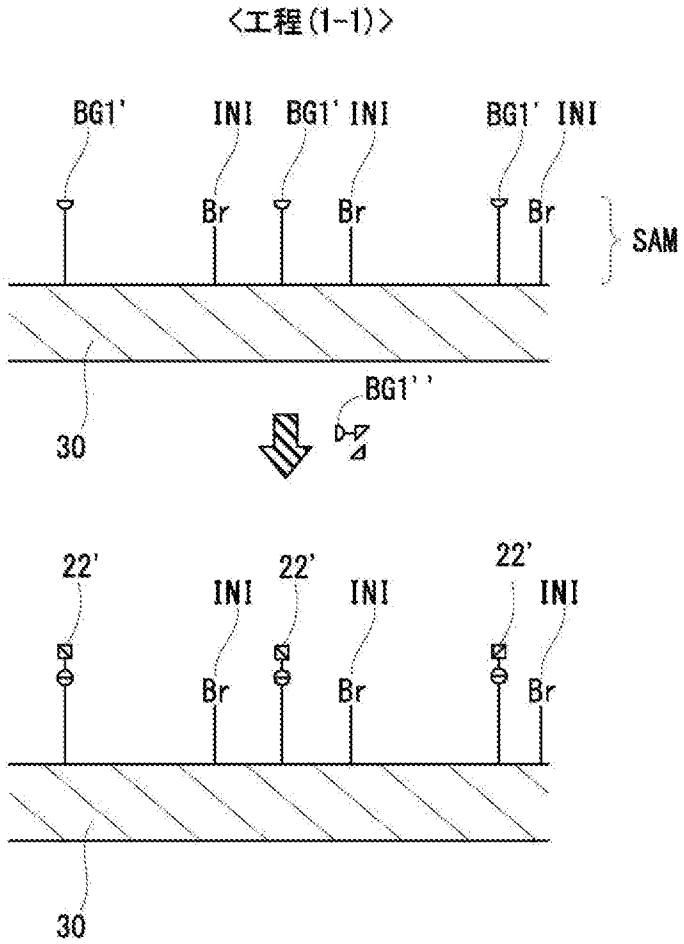
[図12-1a]


60 1
BG22''
BG22''
BG23''
BG23''
BG22''
22''
BG22'
BG23'
23''
60 1
22''
22''
23''
23''
22''

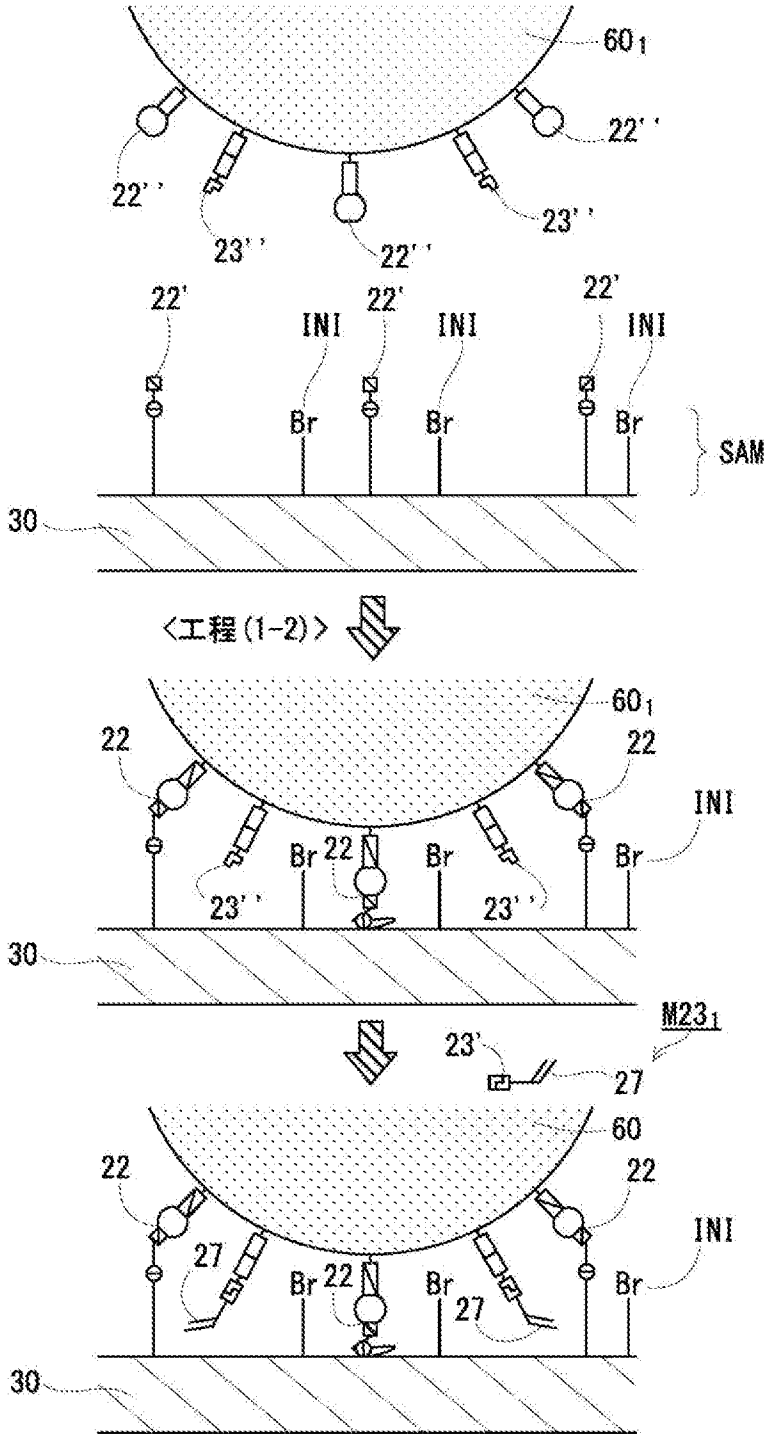
[図12-1b]


60 2
BG22''
BG22''
BG23''
BG23''
BG22''
22''
BG22'
BG23'
23
M23 2
27
60 2
22''
22''
23
23
27
22''
27

[図12-2]

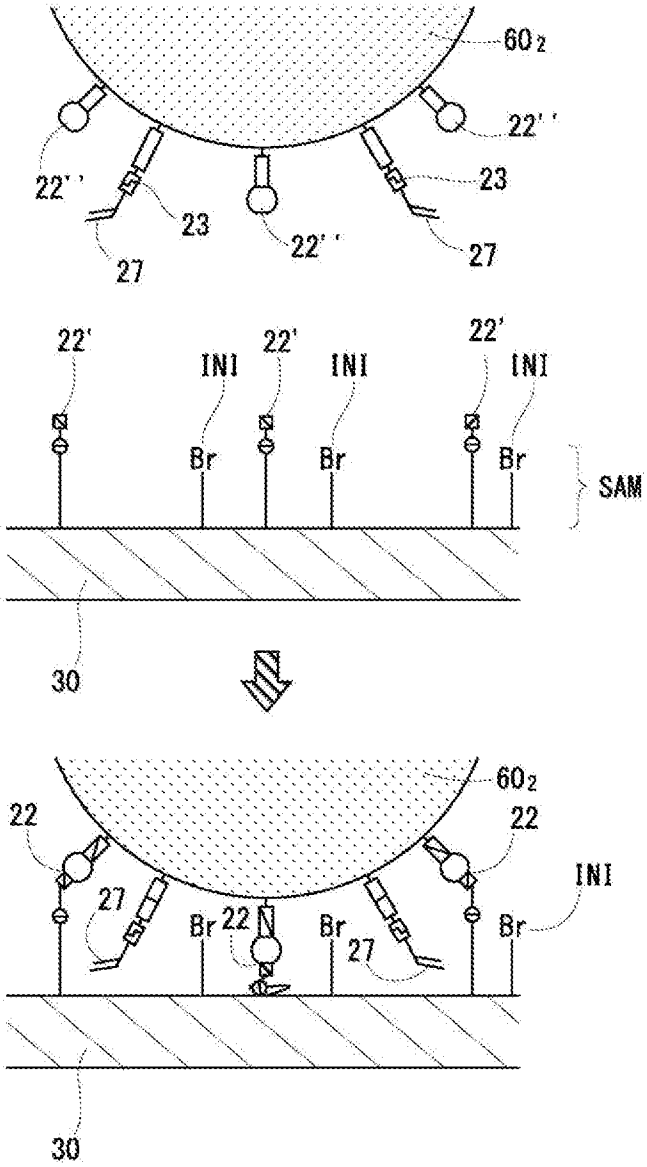

<工程(1-1)>
BG1'
INI
BG1'
INI
BG1'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
BG1''
22'
22'
22'
INI
INI
INI
Br
Br
Br
30

[図12-3a]


60$_1$
22''
22''
23''
23''
22''
22'
INI
22'
INI
22'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
<工程(1-2)>
60$_1$
22
22
INI
Br
22
Br
Br
23''
23''
30
M23$_1$
23'
27
60
22
22
INI
27
Br
22
Br
27
Br
30

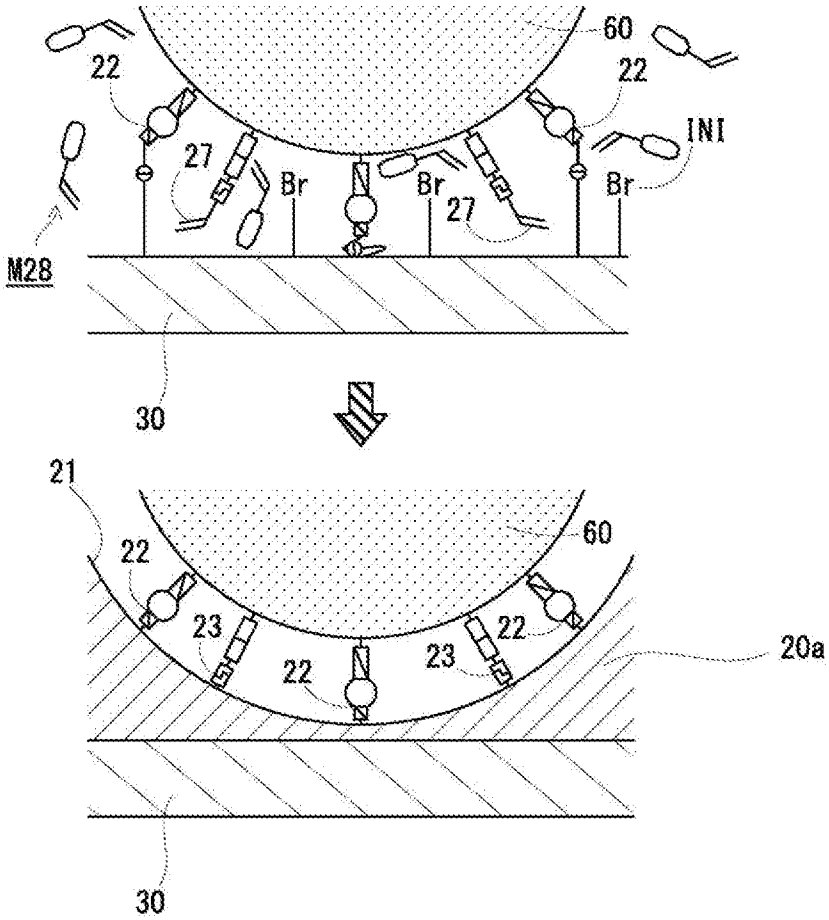
[図12-3b]

<工程(1-2)>


60₂
22''
22''
23
23
27
22''
27
22'
INI
22'
INI
22'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
60₂
22
22
INI
27
Br
22
Br
27
Br
30

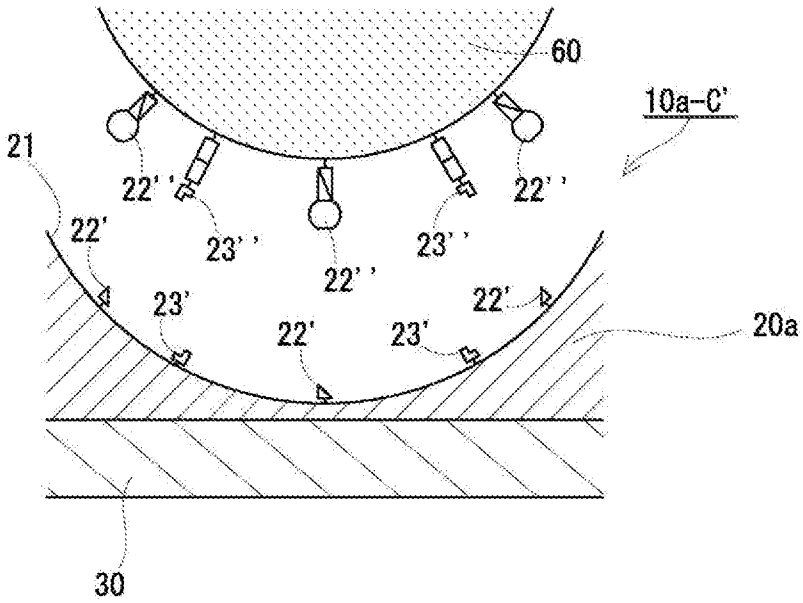
[図12-4]

<工程(1-3)>

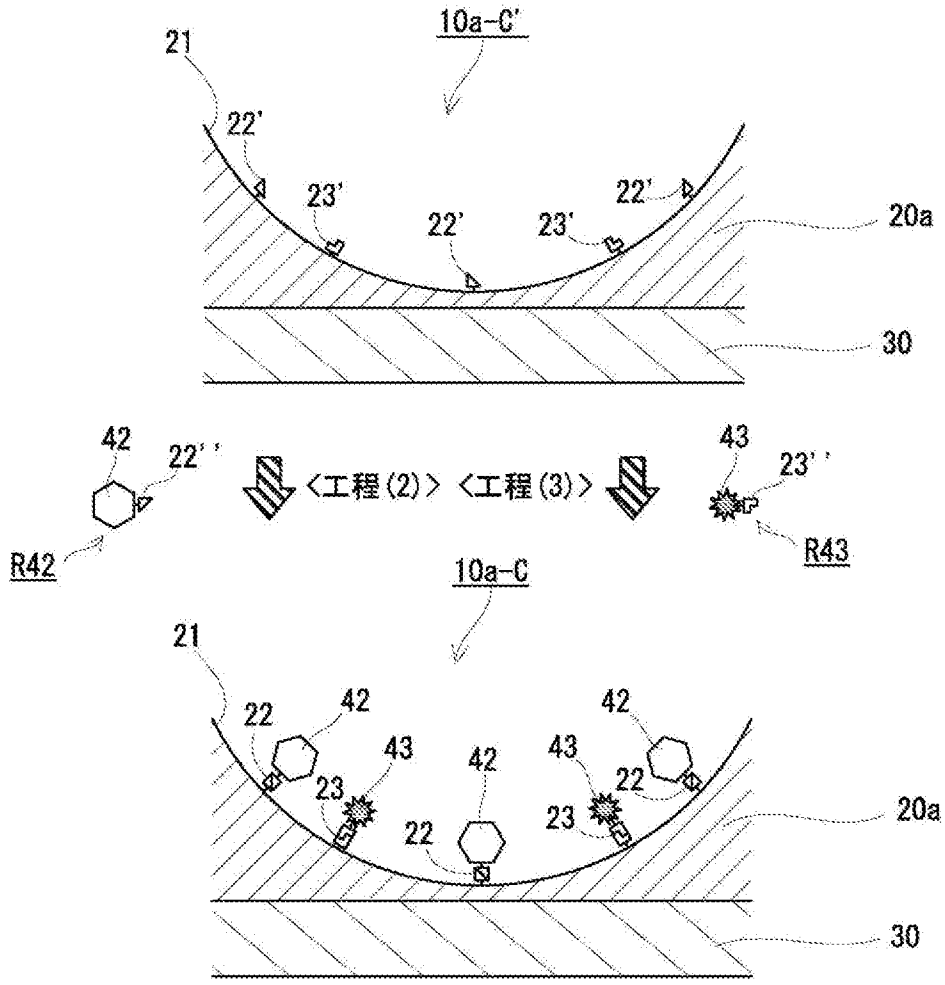


[図12-5]

<工程(1-4)>

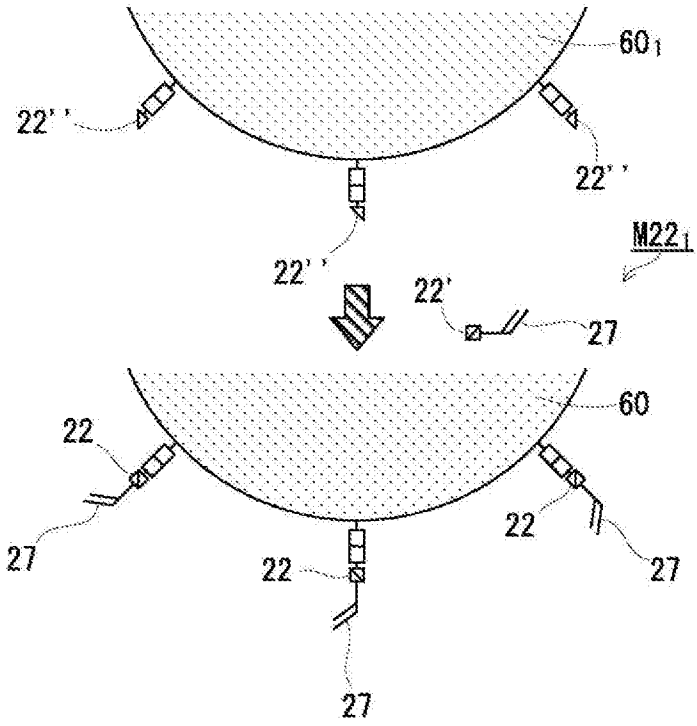


[図12-6]

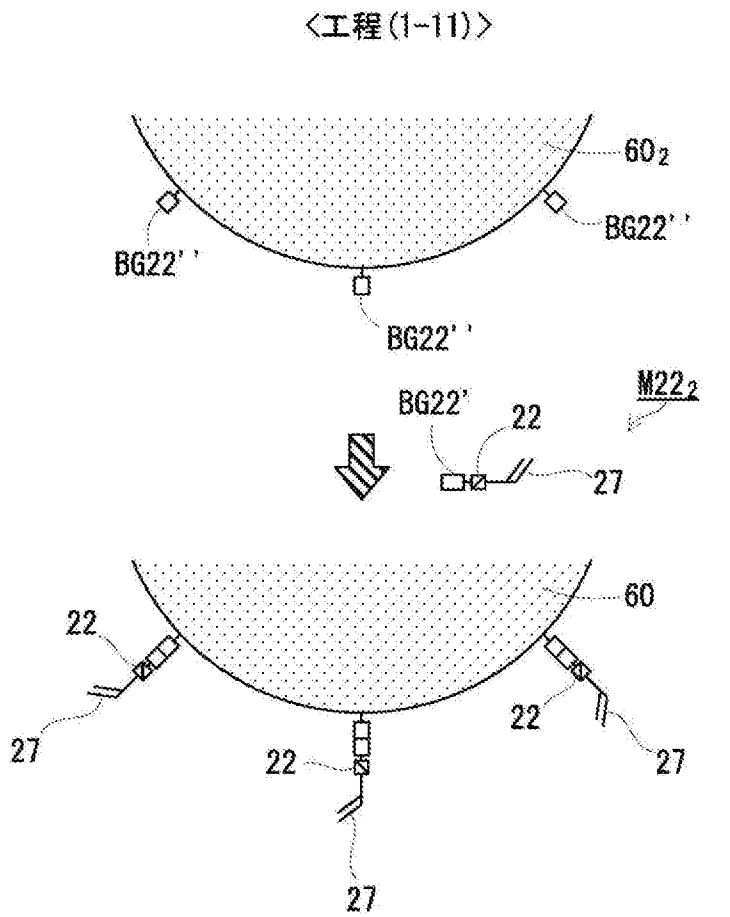


[図13-1a]

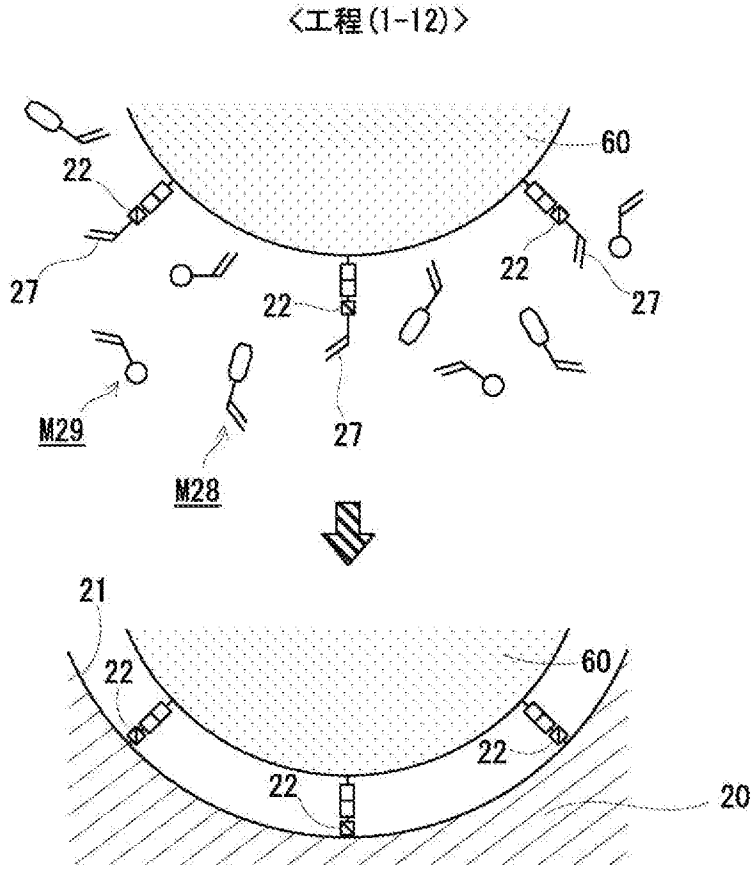
<工程(1-11)>



[図13-1b]

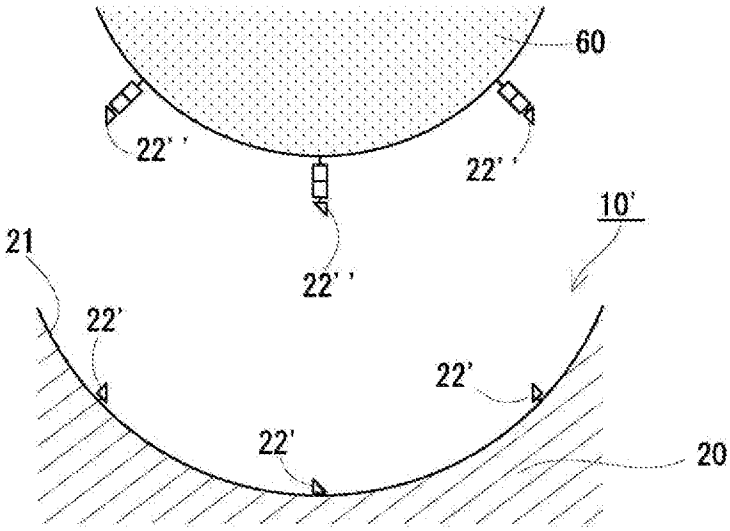

〈工程(1-11)〉
60_2
BG22''
BG22''
BG22''
BG22'
22
$M22_2$
27
60
22
27
22
22
27
27

[図13-2]

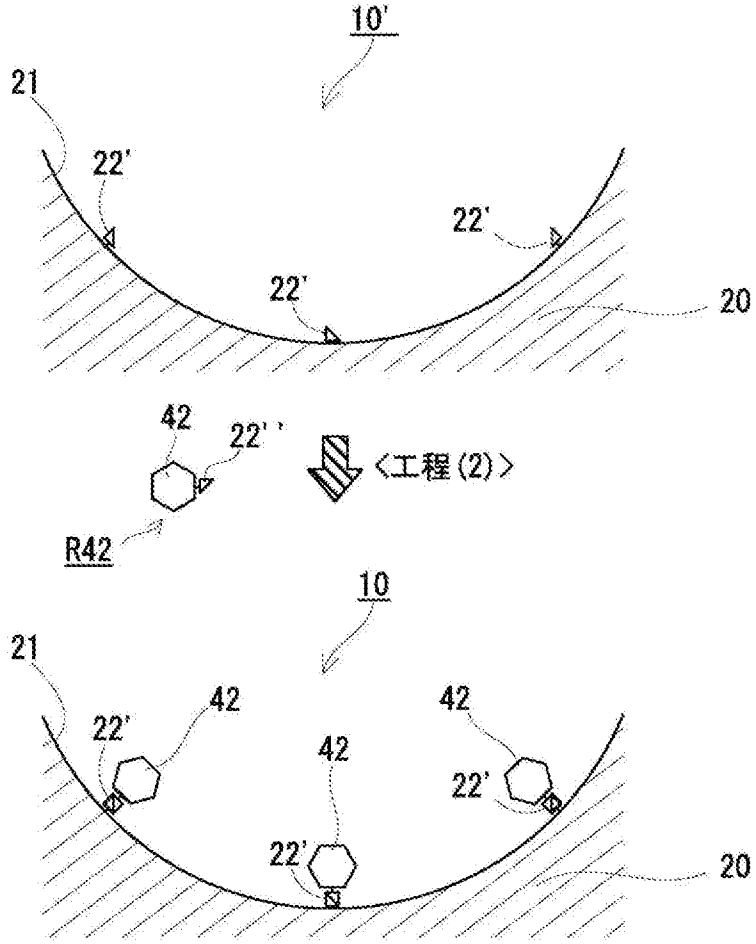

〈工程(1-12)〉
60
22
27
22
22
27
M29
M28
27
21
22
60
22
22
20

[図13-3]

<工程(1-13)>

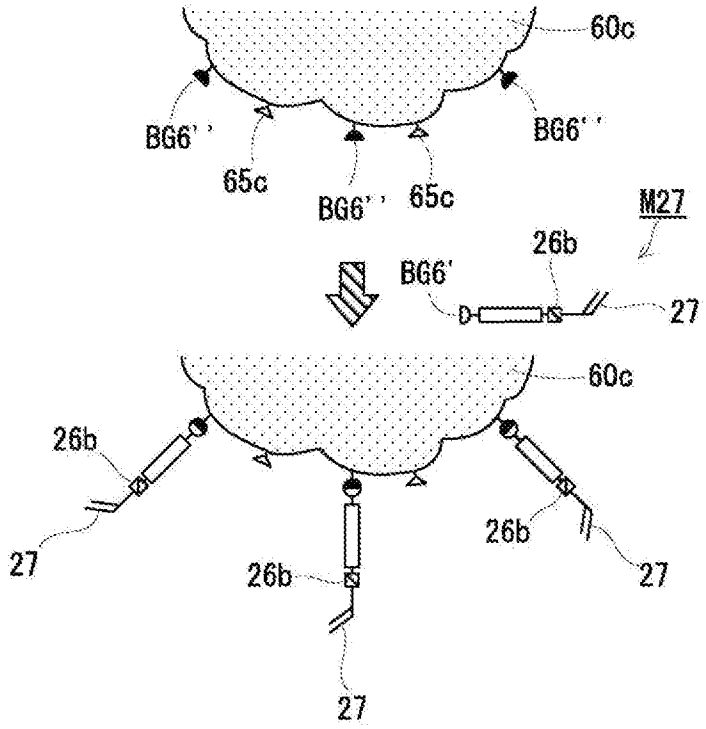


[図13-4]



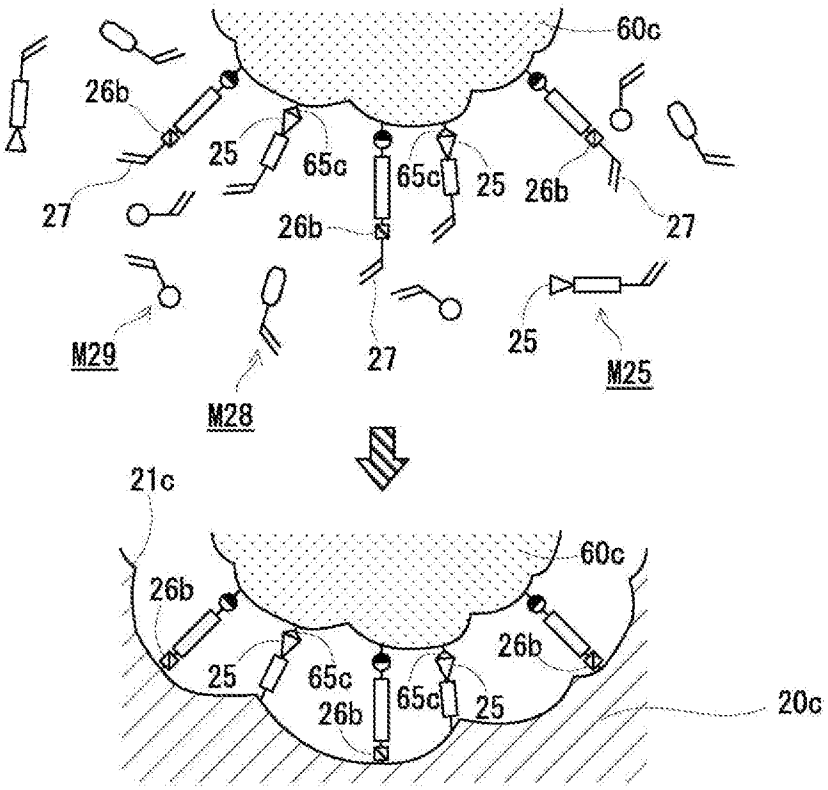
[図14-1]

<工程(1-21)>



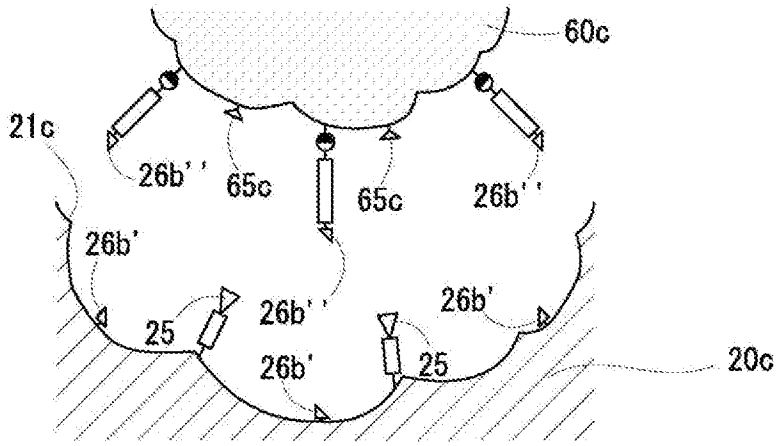
[図14-2]

<工程(1-22)>



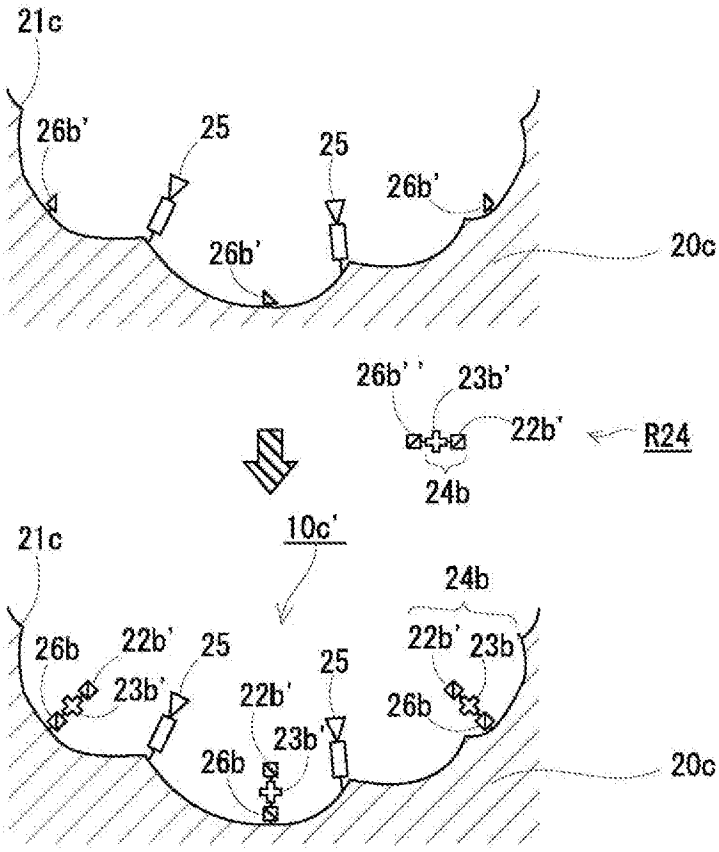
[図14-3]

<工程(1-23)>

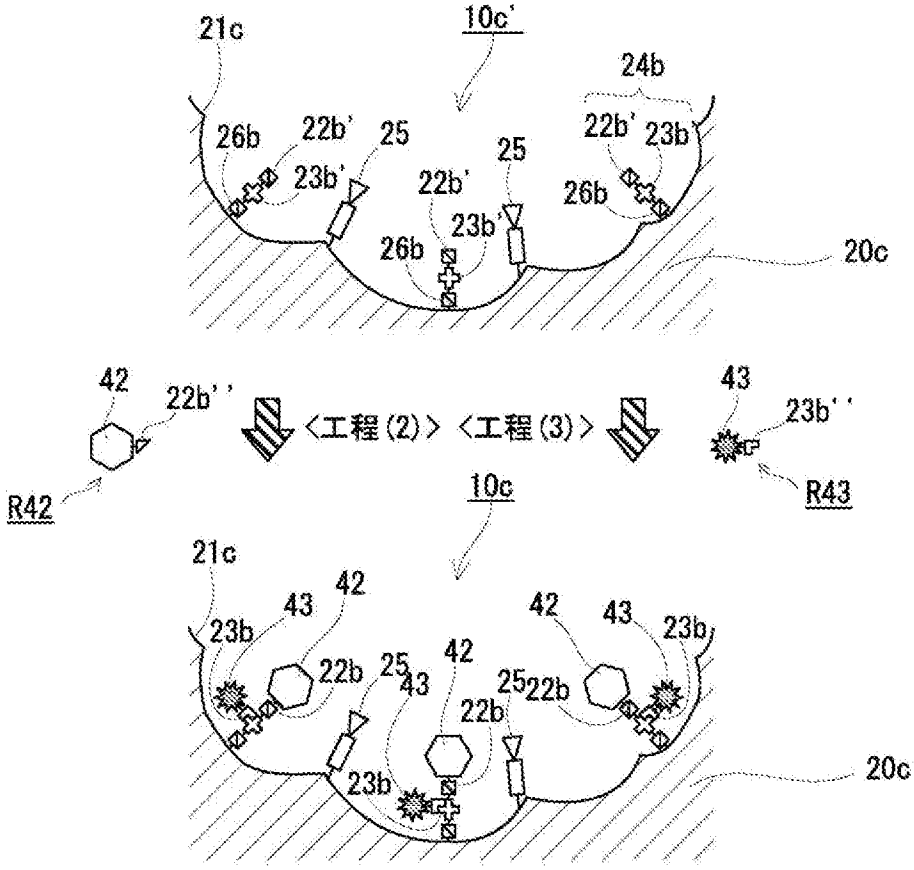


[図14-4]

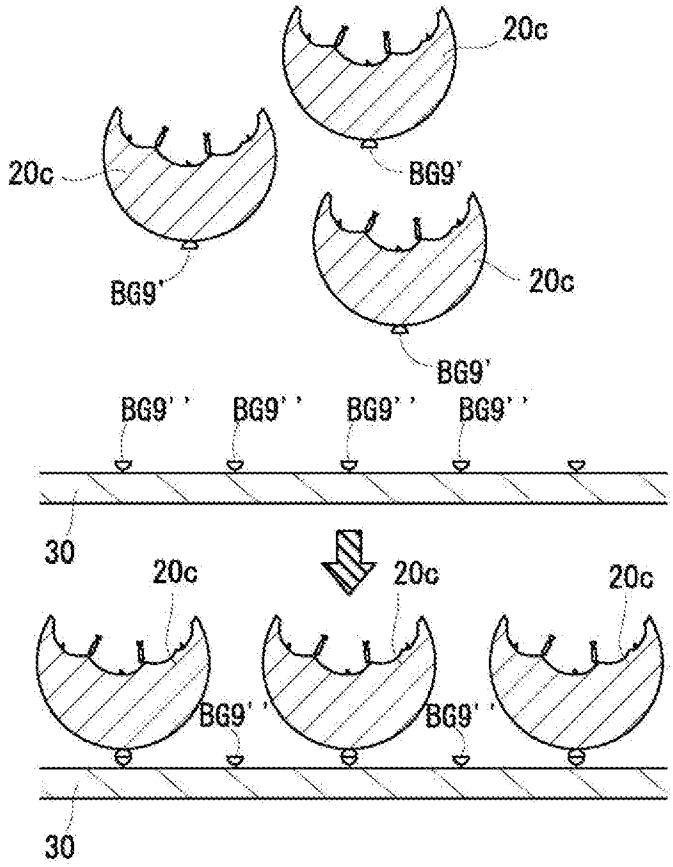
<工程(1-24)>



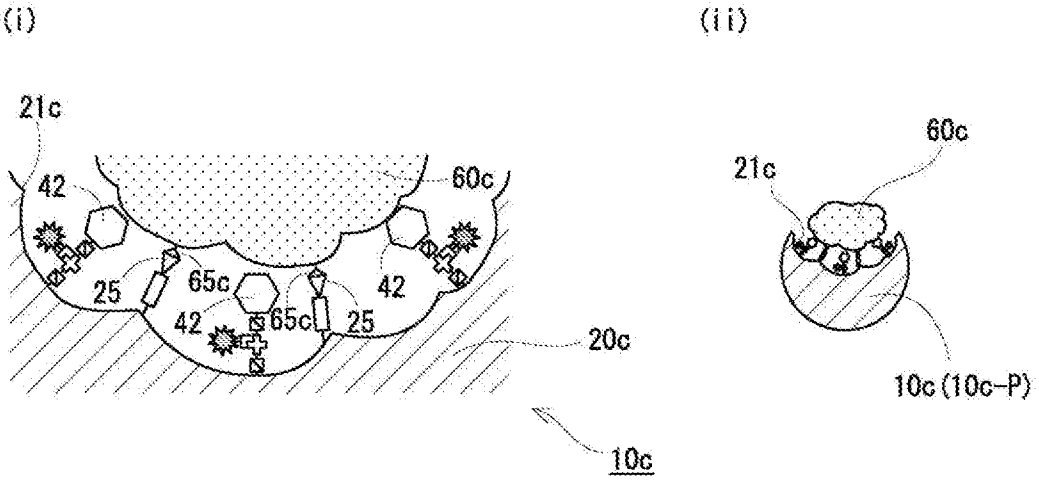
[図14-5]


21c
10c'
24b
26b
22b'
25
23b'
22b'
25
22b'
23b'
26b
23b'
26b
20c
42
22b''
<工程(2)>
<工程(3)>
43
23b''
R42
R43
10c
21c
43
42
23b
22b
25
43
42
22b
25
42
43
23b
22b
23b
20c

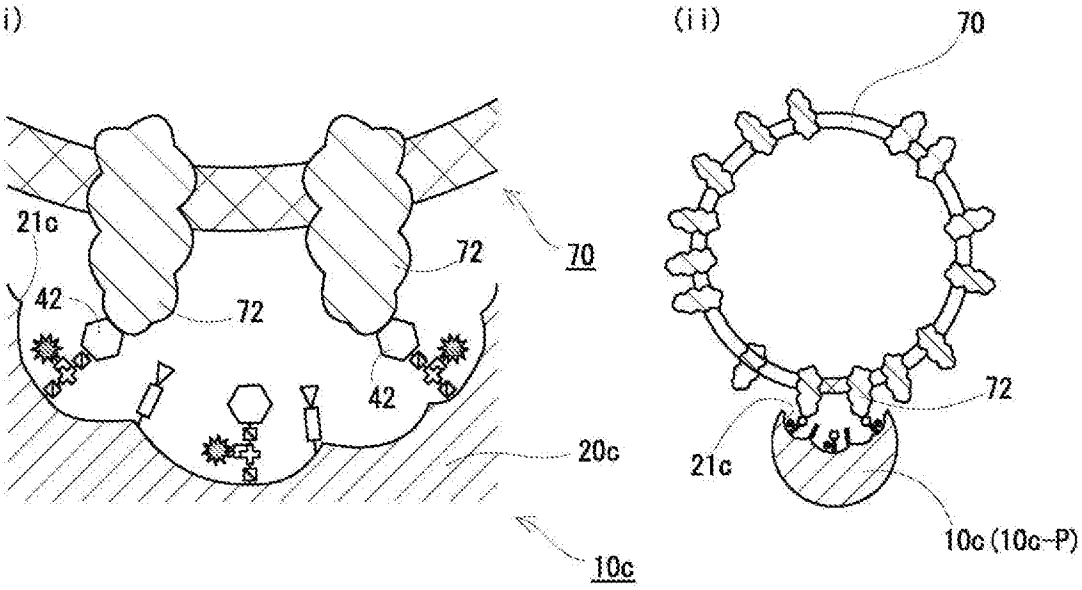
[図15]


20c
20c
BG9'
BG9'
20c
BG9'
BG9''
BG9''
BG9''
BG9''
30
20c
20c
20c
BG9''
BG9''
30

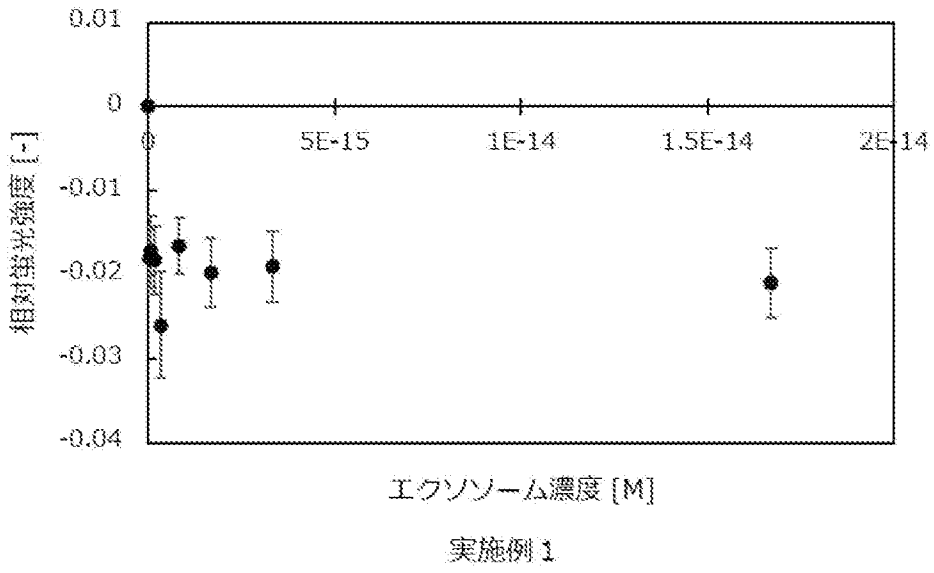
[図16-1]



[図16-2]

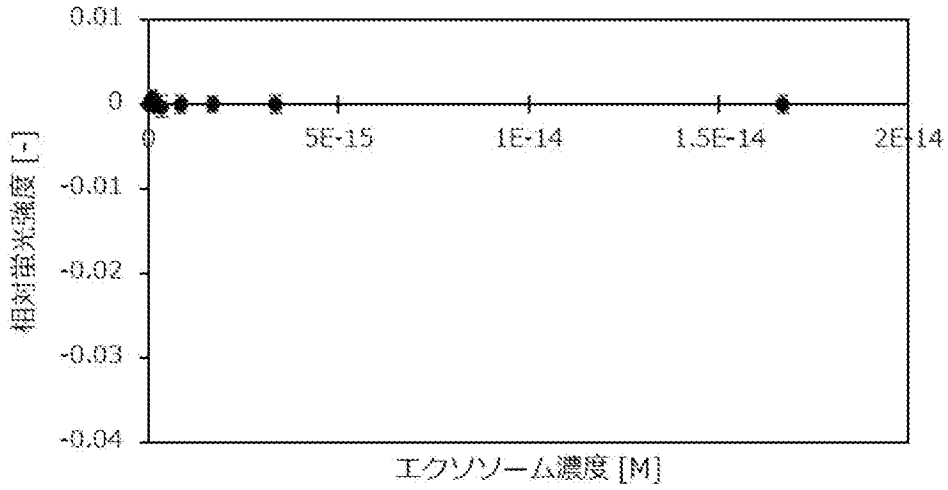


[図17A]



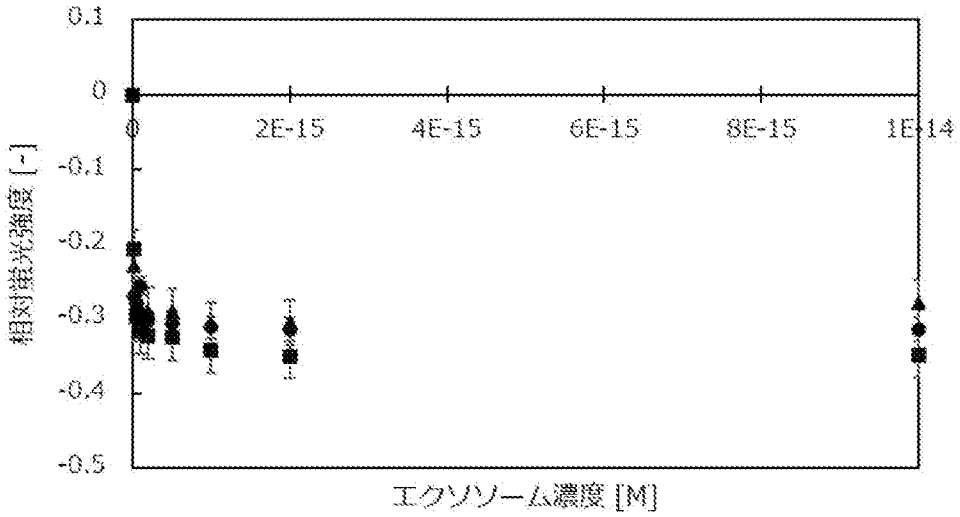
実施例1

[図17B]



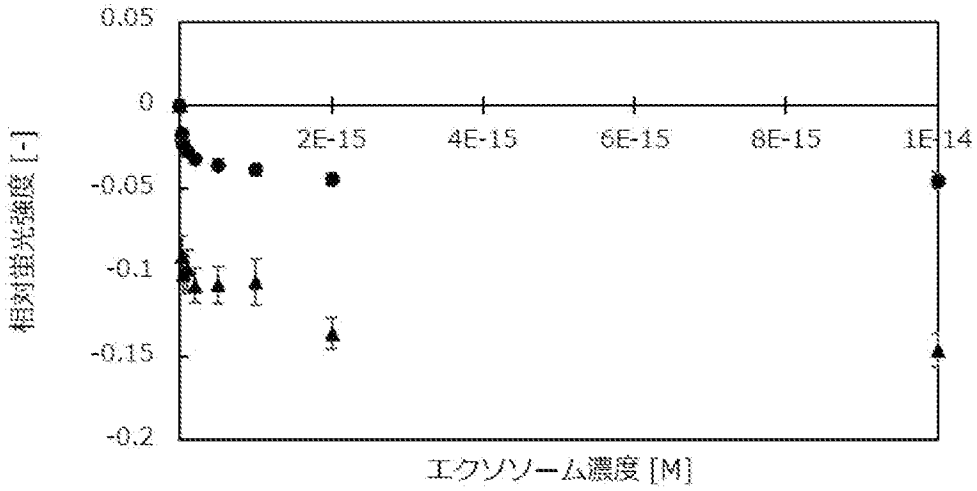
比較例 1

[図18]



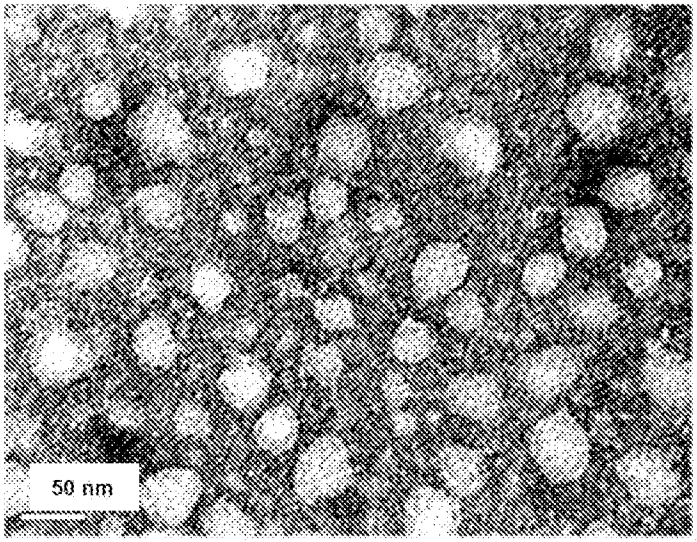
実施例 2

[図19]

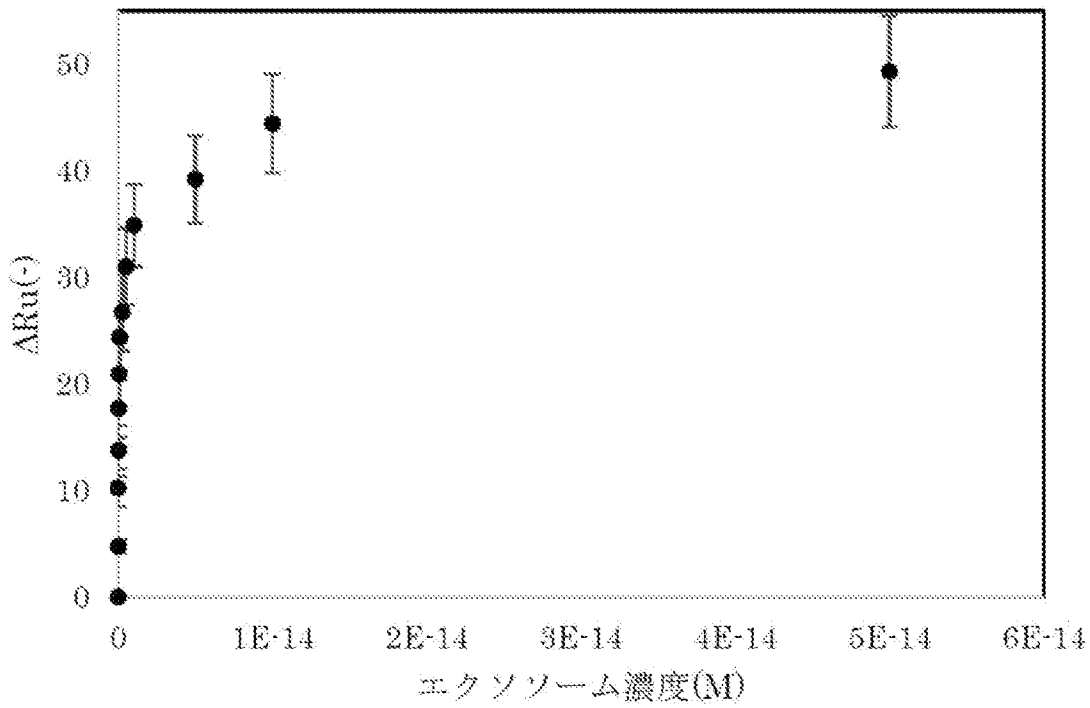

0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
2E-15
4E-15
6E-15
8E-15
1E-14
相対蛍光強度 [-]
エクソソーム濃度 [M]

実施例３

[図20]

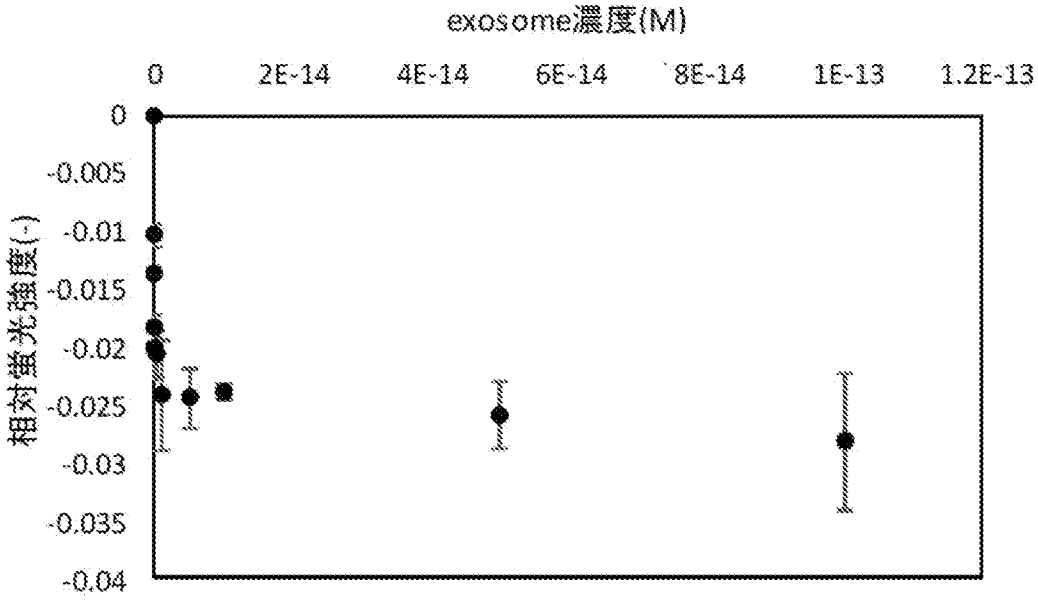

50 nm

[図21]



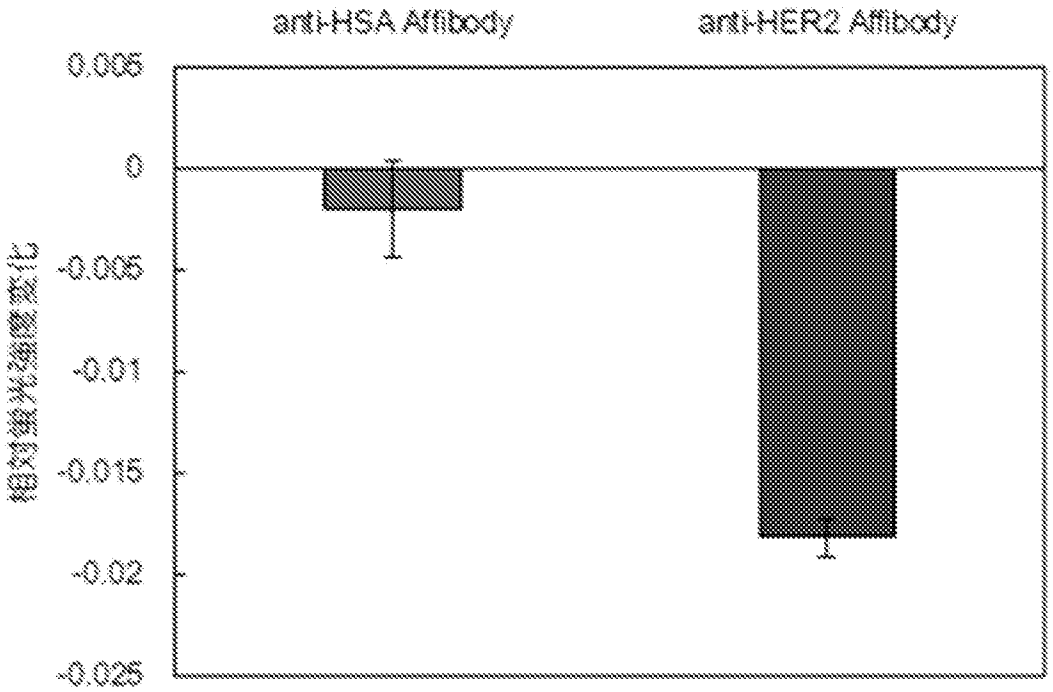
実施例4

[図22]

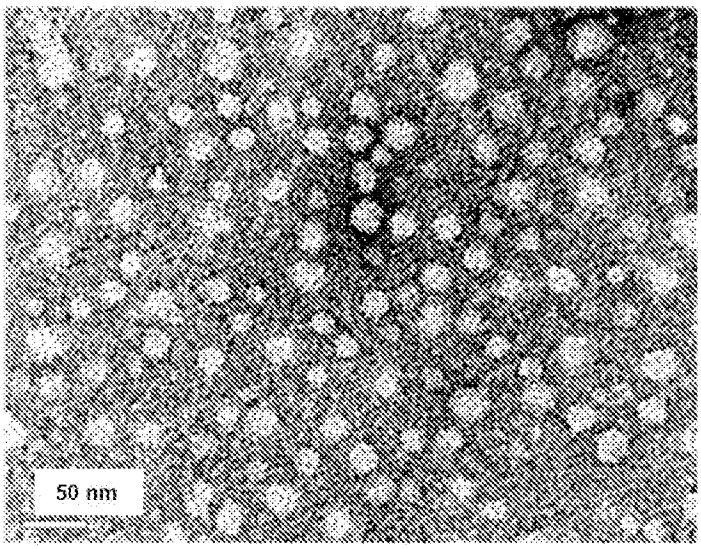


実施例5

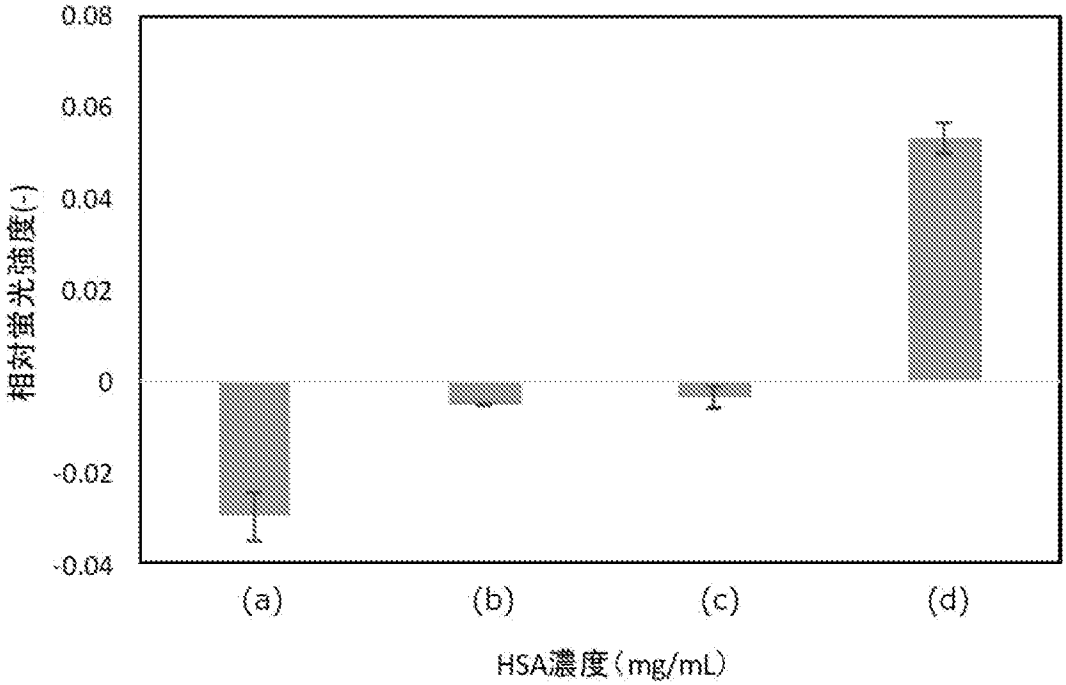
[図23]


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

[図24]


50 nm

[図25]



実施例6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/031621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i; ***G01N 33/531***(2006.01)i; ***G01N 33/543***(2006.01)i; ***G01N 33/545***(2006.01)i
FI: G01N33/531 B; G01N33/543 501M; G01N33/545 Z; G01N33/53 S

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; G01N33/531; G01N33/543; G01N33/545

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	WO 2018/221271 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. KOBE UNIVERSITY) 06 December 2018 (2018-12-06) see entire text, all drawings, particularly, claims, paragraphs [0015]-[0042], [0043]-[0085], [0120]-[0131], fig. 1-2, 5-7, 9-12, etc.	1-34
Y		14
X	JP 2006-138656 A (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 01 June 2006 (2006-06-01) see entire text, all drawings, particularly, claims, paragraphs [0010]-[0038], etc.	1-2, 7-13, 15
Y		14, 16-17
Y	CN 104941602 A (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST.) 30 September 2015 (2015-09-30) see entire text, particularly, paragraphs [0021]-[0033], etc.	16-17
Y	CN 104744702 A (UNIV. HUAZHONG AGRICULTURAL) 01 July 2015 (2015-07-01) see entire text, particularly, claims, etc.	16-17
A	WO 2012/124800 A1 (SHIBAURA INST. OF TECHNOLOGY) 20 September 2012 (2012-09-20) see entire text, all drawings, etc.	1-34

☐ 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
02 November 2021	**16 November 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/031621

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018/221271 A1	06 December 2018	US 2020/0110084 A1 see entire text, all drawings, particularly, claims, paragraphs [0069]-[0098], [0099]-[0157] , [0199]-[0210], fig. 1-2, 5-7, 9-12, etc. EP 3647786 A1	
JP 2006-138656 A	01 June 2006	(Family: none)	
CN 104941602 A	30 September 2015	(Family: none)	
CN 104744702 A	01 July 2015	(Family: none)	
WO 2012/124800 A1	20 September 2012	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/031621

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 33/531(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/545(2006.01)i
FI: G01N33/531 B; G01N33/543 501M; G01N33/545 Z; G01N33/53 S

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; G01N33/531; G01N33/543; G01N33/545

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	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、請求の範囲、段落［００１５］－［００４２］、［００４３］－［００８５］、［０１２０］－［０１３１］、［図１］－［図２］、［図５］－［図７］、［図９］－［図１２］等参照	1-34
Y		14
X	JP 2006-138656 A (協和メデックス株式会社) 01.06.2006 (2006-06-01) 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］、段落［００１０］－［００３８］等参照	1-2,7-13,15
Y		14,16-17
Y	CN 104941602 A (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST) 30.09.2015 (2015-09-30) 全文、特に、段落［００２１］－［００３３］等参照	16-17
Y	CN 104744702 A (UNIV HUAZHONG AGRICULTURAL) 01.07.2015 (2015-07-01) 全文、特に、特許請求の範囲等参照	16-17
A	WO 2012/124800 A1 (学校法人 芝浦工業大学) 20.09.2012 (2012-09-20) 全文・全図等参照	1-34

☐ 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
02.11.2021	16.11.2021

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

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/JP2021/031621

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/221271 A1	06.12.2018	US 2020/0110084 A1 全文・全図，特に、請求の範囲，段落［００６９］－［００９８］，［００９９］－［０１５７］，［０１９９］－［０２１０］，ＦＩＧ．１－２，５－７，９－１２等参照 EP 3647786 A1	
JP 2006-138656 A	01.06.2006	（ファミリーなし）	
CN 104941602 A	30.09.2015	（ファミリーなし）	
CN 104744702 A	01.07.2015	（ファミリーなし）	
WO 2012/124800 A1	20.09.2012	（ファミリーなし）	