

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-525795

(P2020-525795A)

(43) 公表日 令和2年8月27日(2020.8.27)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	525C	2G058
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574	A	2G060
GO1N 27/26 (2006.01)	GO1N 27/26	Z NAP	
GO1N 27/28 (2006.01)	GO1N 27/28	3 O1Z	
GO1N 35/10 (2006.01)	GO1N 35/10	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-572624 (P2019-572624)	(71) 出願人	518434681 テヒニッシェ、ユニベルズィテート、ダルムシュタット TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT ドイツ連邦共和国ダルムシュタット、カロリーネンプラッツ、5
(86) (22) 出願日	平成30年6月12日 (2018.6.12)	(74) 代理人	100091982 弁理士 永井 浩之
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月27日 (2020.2.27)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行季
(86) 國際出願番号	PCT/EP2018/065542	(74) 代理人	100105153 弁理士 朝倉 悟
(87) 國際公開番号	W02019/001952	(74) 代理人	100120617 弁理士 浅野 真理
(87) 國際公開日	平成31年1月3日 (2019.1.3)		
(31) 優先権主張番号	102017114349.1		
(32) 優先日	平成29年6月28日 (2017.6.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】検出システムおよびその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、媒体(50)中の生体分子(114)の検出システムを製造する方法に関する。本方法は、第1のチャネル領域(215)を備えた第1の検出器部(210)および第2のチャネル領域(225)を備えた第2の検出器部(220)を提供すること(S110)と、少なくとも1つの細孔(110)を有する膜(120)を提供すること(S120)と、第1のチャネル領域(215)および第2のチャネル領域(225)の少なくとも一部が膜(120)によって分離され、第1のチャネル領域(215)および第2のチャネル領域(225)は、媒体(50)が膜(120)の少なくとも1つの細孔(110)を通る流路(130)を形成するために、互いに接続されて、チャネルシステムを形成するように、第1の検出器部(210)および第2の検出器部(220)を膜(120)の両側に配置すること(S130)と、を含む。膜を通る流路(130)に沿ってバイオレセプター(112)が膜(120)に結合および/または連結し、流路(130)に沿った流れを測定することによって媒体(50)中の生体分子(114)の濃

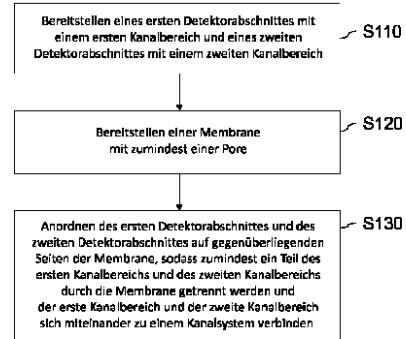


Fig. 1

S110 Providing a first detector section having a first channel region and a second detector section having a second channel region

S120 Providing a membrane having at least one pore

S130 Arranging the first detector section and the second detector section on opposite sides of the membrane, such that at least part of the first channel region and of the second channel region are separated by the membrane, and the first channel region and the second channel region are connected to each other to form a channel system

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

媒体(50)中の生体分子(114)の検出システムを製造する方法であって、
第1のチャネル領域(215)を備えた第1の検出器部(210)および第2のチャネル領域(225)を備えた第2の検出器部(220)を提供するステップ(S110)と
、
少なくとも1つの細孔(110)を備えた膜(120)を提供するステップ(S120)と、

前記第1のチャネル領域(215)および前記第2のチャネル領域(225)の少なくとも一部が前記膜(120)によって分離され、前記第1のチャネル領域(215)および前記第2のチャネル領域(225)は、前記媒体(50)が前記膜(120)の前記少なくとも1つの細孔(110)を通る流路(130)を形成するために、互いに接続されて、チャネルシステムを形成するように、前記第1の検出器部(210)および前記第2の検出器部(220)を前記膜(120)の両側に配置するステップ(S130)と、を含み、

前記膜を通る前記流路(130)に沿って、バイオレセプター(112)を前記膜(120)上に形成して、前記流路(130)に沿った流れを測定することによって前記媒体(50)中の前記生体分子(114)の濃度を決定する、方法。

【請求項 2】

前記配置ステップ(S130)が、

前記第1の検出器部(210)または前記第2の検出器部(220)上に前記膜(120)を配置することと、次いで

検出器領域(125)の外側の前記膜(120)の一部を除去することと、を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記膜(120)と接触する粘着層(680)を形成することを更に含み、前記粘着層(680)は、前記細孔(110)の少なくとも数個を前記粘着層(680)によって閉じられるような様式で前記膜(120)と接触させ、それにより前記媒体(50)の流量測定のための前記細孔(110)の数を減らすことによって前記膜(120)の感度を上げる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

機能化によって前記膜(120)に前記バイオレセプター(112)を付着させることを更に含み、前記機能化は、前記膜(120)の両側の前記第1の検出器部(210)および前記第2の検出器部(220)の前記配置の前または後に行われる、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記機能化は、少なくとも以下の機能化ステップ：

- アミン反応性中間体を得るためにカルボキシ末端基を活性化するステップと、
- 前記膜(120)上に所望のバイオレセプター(112)を形成するために前記アミン反応性中間体をアミド化するステップと、を含み、

前記機能化が前記膜(120)のすべての領域で同じ様式で起こるか、あるいは、前記膜(120)が異なった生体分子(114)に感受性となるように、前記機能化中に、異なったバイオレセプター(112)が異なった領域内の前記細孔(110)で形成される、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記第1の検出器部(210)および/または前記第2の検出器部(220)上に前記膜(120)を積層することを更に含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第1の検出器部(210)および前記第2の検出器部(220)が、少なくとも50または少なくとも65の温度での熱処理によって前記膜(120)の両側で互いに

10

20

30

40

50

接続される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記媒体(50)中の前記生体分子(114)の前記濃度が、以下の測定：(i)前記少なくとも 1 つの細孔(110)を通る流量測定、(ii)インピーダンス測定、および(iii)動電測定、特に電気泳動測定または電気浸透測定、のうちの少なくとも 1 つによって決定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記生体分子(114)が、前立腺特異的抗原(PSA)を含み、前記バイオレセプター(112)が、特に以下のアプタマー：

d) NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAACGCUCUAGGC
GC G 10

GC C AG U U G C - OH、

e) NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCT
TT-OH、

f) NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCG
GGC AT GCGTCCGGAGAACGGCAACGAGGGTCAACCAGCA
CGTCCATGAG-OHのうちの 1 つであるアプタマーを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 10】

媒体(50)中の生体分子(114)のための検出システムであって、

前記媒体(50)を導入することができ、かつ、第 1 の電極(315)および第 2 の電極(325)を有する第 1 のチャネル領域(215)および第 2 のチャネル領域(225)と、

少なくとも 1 つの細孔(110)を含み、前記第 1 のチャネル領域(215)を前記第 2 のチャネル領域(225)から分離し、前記第 1 の電極(315)と前記第 2 の電極(325)との間に流動的に配置される、膜(120)と、を含み、

バイオレセプター(112)が前記細孔(110)上またはその中に形成され、特に以下のアプタマー：

(iv) NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAACGCUCUA
GGC GCGGCCAGUUGC-OH, 30

(v) NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAG
CTTT-OH、

(vi) NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGG
TCGG 30

GC AT GCGTCCGGAGAACGGCAACGAGGGTCAAC
CAGCACGTCATGAG-OHのうちの 1 つを含み、

それによって、前記媒体(50)中の PSA 濃度が、前記第 1 の電極(315)と前記第 2 の電極(325)との間の前記媒体(50)の流路(130)に沿った抵抗測定によって測定できる、検出システム。

【請求項 11】

前記膜(120)内の前記少なくとも 1 つの細孔(110)が前記流路(130)に沿ってテープ状または円筒状のプロファイルを有する、請求項 10 に記載の検出システム。

【請求項 12】

異なる生体分子(114)の同時検出を可能にするために、異なる領域の前記膜が異なるレセプター(112)またはアプタマーを含む、請求項 10 または 11 に記載の検出システム。

【請求項 13】

前記第 1 のチャネル領域(215)および / または前記第 2 のチャネル領域(225)は、前記流路(130)に垂直な、最大 1 mm または最大 50 ミクロンもしくはせいぜい

10ミクロンの最大チャネル幅を有する、請求項10～12のいずれか1項に記載の検出システム。

【請求項14】

検出に必要な媒体(50)の量を減らすために、媒体(50)を分析物注入口(530)に、また電解質を電解質注入口(520)に導入できるように、前記第2の電極(325)に前記電解質注入口(520)および前記第1の電極(315)に前記分析物注入口(530)を更に含む、請求項10～13のいずれか1項に記載の検出システム。

【請求項15】

前記電極(315)と前記第2の電極(325)との間の電気抵抗の関数である電気変数を測定することによって、媒体(50)中の生体分子(114)を検出するための、請求項10～14のいずれか1項に記載の検出システムの使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検出システムおよびその製造方法に関し、より具体的には非生物系および生物系における(生体)分子(分析物、リガンドなど)の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

膨大な生物医薬研究の努力にもかかわらず、癌は、依然として高い死亡率を有している。加えて、各々の種の癌は、治療を行う医師に治療上および診断上の課題となる。残念なことに、使用される治療手段の文脈において疾患の経過がどの程度進展するかについての信頼できる予測は、依然として高いエラー率を伴う。このような状況において、初期の診断的手段は非常に重要である。 20

【0003】

例えば前立腺癌(PCa)は、西洋では男性に最も一般的な癌である。ドイツだけでも、毎年、約63,000の新しい例が診断されている。意味のある結果を正確に出す迅速なオンライン診断は、PCa患者の治癒の機会を顕著に増加させ、多くの場合に救命するはずである。前立腺特異的抗原(PSA)の濃度は、PCaの早期検出のために測定することができる。これは、血清中で検出することができるグリコシル化タンパク質である。通常の操作では、高コストに加えて、しばしば擬陽性結果をも生じるPSAの検出は主に抗体型検出方法を用いる。この事実は、PSAの検出のための別の測定方法の検索の出発点である。 30

【0004】

1つのアプローチは、PSAを特異的に認識し、高い親和性で結合することができる、核酸生体高分子、例えばアプタマーに基づく。それらは、血中のPSA濃度を測定し、それによって可能性のある前立腺癌を検出するための、ハンディセンサーシステムで使用することができる。このようなアプタマーがフィルターフィルムのナノスケール細孔/チャネルの内壁に固定されている場合には、PSA検出のための簡単なセンサーが製造できる。

【0005】

この種の検出の例は、刊行物:Ali M, Nasir S, Ensinger W. :「Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical pores」; Chem Commun 2015, 51:3454-3459に見られる。電位差は、測定可能なイオン電流を生成するためにプラスチックフィルムの両側に生じる。血清が検出されるべき生体高分子を含む場合には、これらの分子は、細孔内のアプタマーに結合され、これによって細孔の断面積が狭くなる。このことは、アプタマー複合体の濃度に依って個々の細孔の電気抵抗を増加させる。その結果、生体分子の濃度は、測定されたイオン電流の減少から直接推測することができる。 40

【0006】

10

20

30

40

50

これらのセンサーの製造において、使用されるアプタマーは、多孔性フィルム、特に細孔の領域に適用される。このステップは機能化と言われる。それによって、得られるフィルムは特定の機能（生体分子の検出）に対して予め決定されるからである。これまで使用されてきた製造法では、フィルムは先ず機能化され、次いで縮小され、最終的に所望の検出領域に配置される。このいわゆる「ピックアンドプレース」プロセスは複雑であり、限定された程度でのみ自動化することができる。機能化膜は統合化プロセス（設置）中に損傷を受ける可能性があり、そのため、その機能性を再度失う。そのため、その統合後のエンジニアリングされた膜の機能化は利点を与える。

【0007】

したがって、これらのセンサーの改善された製造プロセスの必要性がある。また、P.S.Aに高度に感受性であり、そのため、結果を顕著に改善する、改善されたアプタマーの必要性もある。

【発明の概要】

【0008】

上記の問題の少なくとも一部は、請求項1に記載の検出システムの製造方法、請求項10に記載の検出システム、および請求項15に記載のその使用によって解決される。従属項は、独立項の目的の更に有利な実施形態を定義する。

【0009】

本発明は、媒体中の生体分子の検出システムの製造方法に関する。本方法は、

- 第1のチャネル領域を備えた第1の検出器部および第2のチャネル領域を備えた第20の検出器部を提供するステップと、

- 少なくとも1つの細孔を備えた膜を提供するステップと、

- 第1のチャネル領域および第2のチャネル領域の少なくとも一部が膜によって分離され、第1のチャネル領域および第2のチャネル領域は、媒体が膜の少なくとも1つの細孔を通る流路を形成するために、互いに接続されて、チャネルシステムを形成するよう²⁰に、第1の検出器部および第2の検出器部を膜の両側に配置するステップと、を含み、膜を通る流路に沿って、バイオレセプターを膜（例えば、細孔領域内に）上に形成して、流路に沿った流れを測定することによって媒体中の生体分子の濃度を決定する。

【0010】

用語「生体分子」は、本発明の範囲内で広く解釈されるべきであり、特にリガンド、分析物などを含む。使用される媒体は任意の体液（特に血液）でよい。本システムはまた、特定の物質を検出するための、水分析、食品産業、医薬産業などのために使用することができる。膜は1つ以上の部分で形成することができるため、用語「膜」は様々な膜も含むべきである。同様に、用語「細孔」は、広く解釈されるべきであり、開口部／チャネルが流れを許容する限り、任意の開口部またはチャネルを指すべきである。特に、細孔は特定のアスペクト比（長さ対直径）に限定されるべきではない。

【0011】

任意に、配置ステップは、第1の検出器部または第2の検出器部上に膜を配置することと、次いで、検出器領域の外側の膜の一部を除去することと、を含む。例えば、膜は、最初に検出器部の1つに領域全体にわたって適用され、次いで、第1のチャネル領域と第2のチャネル領域との間の1つの検出領域のみに配置されるように、構造化（例えばそのような大きさに切断）することができる。

【0012】

任意に、本方法は、膜と接触する粘着層を形成することを更に含む。粘着層は、細孔の少なくとも一部が粘着層によって閉じられるような様式で膜と接触し、それにより媒体の流量測定のための細孔の数を減らすことによって膜の感度を上げることができる。例えば、粘着層は、一部の細孔を選択的に閉じる（封鎖する）ために使用することができる。

【0013】

任意に、本方法は、機能化によって膜にバイオレセプターを付着させることを更に含み、当該機能化は、膜の両側への第1の検出器部および第2の検出器部の配置の前後に行わ

10

20

30

40

50

れる。言うまでもなく、当該付着させることは、レセプターの連結および／または結合も含むべきである。機能化は、例えば、少なくとも以下の機能化ステップ：アミン反応性中間体を得るためにカルボキシ末端基を活性化するステップと、膜上に所望のバイオレセプターを形成するために当該アミン反応性中間体をアミド化するステップと、を含む。

【0014】

機能化は膜のすべての領域で同じ様式で起こり得る。しかしながら、膜が異なった領域の異なった生体分子に感受性となるように、異なったバイオレセプターは、膜の異なった領域で機能化中に細孔内で形成（または連結もしくは結合）することもできる。加えて、様々な機能化ステップは、単一膜上で行うことができる。しかしながら、膜は数個の部分を有するか、あるいは数個の膜が検出に使用されることもでき、それらは異なって機能化されることになる。

10

【0015】

任意に、本方法は、第1の検出器部および／または第2の検出器部に膜を積層することを更に含む。

【0016】

第1の検出器部および第2の検出器部は、少なくとも50または少なくとも65の温度で熱処理によって膜の両側で互いに接続することができる。このようにして十分な不透過性が達成され得る。温度処理なしに、例えば糊付けによって不浸透性の接続を得ることもできる。

20

【0017】

任意に、媒体中の生体分子の濃度は、以下の測定：(i) 少なくとも1つの細孔を通る流量測定、(ii) インピーダンス測定、および(iii) 動電測定、特に電気泳動測定または電気浸透測定、のうちの少なくとも1つによって決定することができる。簡単なケースでは、細孔を通じて媒体の流れに比例する電気抵抗測定が実施できる。このようにして、単位時間当たりの細孔を通過する電流強度、したがって電荷キャリア（すなわち媒体中のイオン）の数を測定することができる。

【0018】

任意に、生体分子は前立腺特異的抗原（PSA）およびバイオレセプターであるアブタマーを含む。使用されるアブタマーは、特に以下のアブタマー：

a) NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAACGCUCAAGGCGCAGCUCUAGG
CGCG

30

GCCAGUUGC-OH,

b) NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAAGC
TTT-OH,

30

c) NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTC
GGGCATGCGTCCGGAGAACGGGCAAACGAGAGGTCAACCAGC
ACGTCATGAG-OHのうちの1つのアブタマーでよい。

【0019】

本発明は、媒体中の生体分子のための検出システムにも関する。当該検出システムは、媒体を導入することができる第1のチャネル領域および第2のチャネル領域と、少なくとも1つの細孔を含み、第1のチャネル領域を第2のチャネル領域から分離する膜と、を含む。加えて、第1の電極および第2の電極は膜の両側で膜の流れ方向に沿って形成される。バイオレセプターは、細孔内で形成されるか連結されるか接続され、以下のアブタマー：

40

(i) NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAACGCUCAAGG
GCGCG

GCCAGUUGC-OH,

40

(ii) NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATA
GCTTT-OH,

(iii) NH₂-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGG
ACGTCATGAG

50

G T C G G

G C A T G C G T C C G G A G A A G G G C A A A C G A G A G G T C A

C

C A G C A C G T C C A T G A G - O H のうちの少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 2 0 】

したがって、媒体中の P S A 濃度は、第 1 の電極と第 2 の電極との間の媒体のための流路に沿った抵抗測定によって測定することができる。最も簡単なケースでは、電解流の電気抵抗は（電極間に電圧を印加することによって）測定することができる。

【 0 0 2 1 】

膜内の少なくとも 1 つの細孔は、流路に沿ってテーパー状または円筒状のプロファイルを有してよい。

【 0 0 2 2 】

任意に、膜は、異なった生体分子の同時検出を可能にするために、異なった領域の膜が異なったレセプターまたはアブタマーを含む。

【 0 0 2 3 】

任意に、流路に垂直な、第 1 のチャネル領域および / または第 2 のチャネル領域は、50 ミクロンまたはせいぜい 10 ミクロンの最大チャネル幅を有する。このことは、膜を湿らすことによって単孔膜を効率的に達成させ（例えば、膜内の細孔密度がそれによって選択される）、それは感度を高める。チャネル幅は最大 1 m m でもよい。下限は典型的には使用される材料について 1 ミクロンであるが、シリコンまたは他の材料が使用される場合にはより低くなてもよい。

【 0 0 2 4 】

任意に、検出システムは、媒体を分析物注入口におよび電解質を電解質注入口に導入できるように、第 2 の電極に電解質注入口をおよび第 1 の電極に分析物注入口を更に含む。その結果、検出に必要な媒体の量を減らすことができる。

【 0 0 2 5 】

本発明は、媒体中の生体分子の検出のために記載された検出システムの 1 つの使用または使用方法であって、当該検出が電極と第 2 の電極との間の電気抵抗に依る電気変数を測定することによって実施される、使用または使用方法にも関する。

【 0 0 2 6 】

したがって、例示的実施形態は、特に、生物的および非生物的リガンド（生体分子）の検出のための電気化学的センサーに関する。これらは任意の分子、任意の種類の有機および無機化合物、環境毒素、農薬、ホルモン、タンパク質、抗生物質、神経毒を含む。これは、生物群の一部であり得るバクテリア、ウイルスおよび寄生虫をも含む。

【 0 0 2 7 】

例示的実施形態の利点は、より高い選択性および感度を有する、先行技術に対する費用効果の高い代替物がそれによって達成されるとの事実にある。本発明は、更に、上記のような様々な用途のための携帯型移動分析システムとして使用することができるマイクロ流体システムへのナノセンサーの統合を可能にする。例示的実施形態の広範囲の可能な用途のため、本発明は、特にこれまで分析され得なかつたまたは非常に複雑な様式で分析できるにすぎなかつた用途にも使用することができる。

【 0 0 2 8 】

加えて、P S A のみが細孔に連結または結合されるので、機能化は高い選択性を有する。

【 0 0 2 9 】

特に、例示的実施形態は、前立腺（P C a）の早期診断を顕著に簡便化し、よって促進することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

本発明の例示的実施形態は、以下の詳細な説明および様々な実施形態の添付図面からよ

10

20

30

40

50

り理解されるだろう。これらの詳細な説明および添付図面は、本開示を具体的な例示的実施形態に限定するものと解釈するべきでなく、説明および理解の目的のみである。

【0031】

【図1】本発明の例示的実施形態による、生体分子の検出システムを製造する方法の流れ図を示す。

【図2】少なくとも1つの細孔を有する膜を用いる基礎となる測定原理を例証する。

【図3】図3Aおよび図3Bは、図2の測定原理に基づく例示的検出システムおよび測定値取得を示す。

【図4】膜の例示的機能化を例証する。

【図5】本発明の例示的実施形態の検出システムを示す。

10

【図6】図6A～Mは、例示的実施形態の検出システムを製造するためのプロセスフローを示す。

【図7】図7Aおよび図7Bは、本発明の更なる例示的実施形態による、図6のプロセスフローで完了した検出システムを示す。

【発明の具体的説明】

【0032】

図1は、本発明の例示的な実施形態に従う生体分子の検出システムを製造する方法のフローチャートを示す。本方法は、

- 第1のチャネル領域を備えた第1の検出器部および第2のチャネル領域を備えた第2の検出器部を提供すること(S110)と、

- 少なくとも1つの細孔を備えた膜を提供すること(S120)と、

- 第1のチャネル領域および第2のチャネル領域の少なくとも一部は膜によって分離され、第1のチャネル領域および第2のチャネル領域は、媒体が膜の少なくとも1つの細孔を通る流路を形成するために、互いに接続されて、チャネルシステムを形成するよう、第1の検出器部および第2の検出器部を膜の両側に配置すること(S130)と、を含む。

20

【0033】

このリストは任意の順序を意味するものではないと理解される。記載の製造ステップは、互いに独立にまたは並行して実施することができる。膜バイオレセプターは、流路に沿った流れ(例えば抵抗)を測定することによって媒体中の生体分子の濃度を決定するために、流路に沿った膜上に形成される。

30

【0034】

図2は、少なくとも1つの細孔110を有する膜120を用いる基本的な測定原理を例証する。この細孔110は、例えば、1ミクロン未満の(最大)直径(例えば、わずか数ナノメートルまたは100nm未満でもよい)を有するナノチャネルである。膜120は、例えば、単孔のプラスチックフィルムである。

30

【0035】

細孔110を通る断面図は図2の左側に示されており、バイオレセプター112が細孔110内に付着しているか、または形成されている。これらのバイオレセプター112は、膜120を介してイオン電流130が形成されると、検出されるべき分子114(生体分子または分析物分子)が付着または結合するような様式で設計されている(図2の右側を参照)。イオン電流130は、例えば、イオン電流130内の荷電イオンに作用する電場によって生成することができる。生体分子114をバイオレセプター112に連結および/または結合することにより、細孔110を通るイオン電流130の抵抗が変化する。この変化は、電気測定によって測定することができる。

40

【0036】

図3Aは、図2に記載された測定原理に基づく例示的な検出システムを示し、例として、単孔プラスチックフィルム120を有する電気化学測定セルの構造が示されている。この方法で測定できる電流-電圧特性(I/U特性)を図3Bに示す。特性の変化は、媒体50内の分析物の濃度によってもたらされる。したがって、分析物/リガンド分子112

50

+ 114 の、機能化ナノポア 110 への結合は、(定性的) I / U 測定を使用して決定することができる。

【0037】

検出システムは、詳細には、第 1 のチャネル領域 215 および第 2 のチャネル領域 225 を含み、それらの間に膜 120 が配置されている(図 3A を参照)。本発明はこれに限定されることを意図するものではないが、第 1 および第 2 のチャネル領域 215、225 は、典型的には、媒体 50 が移動するチャネルシステムの一部を表すと理解される。媒体は、例えば、生体分子を含むまたは含まない電解質(例えば、0.1M KCl, M = mol/L)でよい。測定セットアップは、膜 120 によって 2 つの半分 215、225 に分割される電解質容器も含んでよい。膜 120 は、細孔として 1 つ以上のナノチャネル 110 を含むことができ、これは、共有結合したレセプター分子 112 で、表面上で誘導体化することができる。共有結合したレセプター分子 112 は、膜 120 上のどこにでも(ほぼ)任意に存在することができる。ナノチャネル 110 の電気抵抗は、リガンド分子 114 の濃度の関数として増加する結果、レセプター 112 は、生体分子(分析物、リガンド) 114 を選択的にかつ高い親和性で結合することができる。

10

【0038】

媒体 50 は、イオン(例えば電解質の一部として)および検出されるべき生体分子 114 を含み、生体分子 114 はイオンであってもよい(しかし、そうである必要はない)。また、第 1 のチャネル領域 215 に第 1 の電極 315 があり、第 2 のチャネル領域 225 に第 2 の電極 325 がある。第 1 の電極 315 と第 2 の電極 325 との間に電圧 U を印加することにより、電流 I がナノチャネル 110 を通って流れる(図 2 を参照)。電流 I は、生体分子 114 を細孔 110 内のレセプター分子 112 に付着させ、前述のように、存在する生体分子 114 の量の関数として電気抵抗を変化させる。より多くの生体分子 114 が存在するほど、細孔 110 内により潜在的に残り、したがって、イオン電流 130 が利用できるそれらの断面を減少させる。

20

【0039】

電気抵抗の変化は、電流電圧を測定することで判断することができる。対応する特性を図 3B に示す。2 つの特性曲線を例として示す。第 1 の特性曲線 310 は、媒体 50 に生体分子 114 がない場合の印加電圧 U の関数として測定された電流 I を示す。第 2 の特性曲線 320 は、培地 50 に多数の生体分子 114 が存在する場合の電流 - 電圧依存性を示している。示されるように、生体分子 114 の結果として、電流 I は、所定の電圧 U に対して減少し、これは、細孔 110 を通過するときの抵抗の増加の結果である。

30

【0040】

最初に述べたように、膜が検出されるべき特定の分子に非常に敏感になるように、対応するバイオレセプター 112 が細孔 110 内に付着する膜の対応する機能化が必要とされる。細孔自体も機能化中に作成できる。

【0041】

図 4 は、例示的な機能化を例証する。まず、カルボン酸 / カルボキシレート末端基の生成は、照射およびエッチングプロセスにより細孔表面上で実施される。これは、例えば、示されている 3 つのステップ(i) ~ (iii) で実施することができる。第 1 のステップ(i)では、例えば、イオンが膜 120 に入り、膜 120 全体を貫通し、それにより開口部を形成するか、少なくともその化学結合を破壊するように、膜 120 は重イオンで照射される。第 2 のステップ(ii)はエッチングステップであり、これによりイオントラックが広くなり、テーパー状の細孔 110 が得られる。最後に、カルボキシレート末端基は、検出されるべき分子 114 に敏感であるか、あるいは検出されるべき分子 114 のレセプターを付着させるためのアンカーポイントとして機能するまたは機能することができる、細孔 110 の表面に形成することができる。

40

【0042】

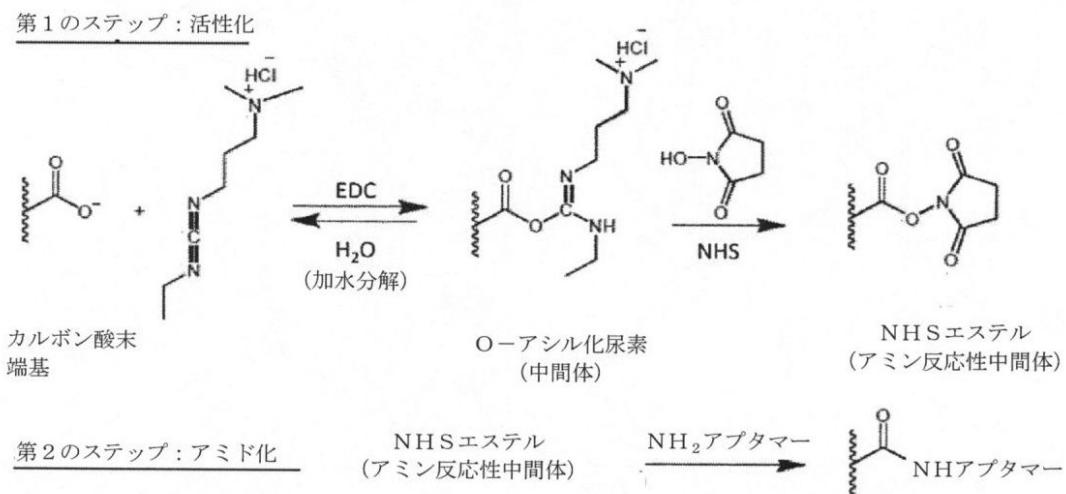
表面特性は、核酸アプタマー(DNA / RNA)などの様々なレセプター分子 112 との共有結合によって調整することができる。Alila (Alim, Nasir S,

50

Ensinger W. 2015, Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores., Chem Commun 51: 15 3454 - 3459)によれば、カップリングは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)およびスルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)を使用した2ステップ反応で実施することができる。EDC/NHSカップリング化学により、表面に位置するカルボン酸/カルボン酸基と生物学的レセプター112(例えばアプタマー)と結合する反応メカニズムは、次のように実現することができる:

【化1】

10



20

【0043】

本発明の例示的な実施形態によれば、反応はマイクロ流体システム内で行われ、その構成および製造は以下により詳細に説明される。

【0044】

第1のステップ(活性化): ここでは、EDCを使用したNHSのエステル化により、カルボキシ末端基が活性化される。O-アシル化尿素中間体が最初に形成され、アミン反応性NHSエステルに変換される。この目的のために、膜120はマイクロ流体システムに組み込まれている。次に、システムに、新しく調製した0.2 mM EDCおよび0.4 mM NHSの水溶液(pH 7)を満たす。細孔110の表面の活性化は、1時間後に完了する。

30

【0045】

第2のステップ(アミド化): これは、レセプター分子112(アプタマー)で機能化が行われる場所であり、その化学構造は少なくとも1つの1次アミノ基(-NH₂)を含む。このアミノ基は、室温で活性化カルボン酸エステルと反応して、アミド結合を形成する(-C=O)-NH-)。この目的のために、マイクロ流体システムは、レセプター分子112(アプタマー)の0.1 mM水溶液で満たされ、一晩放置される。

40

【0046】

非機能化および機能化細孔110は、異なる電流強度により同じ電位で異なるため、成功した機能化は、電流-電圧特性を測定することによって検証される。この感覚の原理は、図2および3すでに説明されている。

【0047】

以下の分子は、バイオレセプター112としてPSA特異的アプタマーとして使用される。

1. RNAアプタマー(参照: Jeong S, Han SR, Lee YJ, Lee SW, 2010, Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen,

50

Biotechnol Lett 32:379-385)配列(5'-3'):
 NH₂-C₆-CCGUCAGGUCA CGGCAGCGAACGCUAAGGCCG
 GCCAGUUGC-OH

2.DNA Aptamer-01(参照:Savory N、Abe K、Sode K、Ikebukuro K. 2010, Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing, Biosens Bioelectron 26:1386-1391)配列(5'-3'):

NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT-10
 OH

3.DNAアプタマー-02(参照:Duan M、Long Y、Yang C、Wu X、Sun Y、Li J、Hu X、Lin W、Han D、Zhao Y、Li J、Ye M、Tan W. 2016, Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging, Oncotarget 7:36436-36446)配列(5'-3'):

NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGG
 GCATGCGTCCGGAGAAGGGCAAACGAGAGGTACCCAGCAC
 GTCCATGAG-OH。20

【0048】

機能化された(単孔)プラスチックフィルム120の感覚特性は、マクロセルで検査することができる。この目的のために、例示的な単孔プラスチックフィルム120を使用することができ、これは各検査の前に2つの液体チャンバー215、225の間に手動で固定される。有利な単孔プラスチックフィルム120は製造が困難である。これに対して、マルチポアプラスチックフィルムは大量生産が可能である。しかしながら、それらは、個々の細孔と比べて低い感度を有する。

【0049】

両方のフィルムの利点を組み合わせるために、マルチポアフィルム120の湿潤面積は、単孔が液体とまだ接触している程度にまで縮小される。これはマイクロシステムへの統合によって行われるため、トレーニングを受けていないユーザーによる検出システムの使用を可能にする。30

【0050】

図5は、異なる分析(異なる生体分子の検出)に使用できる2つの検出器領域500Aおよび500Bを含む可能な検出システムの例を示す。2つの検出器領域500A、500Bのそれぞれは、3つの接続電極510、電解質用の注入口520、および分析物用の2つの注入口530を含む。分析物は、例えば、生体分子114(分析物)で検査されるべき媒体50であり、電解質はイオンを含み(電流をサポートするため)、結果を偽造しない任意の液体でよい。40

【0051】

図5のマイクロ流体システムでは、電解質分子のチャネルと生体分子114との間にマルチポアプラスチックフィルム120が組み込まれる。すべての個々のパートは、粘着層によってまとめられる。マイクロ流体システム、テーブルデバイスの形で電子測定システムに統合することができる。

【0052】

第2の検出器領域500Bは図5の右側に拡大して示されており、膜120は2つの分析物注入口530と関連する電解質注入口520に通じるチャネル521との間に形成される。言うまでもなく、すべての入口を出口にすることもできる。必要なのは、流れの方向を逆にすることのみである。したがって、分析物注入口530および電解質注入口520

0は、対応する出口を表すこともできる。本発明は、特定の流れ方向に制限されることを意図していない。例えば、2つの分析物注入口530の間で膜120の片側への流体接続がある。膜120の反対側は、例えば、電解質注入口520に流体的に接続することができる。加えて、電極は分析物注入口530に形成され、その各々は接続電極510の1つに接続される。電極も電解質注入口520に形成され、接続電極510の1つに接続される。電解質注入口520の電極と分析物注入口530の電極の1つとの間の電圧の標的印加は、それぞれの注入口530から電解質注入口520への分析物50+114の流れを生成する。

【0053】

膜120は、例えば、水平に設計され、分析物注入口530の1つからの分析物の流れは、例えば、膜120を通って、電解質注入口520に通じるチャネル521への垂直方向に生じる。この流れは、対応する電極に電圧を印加することにより、垂直に下向きまたは垂直に上向きに生成することができる。検出システムの動作モードは、生産物の表示によって以下で更に例証する。いくつかの分析物注入口530があるので、異なる測定を並行してまたは連続して実行することができる（例えば異なる生体分子114に対して）。このようにして、異なる生体分子114の分析を並行して行うことができるように、異なる分析物注入口530を膜120の異なる領域に導くことができ、それは異なって機能化される。

【0054】

図6A～6Mは、図5に示されているような例示的な検出システムの製造における様々なステップを例証する。

【0055】

図6A～6Cは、最初に電極の製造を例証する。この目的のために、フォトレジスト層620は、基板610（例えばガラス基板）上の部分に適用される。その後、中間層（例えばクロム層）630および電極層640（例えば銀層）がフォトレジスト層620および露出したガラス基板部分610上に堆積される。堆積は、例えば、物理蒸着（PVD）、例えば、スパッタリングまたは蒸着により実施することができる。最後に、フォトレジスト層620は、その上に形成された例示的なクロム層および銀層とともに除去され、その結果、図6Cに示すように、構造化電極315、325を備えたガラス基板610が形成される。電極は、例えば、第1の電極315および/または第2の電極325を表すことができる。

【0056】

図6D～6Fは、電極を形成する別の方法を例証する。ここでも、例示的な中間層630（例えばクロム層）が最初に基板610に適用され、電極層640がその上に適用され、この例示的な実施形態では金を含むことができる。当該層は、領域内で基板610に適用することができる。次いで、構造化が実施され、すなわち、例示的な金およびクロム層630、640が異なる領域で除去され、その結果、電極315、325のみが残る。

【0057】

このようにして製造された電極構造は、様々な接続電極510が、電解質および分析物用の対応する注入口520、530の電極に接続されている図5でも見ることができる。次に、電極は、第1の電極315および/または第2の電極325を表すことができる。

【0058】

図6G～6Mは、検出システムの製造を例証する。例示的な実施形態によれば、第1の検出器部210および第2の検出器部220が作製され（図6Iを参照）、次いでこれらは一緒にされて検出システムを形成する。この目的のために、第1の検出器部210および第2の検出器部220にチャネル構造が形成され、これらは最終的に分析物および/または電解質のチャネルを表す。

【0059】

図6Gでは、第1の電極315および第2の電極325がその上に形成された基板610は、図6A～図6Fまでのステップでどのように製造できるかを左側に一例として最

10

20

30

40

50

初に見ることができる。これは後に第1の検出器部210になることができる。第2の検出器部220は、図6Gの右側に作成され、基板610が再び最初に示される。次に、粘着中間層660が図示の部分に形成される。粘着中間層660は、例えばチタン材料を有してもよく、0.5ミクロンの例示的な厚さを有してもよい。

【0060】

図6Hからの製造ステップでは、マスク層670（例えば、エポキシで作られたドライレジスト）が図6Gからの構造に適用される。

【0061】

図6Iからの後続の製造ステップでは、マスク層670が構造化され、マスク層670は、第1の検出器部210および第2の検出器部220の中央領域の電極315、325の位置で除去される。その結果、第1の検出部210の第1の電極315および第2の電極325と、第2の検出部220の基板610が露出する。結果として生じるチャネルの特性（特に親水性）は、コーティングによって変更することができる。10

【0062】

結果は図6Jの空間表現で示される。したがって、例えば図5に示されるように、複数の電極が第1の検出部210に形成される。

【0063】

図6Kでは、粘着層680（例えば、粘着中間層またはラミネート層、特に乾燥エポキシラミネート層）が、一例として図6Iからの構造に適用される。

【0064】

次のステップ（図6Lを参照）では、膜120が図6Kから製造された構造に適用される。実施形態によれば、膜120は、例えば、全領域に適用され、熱ラミネートされる（約T=65で）；図6Lの右側を参照。また、部分的にのみ適用する必要があり（図6Lの左側を参照）、マルチボア膜120はチャネルまたはチャネル範囲の間に配置され、その後、熱的に積層される。20

【0065】

膜120が図6Kの構造全体にわたって適用される場合（図6Lの右側を参照）、膜120は、例えば、チャネル領域（例えば、第1のおよび第2のチャネル領域215、225）間の第1の検出器部210および第2の検出器部220（図6Mを参照）をその後接続するべきそれらの部分で、続いて構造化または除去される。最後に、（構造化）膜120が第1の検出器部210と第2の検出器部220の間に配置されるように、第1の検出器部210と第2の検出器部220が互いの上に配置される。最後に、すべての層を相互に接続し、それらを完全に密閉するために、製造された検出器を積層することができる。30

【0066】

図6Mに示されるチャネル領域215、225は、例えば、分析物注入口530と、膜120を通り、チャネル521を介して電解質注入口520（図5を参照）との間の流体接続を表す。第1の電極315は、例えば、図5の分析物注入口530の下に形成され、第2の電極325は、例えば、チャネル521を介して電解質注入口520に導かれる中間電極である

【0067】

例示的な実施形態によれば、膜120の上述の機能化が行われる（例えば、図6Mからの製造ステップ中）。

【0068】

図7A、Bは、本発明の例示的な実施形態による完成した検出システムを示す。

【0069】

図7Aの例示的な実施形態は、膜120が第1の検出器部210と第2の検出器部220との間に、具体的には、第1のチャネル領域215と第2のチャネル領域225とを分離する1つの検出領域125（固定用の支持面を除く）においてのみ、（例えば、50%超または80%超）形成される検出システムを示す。

【0070】

10

20

30

40

50

図6で説明したように、第1の検出器部210および第2の検出器部220の両方は、基板610a、610bをそれぞれ含み、その間にすべての更なる層が形成される。第2の検出器部220は、基板なしで製造することもできる。第1の検出部210から始めて、粘着中間層660aが対応する基板610a上に最初に形成され(図6G～6I参照)、マスク層670aが粘着中間層上に形成され、粘着層680aがその上に形成される。第2の検出部220の基板610bの下に、粘着層680bが順に塗布されるマスク層670bを含む粘着中間層660bが最初に塗布される。

【0071】

加えて、第1の電極315および第2の電極325は、第1の検出部210の基板610a上に形成される(図6A～Cを参照)。したがって、流路130は、第1の電極315と第2の電極325との間に膜120を介して形成され、第1の電極315と第2の電極325との間に電圧が印加されると電流を誘発し、細孔を通るその抵抗(図7Aに示されていない)を測定することができ、培地50中の生体分子114の濃度を決定するために使用することができる。

10

【0072】

図7Bの例示的な実施形態は、(配置されていたときに)第1の検出器部210と第2の検出器部220との間にあった膜120が、(本質的に)第1の電極315から始まる流路130が、第1の検出器部210を出て膜120に向かい、第2の検出器部220に入る点でのみ除去される点でのみ、図7Aの例示的な実施形態と異なる。そうでなければ、特に第1の検出器部210および第2の検出器部220の一部として形成された粘着層680a、bの間の膜120は依然として存在する。

20

【0073】

したがって、図7Bの例示的な実施形態では、第1の粘着層680aは、膜120によって第2の粘着層680bから少なくとも部分的にまたは大部分、-特に検出領域125の外側でも分離される。

【0074】

本発明の例示的な実施形態の有利な態様は、特に以下に関する:

- 大/全表面細孔プラスチックフィルム120は、2つの流体チャネル215、225の間のラボオンチップシステムに統合される(例えば、バッチプロセスで)。

30

- フィルム120は、レーザー切断、電子写真法、またはエッティングにより、流体チャネル215、225の領域で除去される(右の図6L、6Mを参照)。

使用される細孔フィルム120は、再現可能な幾何学的形状を有する円錐状細孔110を含む。

- 粘着層680は、細孔110を一体化することおよび細孔を機能不全にする(閉じる)ことの両方に役立つ。統計的に言えば、1つのみの細孔が電解質と接触できる。単孔プラスチックフィルム120の高感度は、複数孔プラスチックフィルムの助けにより達成される。

- 細孔110の機能化は、チップ製造後に行われるが、機能化の前に行うこともできる。

40

【0075】

チップ製造後の機能化には、事前に機能化された細孔を超える次の利点がある:

- 統合後のマルチポアプラスチックフィルム120の機能化には、少量のレセプター分子112のみが必要である。

- 以前に機能化された細孔を統合することにより、細孔を汚染または詰まらせる可能性がある。

【0076】

例示的な実施形態はまた、以下の利点を提供する。

- 新しいシステムは、Micro Total Analysis System(μTAS)に拡張される可能性を有する。これにより、複数のリガンド分子114の同時検出が可能になる。

50

- マイクロシステムの感度は、単細孔測定に匹敵する。
 - 従来の粘着層は液体UV粘着剤である。これは、細孔の目詰まりを引き起こすため、細孔または機能化細孔の統合には適していない。これらの従来の方法の助けを借りて、システムの不浸透性を保証することはできない。フィルムの機能化は、UV暴露によっても破壊される。これとは反対に、本発明の例示的な実施形態では、多孔質プラスチックフィルム120は熱的に一体化される($T = 65$ 度)。

- 使用されるマルチポアプラスチックフィルムは、統合後と統合前の両方で機能化できる。この方法で100%の収率が達成された。

【0077】

2,500 μm^2 の濡れ面積に対応する50ミクロンのチャネル幅を使用することができます。湿潤領域は、100 μm^2 まで更に低減することができる。従来のプロセスでは、31,416 μm^2 の濡れ面積のみが達成された。

10

【0078】

これまでに説明した機能原理は、ボルタンメトリー法に基づく。他の測定原理が異なる例示的な実施形態で使用される。これらは例えば次のとおりである。

- (i) 細孔110を通る流量測定、
- (ii) インピーダンス測定、
および(iii) 界面動電測定(電気泳動、電気浸透など)。

【0079】

しかし、最終的に、これらの測定原理は、細孔110を通る生体分子114の流れを妨げる抵抗も測定する。測定された変数のみが以下において変化する:(i) 媒体50の流速;(ii) 電気インピーダンス;(iii) 界面動電量。

20

【0080】

複雑な様式でそれぞれの分析物/リガンド分子を検出する現在の方法と比較して、本発明の例示的な実施形態は、現在利用可能な分析方法と比較してより高い選択性および感度で濃度測定を可能にする。これにより、生物系および非生物系における様々なリガンドを検出できる。これらは、次の生物群およびその成分を含む。

- 任意の種類の低分子有機および無機化合物
- 環境毒素
- 農薬
- ホルモン
- タンパク質
- 抗生物質
- 神経毒
- バクテリア
- ウイルス
- 寄生虫。

30

【0081】

本発明により、ナノセンサーの、大量生産可能なラボオンチップシステムへの統合が可能になり、これは上記の用途のためのコンパクトで携帯可能な分析システムとして使用できる。これにより、数分以内に測定を実行できるようになり、選択された場合に人命を救うことができる。本検出システムは、個々のテストごとに1回使用されるように、使い捨てマイクロ流体システムとして使用できる。したがって、当該システムは大量に生産できる。

40

【0082】

説明、特許請求の範囲および図面に記載された本発明の特徴は、個々にまたは任意の組み合わせのいずれかで本発明の実現化のために必須である。

【0083】

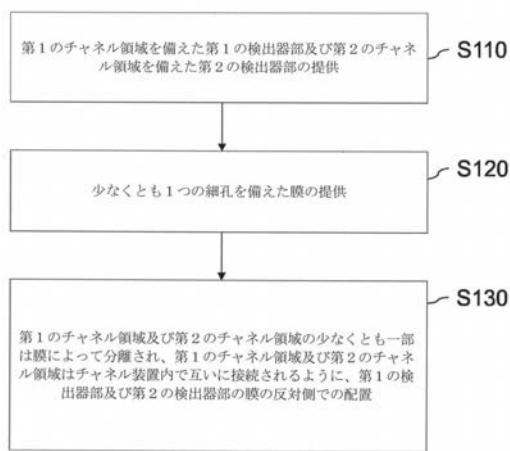
符号の説明

50 媒体

50

1 1 0	細孔	
1 1 2	バイオレセプター	
1 1 4	生体分子	
1 2 0	膜	
1 2 5	検出範囲	
1 3 0	流路	
2 1 0、2 2 0	検出器部	
2 1 5、2 2 5	チャネル地域	
3 1 0、3 2 0	電圧特性	
3 1 5	第1の電極	10
3 2 5	第2の電極	
5 0 0 A、5 0 0 B	検出器領域	
5 1 0	接続電極	
5 2 0	電解質注入口	
5 2 1	チャネル	
5 3 0	分析物注入口	
6 1 0	基板	
6 2 0	フォトレジスト層	
6 3 0	中間層(例えはクロム製)	
6 4 0	電極層(例えは銀または金製)	20
6 6 0	粘着中間層	
6 7 0	マスク層	
6 8 0	粘着層	

【図1】



【図3A】

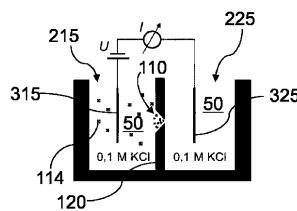
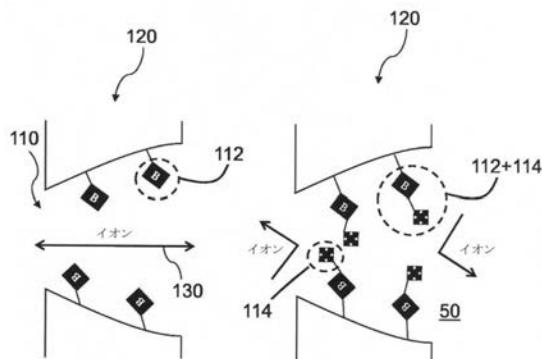
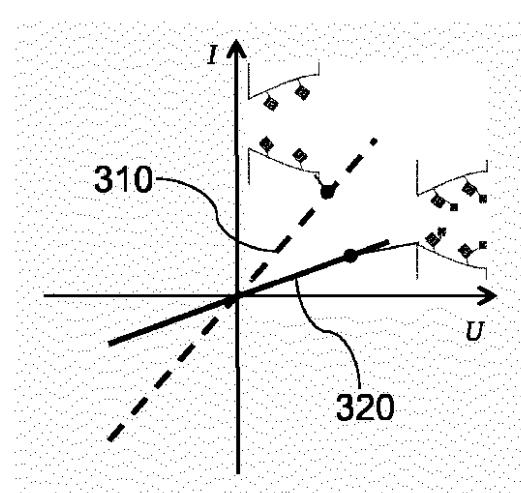


Fig. 3A

【図2】



【図 3B】



【図 4】

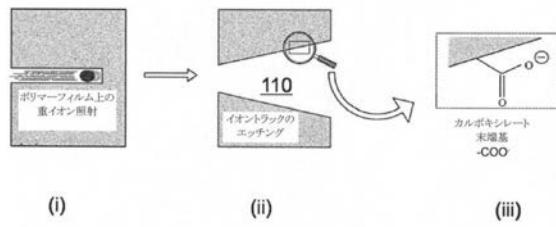


Fig. 3B

【図 5】

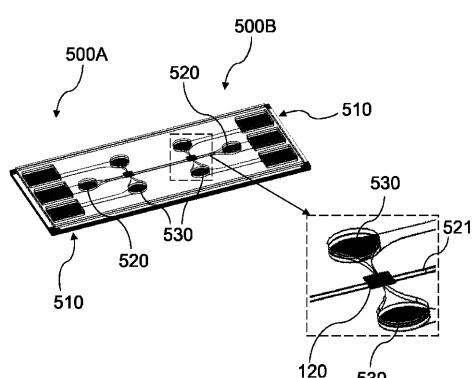
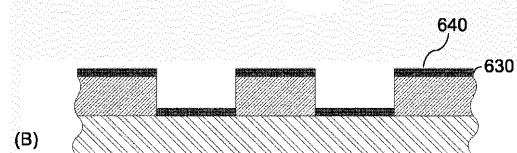
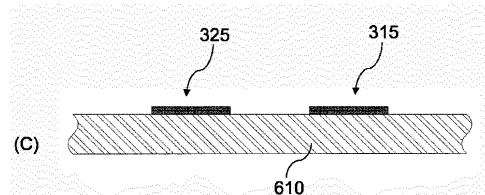


Fig. 5

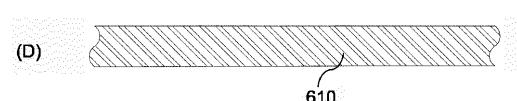
【図 6 (B)】



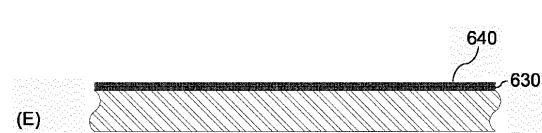
【図 6 (C)】



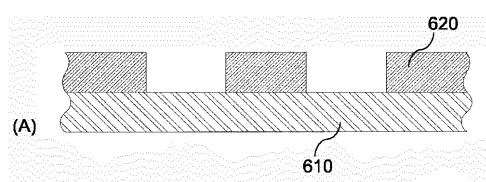
【図 6 (D)】



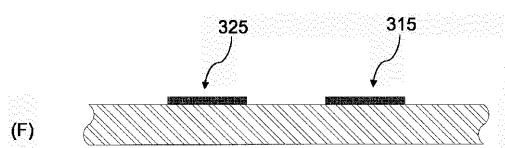
【図 6 (E)】



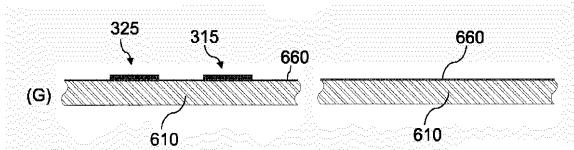
【図 6 (A)】



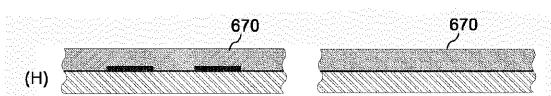
【図 6 (F)】



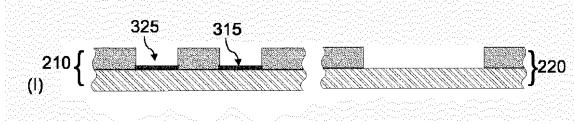
【図 6 (G)】



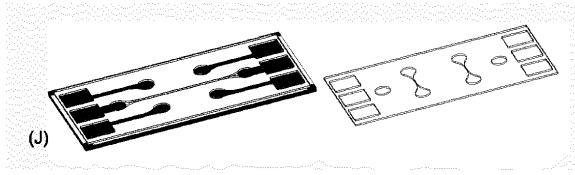
【図 6 (H)】



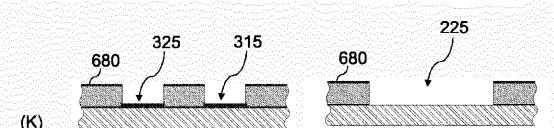
【図 6 (I)】



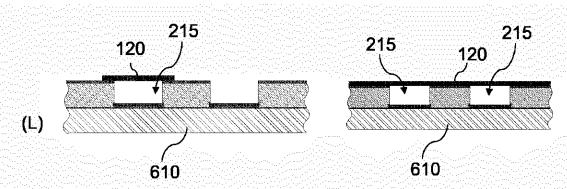
【図 6 (J)】



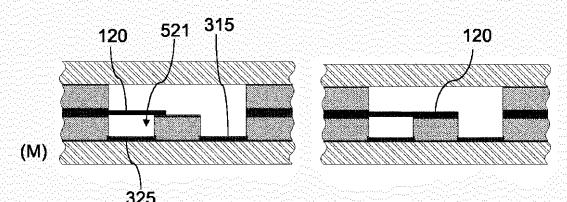
【図 6 (K)】



【図 6 (L)】



【図 6 (M)】



【図 7 A】

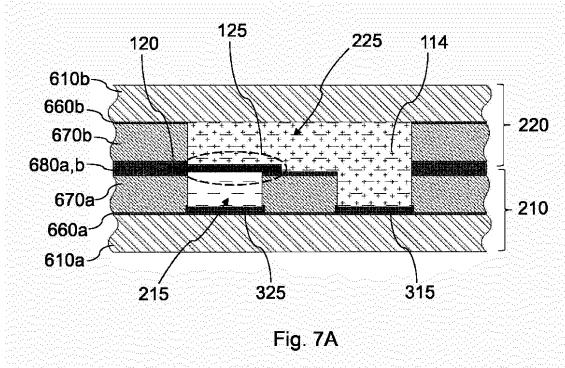


Fig. 7A

【図 7 B】

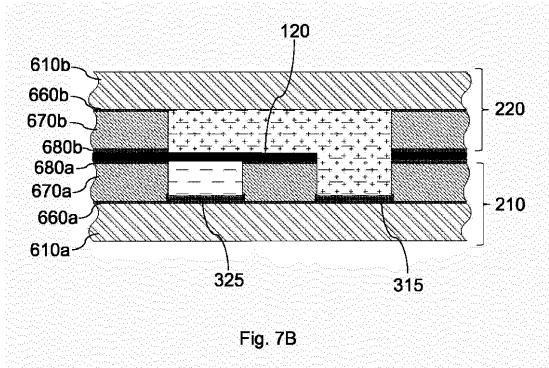


Fig. 7B

【配列表】

2020525795000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2018/065542
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; B01L 3/00(2006.01)i; B82Y 15/00(2011.01)i; G01N 27/327(2006.01)n</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N; B01L; B82Y		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOLFGANG ENSINGER ET AL. "The iNAPO Project: Biomimetic Nanopores for a New Generation of Lab-on-Chip Micro Sensors" <i>PROCEEDINGS OF THE 2ND WORLD CONGRESS ON RECENT ADVANCES IN NANOTECHNOLOGY</i> , 01 April 2017 (2017-04-01), DOI: 10.11159/icnfc17.141 ISSN: 2371-5308, ISBN: 978-1-927877-28-9. XP055500092 pages 2-6, table 1	1-9
Y	Mario El Khoury ET AL. "Integration of Nanochannels for Lab-on-Chip-Systems" <i>Micro-Nano-Integration; 6. GMM Workshop Duisburg 5-6 October 2016</i> , 08 December 2016 (2016-12-08), Retrieved from the Internet: https://ieeexplore.ieee.org/iel7/7776050/7776051/07776085.pdf [retrieved on 2018-08-15] . XP055500095 pages 1-3, table 1	10-15
X	WO 2015172992 A1 (BOSCH GMBH ROBERT [DE]) 19 November 2015 (2015-11-19) pages 1-7	1, 4-8
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p> <p>* 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</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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</p>		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2018		Date of mailing of the international search report 06 September 2018
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Diez Schlereth, D Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/065542**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOHAI MANDABI ET AL. "Label-free DNA detection using the narrow side of funnel-type etched nanopores" <i>BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS</i> , AMSTERDAM, NL, Vol. 42, 01 April 2013 (2013-04-01), pages 362-366 DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.036 ISSN: 0956-5663, XP055500097 pages 362-364	1, 4, 5, 8, 9
Y	ALZGHOUL SALAH ET AL. "Measurement of serum prostate cancer markers using a nanopore thin film based optofluidic chip" <i>BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS</i> , ELSEVIER SCIENCE LTD. UK, AMSTERDAM, NL, Vol. 77, 09 October 2015 (2015-10-09), pages 491-498 DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.006 ISSN: 0956-5663, XP029311827 pages 492-494	10-15
Y	BEI LIU ET AL. "Detection of the human prostate-specific antigen using an aptasensor with gold nanoparticles encapsulated by graphitized mesoporous carbon" <i>MICROCHIMICA ACTA ; AN INTERNATIONAL JOURNAL ON MICRO AND TRACE ANALYSIS</i> , SPRINGER-VERLAG, VI, Vol. 178, No. 1 - 2, 08 May 2012 (2012-05-08), pages 163-170 DOI: 10.1007/S00604-012-0822-5 ISSN: 1436-5073, XP035075079 pages 163-164	10-15
A	US 2012142016 A1 (RONAGHI MOSTAFA [US] ET AL) 07 June 2012 (2012-06-07) [0054-0061]	1-15
A	US 2010243449 A1 (OLIVER JOHN S [US]) 30 September 2010 (2010-09-30) [0105, 0122, 0149]	1-15
A	ARMAGAN KOCER ET AL. "Nanopore sensors: From hybrid to abiotic systems" <i>BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS</i> , ELSEVIER SCIENCE LTD. UK, AMSTERDAM, NL, Vol. 38, No. 1, 12 May 2012 (2012-05-12), pages 1-10, [retrieved on 2012-06-19] DOI: 10.1016/j.bios.2012.05.013 ISSN: 0956-5663, XP028398315 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members					International application No. PCT/EP2018/065542		
Patent document cited in search report		Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2015172992	A1	19 November 2015	DE	102014209193	A1	19 November 2015
				WO	2015172992	A1	19 November 2015
US	2012142016	A1	07 June 2012	NONE			
US	2010243449	A1	30 September 2010	EP	2411536	A2	01 February 2012
				US	2010243449	A1	30 September 2010
				WO	2010111605	A2	30 September 2010

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2018/065542

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/543 G01N33/574 B01L3/00 B82Y15/00 ADD. G01N27/327
--

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
G01N B01L B82Y

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WOLFGANG ENSINGER ET AL: "The iNAPO Project: Biomimetic Nanopores for a New Generation of Lab-on-Chip Micro Sensors", PROCEEDINGS OF THE 2ND WORLD CONGRESS ON RECENT ADVANCES IN NANOTECHNOLOGY, 1. April 2017 (2017-04-01), XP055500092, ISSN: 2371-5308, DOI: 10.11159/icnfc17.141 ISBN: 978-1-927877-28-9 S. 2-6, Tabelle 1 -----	1-9
Y	----- -/-	10-15

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	
A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
E frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	*&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Rechercheberichts
16. August 2018	06/09/2018
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Diez Schlereth, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2018/065542

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Mario El Khoury ET AL: "Integration of Nanochannels for Lab-on-Chip-Systems", Micro-Nano-Integration; 6. GMM Workshop Duisburg 5-6 October 2016, 8. Dezember 2016 (2016-12-08), XP055500095, ISBN: 978-3-8007-4278-3 Gefunden im Internet: URL: https://ieeexplore.ieee.org/iel7/7776051/07776085.pdf [gefunden am 2018-08-15] S. 1-3, Tabelle 1 -----	1-9
Y	-----	10-15
X	WO 2015/172992 A1 (BOSCH GMBH ROBERT [DE]) 19. November 2015 (2015-11-19) S. 1-7 -----	1,4-8
X	YOHAI MANDABI ET AL: "Label-free DNA detection using the narrow side of funnel-type etchednanopores", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, Bd. 42, 1. April 2013 (2013-04-01), Seiten 362-366, XP055500097, AMSTERDAM, NL ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.036 S. 362-364 -----	1,4,5,8, 9
Y	ALZGOHUL SALAH ET AL: "Measurement of serum prostate cancer markers using a nanopore thin film based optofluidic chip", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE LTD. UK, AMSTERDAM, NL, Bd. 77, 9. Oktober 2015 (2015-10-09), Seiten 491-498, XP029311827, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2015.10.006 S. 492-494 -----	10-15
Y	BEI LIU ET AL: "Detection of the human prostate-specific antigen using an aptasensor with gold nanoparticles encapsulated by graphitized mesoporous carbon", MICROCHIMICA ACTA ; AN INTERNATIONAL JOURNAL ON MICRO AND TRACEANALYSIS, SPRINGER-VERLAG, VI, Bd. 178, Nr. 1 - 2, 8. Mai 2012 (2012-05-08), Seiten 163-170, XP035075079, ISSN: 1436-5073, DOI: 10.1007/S00604-012-0822-5 S. 163-164 -----	10-15
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2018/065542

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2012/142016 A1 (RONAGHI MOSTAFA [US] ET AL) 7. Juni 2012 (2012-06-07) [0054-0061] ----- US 2010/243449 A1 (OLIVER JOHN S [US]) 30. September 2010 (2010-09-30) [0105,0122,0149] ----- ARMAGAN KOCER ET AL: "Nanopore sensors: From hybrid to abiotic systems", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE LTD, UK, AMSTERDAM, NL, Bd. 38, Nr. 1, 12. Mai 2012 (2012-05-12), Seiten 1-10, XP028398315, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2012.05.013 [gefunden am 2012-06-19] das ganze Dokument -----	1-15
A		1-15
A		1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2018/065542

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2015172992 A1	19-11-2015	DE 102014209193 A1 WO 2015172992 A1	19-11-2015 19-11-2015
US 2012142016 A1	07-06-2012	KEINE	
US 2010243449 A1	30-09-2010	EP 2411536 A2 US 2010243449 A1 WO 2010111605 A2	01-02-2012 30-09-2010 30-09-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 37/00 (2006.01)	G 01 N 37/00	101
B 82 Y 15/00 (2011.01)	B 82 Y 15/00	
G 01 N 27/00 (2006.01)	G 01 N 27/00	Z
G 01 N 27/04 (2006.01)	G 01 N 27/04	Z

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 マリオ、エル、コーリー

ドイツ連邦共和国ダルムシュタット、ヘルダーリンベーク、24

(72)発明者 ボルフガング、エンジンガー

ドイツ連邦共和国ミュンスター - アルトハイム、ポンメルンシュトラーセ、16ペー

(72)発明者 ハー. ウルリッヒ、ゲーリンガー

ドイツ連邦共和国ロスドルフ、ファザーネンベーク、6

(72)発明者 セバスティアン、クエドナウ

ドイツ連邦共和国ダルムシュタット、アム、トロッケンブッシュ、13

(72)発明者 イバナ、ドゥツノビック

ドイツ連邦共和国マインツ、モンバッハ、シュトラーセ、47

(72)発明者 ヘルムート、エフ. シュラーク

ドイツ連邦共和国オーバー - ラムシュタット、ポツダマー、シュトラーセ、67

F ターム(参考) 2G058 AA09 CC18 DA09

2G060 AA15 AA19 AD06 AF06 AF07 AF20 AG11 AG15 GA04 KA09

【要約の続き】

度を決定する。