

(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2007-505311

(P2007-505311A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int.C1.

F 1

テーマコード(参考)

GO1N 33/543 (2006.01)

GO1N 33/543 525C

GO1N 33/553 (2006.01)

GO1N 33/553

GO1N 33/543 541

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

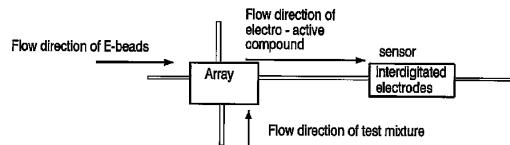
(21) 出願番号 特願2006-525984 (P2006-525984)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月7日 (2004.9.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年2月28日 (2006.2.28)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2004/051698
 (87) 國際公開番号 WO2005/024425
 (87) 國際公開日 平成17年3月17日 (2005.3.17)
 (31) 優先権主張番号 03103321.0
 (32) 優先日 平成15年9月9日 (2003.9.9)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501344315
 コニンクリュケ フィリップス エレクトロニクス エヌ.ブイ.
 オランダ国, アイントホーフェン エヌエル-5621 ビーエー, グロエネウォウドセベグ 1
 (74) 代理人 100087789
 弁理士 津軽 進
 (74) 代理人 100114753
 弁理士 宮崎 昭彦
 (74) 代理人 100122769
 弁理士 笹田 秀仙
 (72) 発明者 スタベルト ヘンドリク アール
 オランダ国 5656 アーーー アインドーフェン プロフ ホルストラーン 6
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】検体を検出するためのナノ粒子

(57) 【要約】

本発明は、検体と共有結合を形成することができる基と、検出可能な部分と、を有する検体を検出するためのデバイスであって、当該デバイスがナノ粒子であり、検出可能な部分が、磁気活性、電気活性、又は光学活性であることを特徴とするデバイスに関する。本発明は、更に、磁気活性基、電気活性基又は光学活性基と、検体と共有結合を形成することができる基と、を有するナノ粒子を用いて検体を検出するための方法であって、a) ナノ粒子と共有結合を形成することができる基が、キャプチャープローブにある場合、その基を保護するステップと、b) 検体を任意に保護されたキャプチャープローブに結合させて、検体がナノ粒子と共有結合を形成することができる少なくとも1つの基を含む、検体キャプチャープローブ複合体を得るステップと、c) 互いに共有結合を形成するように、検体キャプチャープローブ複合体及びナノ粒子を接触させるステップと、d) アンペロメトリック法、インピーダンス測定法、磁気法又は光学法によって、ナノ粒子に共有結合される検体を検出するステップと、を含む方法にも関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検出可能な部分と、検体と共有結合を形成することができる基と、を有する前記検体を検出するためのデバイスであって、当該デバイスがナノ粒子であり、前記検出可能な部分が、磁気活性、電気活性、又は光学活性であることを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

前記ナノ粒子が、1 nm乃至5 μmの範囲にある直径をもつ、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記検体と共有結合を形成することができる前記基が、少なくとも、カルボキシル基、活性化エカル基、ハロゲン化アシル基、アミン基、スルフヒドリル基、エポキシ基、又はヒドロキシ基を有する、請求項1又は2に記載のデバイス。 10

【請求項 4】

前記ナノ粒子が、常磁性粒子、超常磁性粒子、金属粒子、強誘電性粒子、帶電粒子、Eビーズ又は蛍光量子ドットから選択される、請求項1乃至3にの何れか一項に記載のデバイス。

【請求項 5】

少なくとも、磁気活性基、電気活性基又は光学活性基と、検体と共有結合を形成することができる基と、を有するナノ粒子を用いて、前記検体を検出するための方法であって、a) 前記ナノ粒子と共有結合を形成することができる基が、キャプチャープローブにある場合、前記基を保護するステップと、 20

b) 前記検体を任意に保護された前記キャプチャープローブに結合させて、前記検体が前記ナノ粒子と共有結合を形成することができる少なくとも1つの基を含む、検体キャプチャープローブ複合体を得るステップと、

c) 互いに共有結合を形成するように、前記検体キャプチャープローブ複合体及び前記ナノ粒子を接触させるステップと、

d) アンペロメトリック法、インピーダンス測定法、磁気法又は光学法によって、前記ナノ粒子に共有結合される前記検体を検出するステップと、
を含む方法。 30

【請求項 6】

前記キャプチャープローブが、アプタマ、ペプチド、タンパク質、抗体、炭水化物、レクチン、ホルモン及び脂質から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記キャプチャープローブが、固体支持体に付着される、請求項5又は6に記載の方法。
。

【請求項 8】

a) 検体と共有結合を形成することができる基を有する、磁気活性ナノ粒子、電気活性ナノ粒子又は任意の活性ナノ粒子と、

b) 固体支持体上に任意に固定化され得るナノ粒子に反応しないキャプチャープローブと、 40

c) 前記キャプチャープローブを固定化するための任意の固体支持体と、
を有するパツからなるキット。

請求項1乃至4の何れか一項に記載のナノ粒子を用いて、ただ1つのナノ粒子が1つの検体に結合するように前記ナノ粒子による染色反応を実施することによって、測定される信号をキャプチャープローブに結合された検体の量に直接関係づける、前記キャプチャープローブを染色するための汎用較正方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、検体(analyte, アナライト)と共有結合を形成することができる基(group 50

類)と、検出可能な部分(moiety)と、を有する検体を検出するためのデバイスに関する。本発明は、更に、このデバイスを用いて検体を検出するための方法と、前記デバイスを含むパーツからなるキット(a kit of parts, 部品一式)と、このデバイスを用いる較正方法と、に関する。

【背景技術】

【0002】

検体を検出するための方法は、当技術分野において知られている。核酸リガンドバイオチップは、米国特許出願公開第6,242,246号明細書及び米国特許出願公開第6,458,543号明細書において発明者ゴールドらにより説明されている。これらのバイオチップは、2以上の核酸リガンドが空間的に規定されたやり方で付着される固体支持体からなる。それぞれの核酸リガンドは、体液のようなテスト混合物中に含まれる特定のターゲット(target, 標的)分子に対して特異的な親和性(avid)結合を形成することができる。ターゲット分子は、タンパク質、ホルモン、薬物、細胞、化学物質などであり得る。

10

【0003】

相補的なシーケンス以外の分子と結合することができる核酸は、アプタマ(aptamer)と呼ばれることが多い。1つのアプタマは、一般に、30~80個の核酸を含み、或るターゲット分子に対して高い親和性(affinity)をもつことができる(解離定数(K_d)の報告されたものは、 10^{-11} 乃至 10^{-6} モル濃度(mol/l)である)。各アプタマは、米国特許出願公開第6,482,594号明細書、米国特許出願公開第6,291,184号明細書、米国特許出願公開第6,376,190号明細書及び米国特許出願公開第6,458,539号明細書に説明された、いわゆる、SELEX又はPHOTOUSELEXプロセスにおいて、それらのアプタマの親和性に関して選択される。

20

【0004】

タンパク質検出用の一般的なフォトアプタマアレイについては、通常、1)アプタマアレイ及びテスト混合物をインキュベート(incubate, 培養)するステップと、2)テスト混合物を洗い流す(事前架橋洗浄)ステップと、3)308nmの光を用いて結合されたターゲット及びアプタマを架橋結合させるステップと、4)架橋結合後に洗浄を行うステップと、5)染色溶液中でアレイをインキュベートするステップと、6)染色溶液を取り除くステップと、7)染色を検出するステップと、8)データを分析するステップと、が実施される。

30

【0005】

検体を検出するために、ナノ粒子も開示されている。米国特許出願公開第6,548,311号明細書には、検体を検出する方法及びこの方法を実行するためのデバイスが説明され、この方法及びデバイスは、化学、生化学、分子遺伝学、食品化学、バイオテクノロジ、環境及び医療の分野での分析又は診断に用いられる。検体を検出するために、マーカー粒子を囲む測定溶液のものとは異なる電気的特性又は異なる比透磁率をもつマーカー粒子が、用いられる。マーカー粒子は、検体に特異的に結合し、又は検体と競合する結合部位に特異的に結合する。検体は、電極によって生成される電界若しくは電流の変化によって検出され、又は電極に印加される電圧若しくは磁界の変化によって検出される。これらの変化は、検体と結合しているマーカー粒子によって、又は検体の代わりに電界中で結合部位に結合しているマーカー粒子によって、引き起こされる。これらのマーカー粒子は、ナノ粒子であってもよいが、常に、マーカー粒子に含まれる抗体を介して検体に結合する。このような方法の欠点は、検体のタイプごとに別の抗体を必要とすることである。それゆえ、実際には、種々のナノ粒子-抗体の複合体が、種々の検体と結合するように作製されることが必要である。この点について特異的でなく、ナノ粒子の表面を修飾することなく、どんな検体に対しても用いられることができるナノ粒子、を得ることは重要な利点であろう。

40

【0006】

(フォト)アプタマアレイを用いる場合、タンパク質の染色(上述されたステップ5)

50

は、通常、アプタマ結合されたターゲット分子にあるフリーアミン基に化学的に結合する蛍光団（fluorophore, フルオロホア）により実施される。アミン官能基への結合は、特に適している。なぜならば、事実上（結合されていない）アプタマとの反応が生ずることはないからである。蛍光発光を用いることの欠点は、アレイ基板の自動蛍光発光によって生じるバックグラウンド信号である。

【0007】

蛍光発光を必要としないターゲット結合のための他の検出方法は、米国特許出願公開第6,242,246号明細書及び米国特許出願公開第6,458,543号明細書から知られている。これらの米国特許明細書は、具体的には、a) 絶縁ゲートにおける化学ポテンシャルの局所的な変化を利用する化学電界効果トランジスタと、b) 金属面における屈折率の変化を用いる表面プラズモン共鳴と、c) チップ表面の分子をイオン化することが可能なレーザによる照射後のイオン化生成物の飛行時間（質量）を検出する、質量分析と、d) ナノメータレベルで表面のトポロジを検出する、原子間力顕微鏡法及び走査トンネル顕微鏡法と、を記載する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記の提案された検出技法は、少量の結合されたタンパク質の検出に対する感度が不十分であり、又は分子診断法のカートリッジの用途のために簡単に小型化されることができない。更に、上記に説明された技法は、異なるタンパク質ごとに別個の較正を必要とする。

【0009】

知られている方法の他の欠点は、異なる生体分子の交差反応の発生であり、これは、検出に際して偽陽性の結果につながる。同じ表面（即ちアレイ）上で複数の検体を使用する場合、発展ステップにおいて標識化した生体分子を使用することは、生体分子の非特異的な交差反応によって非常に複雑になる。

【0010】

従って、本発明の目的は、高感度で検体の検出を可能にする、検体の非特異的な結合のためのナノ粒子を提供することにある。このようなナノ粒子は、さまざまな異なるターゲット分子のための別個の較正を不要にする汎用較正方法を提供する他の利点も有する。本発明のこれら及び他の態様は、下記に説明される実施形態から明らかとなり、これらの実施形態を参照してより明瞭に説明される。

【0011】

従って、より具体的には、本発明は、その支持体上にリガンドが付着される固体支持体を有する、核酸、多糖類、脂質、（修飾された）抗体、（修飾された）タンパク質、ペプチド又はホルモンリガンドバイオチップに関する。これらのリガンドは、テスト混合物内の特定のターゲット分子（例えば、タンパク質、ホルモン、細胞、薬物など）に特異的に結合する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

この目的のために、本発明は、検出可能な部分と、検体と共有結合を形成することができる基と、を有する検体を検出するためのデバイスであって、当該デバイスがナノ粒子であり、検出可能な部分が、磁気活性、電気活性、又は光学活性であることを特徴とするデバイスに関する。

【0013】

本発明によれば、ターゲット分子の検出は、粒径がnm（ナノメートル）～μm（マイクロメートル）の範囲にあるサイズをもつ粒子、より具体的には、1nm～5nmの範囲にある直径をもつ粒子であって、例えば、検体のアミノ酸に共有結合される粒子を必要とする。特に、常磁性粒子、超常磁性粒子、金属粒子、強誘電性粒子、帯電粒子、Eビーズ（E-beads, Eビード）又は蛍光量子ドットが利用されてもよい。これらの粒子（又はビ

10

20

30

40

50

ーズ)は、表面の(誘電)電気特性又は磁気特性に影響を及ぼし、それにより、表面特性に変化をもたらし、この変化が、アンペロメトリック(amperometric, 電流変化測定)法、インピーダンス測定(impedimetric, インペディメトリック)法、磁気法又は光学法によって検出されることができる。

【0014】

本発明は、核酸リガンドアレイのようなリガンドアレイを用いる、ターゲット分子のための高感度検出方法、にも関する。更に、本発明の目的は、測定される信号を、表面結合されたターゲット分子の量と直接関係づける、汎用較正方法を提供することにある。その場合、表面結合されたターゲット分子濃度は、例えば、表面におけるリガンド-検体の吸着作用を説明する(ラングミュア吸着等温式のような)表面結合モデル及び或るターゲットについて、アプタマ又は任意の他のリガンドの平衡親和定数(K_a 又は K_d)を用いて、テスト溶液の未知の濃度に関連づけられることができる。

【0015】

Eビーズは、刺激(熱、光、化学反応など)に応じて、電気活性分子を放出する粒子である。表面修飾された(例えば、カルボキシル化、アミノ化、又はビオチニル化された)Eビーズを、リガンド結合されたタンパク質(又は他の検体)に結合させることは、当技術分野で一般に知られているように実施されることができる。特に興味深いことは、タンパク質の第1級アミンを標的とする、例えば、約8.5 pH(ペーハー)のような適切なpHでの、活性化エステル(activated ester)を介するEビーズのカップリングである。Eビーズが反応しており、反応していないビーズが取り除かれている場合に、刺激が与えられることができ、電気活性分子は溶液中に放出される。これらの分子は、電気活性種が酸化され及び/又は還元されることによりファラデー(Faradaic, 感応)電流をもたらすポテンシャルにおいて、電極の、好ましくは、小さな電極間隔で(好ましくは、100ミクロン未満の、より好ましくは、20ミクロン未満の、最も好ましくは、2ミクロン未満の間隔で)互いに嵌合された電極の、下流(downstream, ダウンストリーム)で検出される。安定した読み取りを得るために、電気活性種が、p-アミノフェノール又はキノンのようなレドックスリサイクリング化合物であることが好ましい。互いに嵌合された電極は、好ましくは、テスト混合物との接触が避けられ、それにより、電極の汚損を防止するように置かれる。このことは、更に、リガンドアレイ及びEビード染色のためのアンペロメトリックセンサ設計の一実施例を示す図1に示される。

【0016】

一般に、検体に対する好適な結合は、検体と共有結合を形成することができる基が、少なくとも、カルボキシル基、活性化エステル基、ハロゲン化アシル基、アミン基、スルフヒドリル基、エポキシ基、又はヒドロキシ基を有する場合に得られる。活性エステルは、当業者に知られており、例えば、スクシンイミドエステル(succinimide ester)を含む。

【0017】

本発明のある利点は、同じナノ粒子を用いて、あらゆる検体を簡単に検出することである。従って、本発明は、更に、磁気活性基、電気活性基又は光学活性基と、検体と共有結合を形成することができる基と、を有するナノ粒子を用いて、検体を検出するための方法であって、

a) ナノ粒子と共有結合を形成することができる基が、キャプチャープローブ(capture probe, 捕捉プローブ)上にある場合、その基を保護するステップと、

b) 検体を任意に保護されたキャプチャープローブに結合させて、検体がナノ粒子と共有結合を形成し得る少なくとも1つの基を含む、検体キャプチャープローブ複合体を得るステップと、

c) 互いに共有結合を形成するように、検体キャプチャープローブ複合体及びナノ粒子を接触させるステップと、

d) アンペロメトリック法、インピーダンス測定法、磁気法又は光学法によって、ナノ粒子に共有結合される検体を検出するステップと、

10

20

30

40

50

を含む方法にも関する。

【0018】

検体と共有結合を形成することができる基は、通常、磁気活性基、電気活性基又は光学活性基とは別の基であるが、同じ基であってもよく、又はそれらの基の一部であってよい。

【0019】

好ましくは、キャプチャープローブは、アプタマ、ペプチド、タンパク質、抗体、炭水化物、レクチン、ホルモン又は脂質である。より好ましくは、キャプチャープローブは、固体支持体に付着される。

【0020】

アンペロメトリック検出は、キャプチャープローブ結合された検体が、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 又はアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase) などの酵素で染色される場合に、達成されることもできる。染色後、この酵素によってレドックス活性化合物に変換される基質が付加される。レドックス活性化合物は、好ましくは、レドックスリサイクリング化合物である。

【0021】

キャプチャープローブ結合された検体の染色が、表面誘電特性、即ち、表面電荷密度に大きな影響を及ぼす粒子によって実施される場合、表面インピーダンスの変化が測定されることができる (インペディメトリック検出)。この変化は、金コロイドのような高電荷密度をもつ粒子、又は強誘電性粒子のような高い分極率をもつ粒子、の結合により生じる二重層キャパシタンスの変化及び / 又は表面ポテンシャルの変化によって、もたらされることがある。

【0022】

キャプチャープローブ結合された検体の染色は、表面修飾された超常磁性粒子で実施されることができる。反応した粒子の検出は、GMR (Giant Magnetic Resonance; 巨大磁気共鳴) 検出によって、又は誘導方法 (inductive method) の何れかによって実施されることがある。超常磁性粒子の適切な直径サイズは、5 nm 乃至 3 μm であり、より好ましくは、10 nm 乃至 350 nm の範囲にある。

【0023】

粒子の表面は、タンパク質との架橋結合が達成され得るように修飾されるべきである。特に興味深いことは、タンパク質の第1級アミンを標的とする、約 8 . 5 pH で活性化工ステルを介するカップリングである。

【0024】

結合されていない磁性粒子は、場の勾配 (field-gradient) が表面から離れるように磁場を印加することによって、表面から取り除かれることができる。これにより、洗浄ステップの必要性が不要 (redundant) になる。小さな磁性粒子 (< 1 ミクロン、即ち、低磁化) の場合は、非常に高い場が必要となる可能性がある。この場合、反応しない粒子は、より高い磁化をもつより大きい粒子を加えることによって取り除かれ、それゆえ、より低い外部場において使用されることができる。より大きい粒子が比較的接近して存在するため、より小さい粒子は引き付けられるようになり、それゆえ、表面から取り除かれることができる。

【0025】

機能量子ドットを用いる蛍光検出が、適用されることもできる。量子ドットは、非常に明るい発光特性をもつ小さい半導電性粒子である。発光波長は、量子ドットのサイズに依存する。キャプチャープローブ結合された検体の染色は、表面修飾された量子ドットによって実施されることがある。例えば、CdSe/ZnSコアシェル粒子は、メルカプトアルキルカルボキシル酸基 (mercapto alkylcarboxylic acid group) で修飾されられることができ、そのため、カルボキシル酸の機能性 (functionality) を量子ドットの外部表面に付与する。この機能性が、検体の第1級アミン基へのカップリングのために用いられることがある。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明は、更に、分子的に溶解された分子（「色素（dyes）」）の代わりにナノサイズの粒子を、例えば、アプタマ結合されたタンパク質用の染料として用いる汎用較正方法にも関する。この方法は、較正に関して大きな利点をもたらす。分子溶解された色素の場合、アプタマに結合されるタンパク質は、2つ以上の色素分子で染色される。結合された色素分子の数は、タンパク質のサイズ、染色反応の効率及びタンパク質における反応基の数に依存する。このことは、或る表面濃度に関する（蛍光）信号が、タンパク質ごとに異なることを意味する。更に、分子内消失効果（intramolecular quenching effect）が、検体（例えば、タンパク質）依存の（蛍光）信号に加えられる。染色時に測定された信号は、どのアプタマ結合されたタンパク質に対しても同じであり、表面濃度（適用範囲）の相關的要素（function, 関数）のみであることが非常に望まれるであろう。このことは、ただ1つのナノサイズの粒子が1つのタンパク質に結合する場合に可能である。従って、汎用（表面）較正は、ただ1つの粒子が1つの検体に結合するように適切なサイズの粒子による染色反応を実施することによって、得られることができ。粒子のサイズは、結合時に他の粒子が上記の検体に結合するのを妨げるものの、表面上の他の結合された検体分子に結合するのを妨げないように、作製されるべきである。粒子の好ましい直径サイズは、1nmから100nmの間にあり、好ましくは、3nm乃至25nmの間にある。粒子の実施例は、発光量子ドット、強誘電性粒子、超常磁性粒子、Eビーズ及び金コロイドである。

10

20

30

40

【0027】

その場合、表面結合されたターゲット分子は、例えば、或るターゲットに対するアプタマの平衡親和定数（ K_a 又は K_d ）と、アプタマ修飾された表面のタンパク質吸着を説明する（ラングミュア吸着等温線のような）表面結合モデルと、を使用して、未だ知られていない濃度に関連づけられることができる。

【0028】

この較正の同じ方法は、免疫サンドイッチアッセイ（immuno-sandwich assay）に適用されることができる。たった1つの粒子が二次抗体に結合することを可能にするような特定の化学結合は、例えば、糖の化学結合（sugar linking chemistry, 糖鎖）の一般の方法を使用して抗体の糖類を介して、達成されることができる。

【0029】

最後に、ナノ粒子は、検体を検出するためのアッセイの一部として販売されることができる。これらのナノ粒子は、例えば、バイオチップ又は検出用の他の材料と化合されることができる。従って、本発明は、更に、

a) 検体と共有結合を形成することができる基を有する、磁気活性ナノ粒子、電気活性ナノ粒子又は任意の活性ナノ粒子と、

b) 固体支持体上に任意に固定化され得るナノ粒子に反応しないキャプチャープローブと、

c) キャプチャープローブを固定化するための任意の固体支持体と、
を有するパツツからなるキットにも関する。

【0030】

本発明は、以下の非制限的な実施例によって示される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明の好ましい実施形態によれば、発光性無機粒子が、CdS、CdTe、CdSe、ZnS、ZnSe、PbS、HgS、HgTe、GaAs、GaP、InAs、InP及びZnOであり、これらの粒子は、円形、ディスク様又はロッド様の形状である。このような粒子の表面を機能化するために、チオール、カルボキシル酸、アミンのような基、又はホスフィン（phosphine）基が使用されることができる。

【0032】

コロイド発光性CdSe/ZnSコアシェルナノ結晶は、D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Ko

50

rnowski, M. Haase 及び H. Weller 著の Nano Letters 誌 (2001 年発行)、第 1 巻、207 ページに説明された二段階アプローチによって合成された。簡単に説明すると、第 1 の段階では、270 ~ 310 で、ヘキサデシルアミン - トリオクチルホスフィン酸化物 - トリオクチルホスフィン (HDA - TOPO - TOP) の安定している混合物中において、ジメチルカドミウムをトリオクチルfosfin 酸化物 (trioctyl phosphine selenide) と反応させることによって、単分散 CdSe ナノ結晶が用意された。180 ~ 220 で、HDA - TOPO - TOP 混合物中の CdSe コアの溶液に、ジメチル亜鉛及びビストリメチルシリルスルフィド (bis-trimethyl silylsulfide) (それぞれ、亜鉛及び硫黄前駆体) をゆっくり添加することによって、コロイド状の CdSe コア付近に ZnS シェルが成長した。この混合物は、沈殿 (precipitation, 析出) により精製され、乾燥され、非極性溶液にて再び溶解されて、量子ドット (QD) 溶液をもたらす。その結果として得られる CdSe / ZnS コアシェルナノ結晶は、クロロホルム又はトルエンのような非極性溶媒に可溶性であった。

【0033】

粒子の表面は、例えば、メルカプトプロピオン酸 (mercaptopropionic acid) 又はアセチルシステイン (acetyl cysteine) を用いて修飾された。量子ドット (QD's) の表面を修飾するために、これらの QDs は、標準のキャッピング (capping, キャップ形成) 交換工程にかけられた。チオール含有分子の超過量が、クロロホルムの QD 溶液に添加され、数時間 50 で攪拌された。修飾された QD は、冷却されて又はメタノールの添加によって、ゆっくり沈殿する傾向がある。QD 表面に結合されなかったチオール含有分子を取り除くために、溶解ステップ及び沈殿ステップが、数回繰り返された。その結果として得られる QDs は、水溶液において適度な又は良好な溶解度を示す。QDs の表面のカルボキシル基は、EDC (1-(3-dimethylaminopropyl (ジメチルアミノプロピル))-3-ethylcarbodiimide (エチルカルボジイミド)) 及び NHS (N-hydroxy-succinimide (N-ヒドロキシ - スクシンイミド)) 活性化を用いて活性化されている。

【0034】

コアシェル CdSe / ZnS ナノ結晶は、30 ~ 70 % と同程度に高い室温量子効率をもつ、強いバンド - エッジ光るミネセンスを呈する。発光バンドのスペクトル位置は、CdSe コアのサイズを約 2 nm から 6 nm まで増大させることによって、青色から赤色まで調整可能である (図 2)。CdSe コア付近に成長した細い (約 2 つの単分子層) ZnS エピタキシャルシェルは、粒子安定性及びルミネセンス効率を大幅に改善する。

【0035】

図 2 では、コア - シェル (CdSe コア - ZnS シェル) 構造をもつ量子ドットの発光スペクトルが示される。急なピークをもつ発光スペクトルが、細長いサイズ分布をもつ種々のサイズの量子ドットを用いて得られた。量子ドットのサイズを変更することによって、発光波長が変化することも分かる。

【0036】

図 3 では、固体支持体に結合されるタンパク質へのアミド結合 (amide link) を介して共有結合される、約 6 nm の CdSe コアをもつ CdSe / ZnS / プロピオン酸 (propionic acid) 量子ドットからの発光が、その吸収スペクトルと共に示される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図 1】リガンドアレイ及び E ビード染色のためのアンペロメトリックセンサ設計の一実施例を示す図である。

【図 2】コア - シェル構造をもつ量子ドットの発光スペクトルを示す図である。

【図 3】固体支持体に結合されるタンパク質へのアミド結合を介して共有結合されるコアをもつ量子ドットからの発光を、その吸収スペクトルと共に示す図である。

【図1】

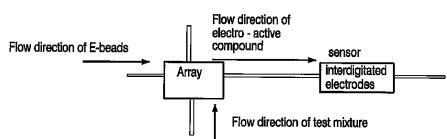


FIG. 1

【図2】

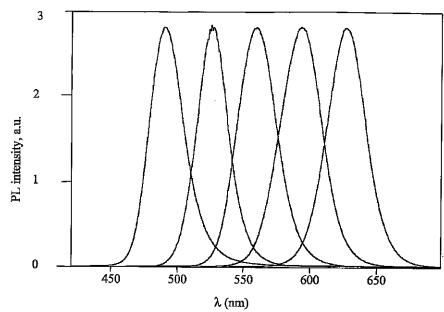


FIG.2

【図3】

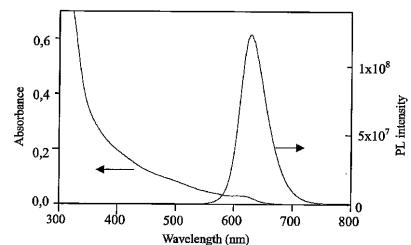


FIG.3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/051698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 GOIN33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 GOIN

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, 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	EP 1 333 280 A (HITACHI SOFTWARE ENG) 6 August 2003 (2003-08-06) the whole document	1-4,8
A		5-7
X	WO 00/27365 A (BIOCRYSTAL LTD) 18 May 2000 (2000-05-18) the whole document	1-4
A		5-7
X	WO 01/52612 A (ARKIS AHMED ; BIO MERIEUX (FR); DELAIR THIERRY (FR); ELAISSARI ABDELHA) 26 July 2001 (2001-07-26) the whole document	1,3,4
A		5-7
X	EP 1 215 199 A (SONY INT EUROP GMBH) 19 June 2002 (2002-06-19) the whole document	1-4
A		5-7
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in 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 document 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

29 November 2004

Date of mailing of the International search report

09/12/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/051698

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/070733 A (LUYKEN JOHANNES R ; HOFMANN FRANZ (DE); SCHULZ THOMAS (DE); LANDGRAF E) 12 September 2002 (2002-09-12) the whole document	1-4
A	US 4 918 004 A (SCHWARTZ ABRAHAM) 17 April 1990 (1990-04-17) example V	5-7
X	US 4 920 059 A (DANEELS GUIDO F T ET AL) 24 April 1990 (1990-04-24)	1,3,9
A	the whole document	5-7
A	ALBERS JOERG ET AL: "Electrical biochip technology: A tool for microarrays and continuous monitoring." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 377, no. 3, 30 August 2003 (2003-08-30), pages 521-527, XP002308122 ISSN: 1618-2642 document published as printed paper on october 2003 but available in the web on 30-08-2003. the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/IB2004/051698

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 1333280	A	06-08-2003	JP	2003227834 A	15-08-2003
			EP	1333280 A1	06-08-2003
			US	2003148361 A1	07-08-2003
WO 0027365	A	18-05-2000	US	6114038 A	05-09-2000
			AU	1616100 A	29-05-2000
			AU	2147000 A	29-05-2000
			EP	1128818 A1	05-09-2001
			WO	0027365 A1	18-05-2000
			WO	0028089 A1	18-05-2000
			US	6221602 B1	24-04-2001
			AU	1911700 A	29-05-2000
			WO	0027436 A1	18-05-2000
			US	6333110 B1	25-12-2001
			US	6309701 B1	30-10-2001
			US	6319607 B1	20-11-2001
			US	6576155 B1	10-06-2003
WO 0152612	A	26-07-2001	FR	2804117 A1	27-07-2001
			AU	3558001 A	31-07-2001
			CA	2412536 A1	26-07-2001
			EP	1248679 A2	16-10-2002
			WO	0152612 A2	26-07-2001
			US	2003175691 A1	18-09-2003
EP 1215199	A	19-06-2002	EP	1215199 A1	19-06-2002
			CN	1357536 A	10-07-2002
			JP	2003026643 A	29-01-2003
			US	2002072069 A1	13-06-2002
WO 02070733	A	12-09-2002	DE	10109777 A1	19-09-2002
			WO	02070733 A1	12-09-2002
US 4918004	A	17-04-1990	US	4857451 A	15-08-1989
			US	4767206 A	30-08-1988
			US	4828984 A	09-05-1989
			US	5380663 A	10-01-1995
			US	5093234 A	03-03-1992
			US	5084394 A	28-01-1992
			US	5314824 A	24-05-1994
			GB	2172104 A , B	10-09-1986
			JP	1953186 C	28-07-1995
			JP	6084969 B	26-10-1994
			JP	61228349 A	11-10-1986
			US	5073498 A	17-12-1991
			US	5089416 A	18-02-1992
			US	4774189 A	27-09-1988
US 4920059	A	24-04-1990	AT	96230 T	15-11-1993
			AU	599304 B2	19-07-1990
			AU	4339785 A	02-01-1986
			CA	1265730 A1	13-02-1990
			DE	3587633 D1	25-11-1993
			DE	3587633 T2	17-02-1994
			EP	0165633 A2	27-12-1985
			JP	1976693 C	17-10-1995
			JP	7006991 B	30-01-1995
			JP	61017958 A	25-01-1986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/IB2004/051698

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4920059 A	US	5279792 A	18-01-1994

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,M,A,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヒクメット リファト エイ エム
オランダ国 5656 アーアー アインドーフェン プロフ ホルストラーン 6

(72)発明者 オルセル ヨウケエ ジー
オランダ国 5656 アーアー アインドーフェン プロフ ホルストラーン 6