

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7676380号
(P7676380)

(45)発行日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(24)登録日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/46
C 0 7 K 14/31 (2006.01)	C 0 7 K 14/31
C 0 7 K 1/16 (2006.01)	C 0 7 K 1/16
請求項の数 10 (全21頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2022-524565(P2022-524565)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	令和2年10月29日(2020.10.29)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2023-500627(P2023-500627 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和5年1月10日(2023.1.10)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(86)国際出願番号	PCT/US2020/057970		・グレンツァーヘルストラツセ 1 2 4
(87)国際公開番号	WO2021/087118	(74)代理人	100118902
(87)国際公開日	令和3年5月6日(2021.5.6)		弁理士 山本 修
審査請求日	令和5年4月24日(2023.4.24)	(74)代理人	100106208
(31)優先権主張番号	62/928,207		弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和1年10月30日(2019.10.30)	(74)代理人	100196508
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 松尾 淳一
		(74)代理人	100196243
			弁理士 運 敬太
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 生物学的ナノポアのアセンブリのための方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つ以上の天然ナノポアタンパク質を含む検出装置を作製する方法であって、

(a) ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質 (M S P) と、第 1 の脂質とを含む水性混合物を形成して、ナノディスク - ナノポアタンパク質複合体のサンプルを生成する工程であって、前記サンプル中の前記ナノディスク - ナノポアタンパク質複合体の集合の各々が天然ナノポアタンパク質を含む工程、

(b) 1 つ以上の開口部を含む固体支持体を提供する工程であって、前記開口部の各々の上に膜が形成され、前記膜が第 2 の脂質を含み、前記膜が前記検出装置内のトランスチャンバからシスチャンバを分離する工程、及び

(c) 前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合に前記 1 つ以上の膜を接触させて、天然ナノポアタンパク質を前記膜の各々に同化させる工程、

を含み、

前記水性混合物が洗浄剤を更に含み、前記洗浄剤の最終濃度が 1 4 m M ± 2 0 % ~ 4 0 m M ± 2 0 % であり、

前記第 1 の脂質が 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P h P C) であり、前記 M S P が M S P 1 D 1 又は M S P 1 D 1 の変異体であり、前記ナノポアタンパク質が - ヘモリシン (- H L) 又は - H L の変異体であり、前記洗浄剤がコール酸塩であり、前記第 2 の脂質が 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 -

ホスホエタノールアミン (DPHP E) であり、

脂質対MSP対ナノポアタンパク質のモル比が $101 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ 又は $120 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ である、

前記方法。

【請求項 2】

前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合に前記 1 つ以上の膜を接触させる工程の前に、前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポアナノディスク複合体の前記集合を前記水性混合物から精製する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合を精製する工程が、サイズ排除クロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィーの一方又は両方を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記固体支持体が複数の開口部を含み、前記複数の開口部の各々の上に膜が形成され、前記膜の各々が前記天然ナノポアタンパク質を含む前記ナノポア - ナノディスク複合体と接触する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の検出装置の使用を含む、ポリマーを配列決定する方法。

【請求項 6】

前記ポリマーが X p a n d o m e r である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

膜内に天然ナノポアタンパク質を形成する方法であって、

(a) ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質 (M S P) と、第 1 の脂質とを含む水性混合物を形成して、ナノディスク - ナノポアタンパク質複合体のサンプルを生成する工程であって、前記ナノディスク - ナノポアタンパク質複合体の集合の各々が天然ナノポアタンパク質を含む工程、

(b) 第 2 の脂質を含む膜を提供する工程、及び

(c) 前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合に前記膜を接触させて、天然ナノポアタンパク質を前記膜に同化させる工程、
を含み、

前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合に前記膜を接触させる工程の前に、前記天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の前記集合を前記水性混合物から精製する工程を更に含む、

前記水性混合物が洗浄剤を更に含む、前記洗浄剤の最終濃度が 14 mM 超 ~ 40 mM であり、

前記第 1 の脂質が 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P h P C) であり、前記 M S P が M S P 1 D 1 又は M S P 1 D 1 の変異体であり、前記ナノポアタンパク質が - ヘモリシン (- H L) 又は - H L の変異体であり、前記洗浄剤がコール酸塩であり、前記第 2 の脂質が 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D P h P E) であり、

脂質対MSP対ナノポアタンパク質のモル比が $101 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ 又は $120 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ である、

前記方法。

【請求項 8】

ナノポア - ナノディスク複合体の前記集合を精製する工程が、サイズ排除クロマトグラフィー及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィーの一方又は両方を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

水性緩衝液中にナノポア - ナノディスク複合体を含む組成物であって、前記ナノポア - ナノディスク複合体が天然ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質 (MSP) と、脂質とを含み、前記水性緩衝液が洗浄剤を含み、

前記天然ナノポアタンパク質が α - ヘモリシン (α - HL) 又は β - HL の変異体であり、前記 MSP が MSP1D1 又は MSP1D1 の変異体であり、前記脂質が 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) であり、前記洗浄剤がコール酸塩であり、

脂質対 MSP 対ナノポアタンパク質のモル比が $101 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ 又は $120 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ であり、コール酸塩の濃度が 14 mM 超 $\sim 40 \text{ mM}$ である、

前記組成物。

【請求項 10】

ナノポア - ナノディスク複合体を含む凍結乾燥粉末を含む組成物であって、前記ナノポア - ナノディスク複合体が、天然ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質 (MSP) と、脂質とを含み、

前記天然ナノポアタンパク質が α - ヘモリシン (α - HL) 又は β - HL の変異体であり、前記 MSP が MSP1D1 又は MSP1D1 の変異体であり、前記脂質が 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) であり、

脂質対 MSP 対ナノポアタンパク質のモル比が $101 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ 又は $120 \pm 20\% : 6 \pm 20\% : 1 \pm 20\%$ である、

前記組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2019年10月30日に出願された米国仮特許出願第62/928,207号の米国特許法第119条(e)に基づく利益を主張し、本仮出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

本発明は、概して、タンパク質ベースのナノポアセンサを作製するための新たな方法及び組成物に関し、より具体的には、センサシステムの脂質膜構成要素にナノポアを送達するための担体として使用される、脂質ナノディスク内で天然ナノポアタンパク質をアセンブリする方法、及び特にナノポアベースの核酸配列決定方法におけるその利用のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

過去20年間で、ナノポアセンサは強力なツールとして浮上し、科学及びバイオテクノロジーに大きな影響を及ぼしてきた。ナノポア技術は、一般に、その材料によって生物学的ナノポアと固体ナノポアとに分けられる。固体状態のナノポアは、従来、Si、SiN、又はSiO₂などのシリコン又はグラフェン系膜におけるイオン又は電子ビームスケルプティングのような半導体又はマイクロ流体技術を使用してナノスケープポアを穿孔することによって製造される。しかしながら、DNA配列決定、小分子検知、薬物スクリーニング、分子ふるい分け、及び生体分子分析などのほとんどのナノポア用途は、固体状態のポアでは達成できない高精度の幾何学的形状、感度、及び再現性を必要とする。

【0004】

ナノポアの最も重要で最も非常に望ましい用途は、DNA配列決定である。しかしながら、ナノポアを通るDNAの非常に速い移行速度に関連する主な問題(数ヌクレオチドが数マイクロ秒でナノポアを通過する)により、各塩基のデータ点が少なくなり、データの更なる分析が妨げられる。そのような問題に対処するため、Stratos Genomicsは、生化学的プロセスを使用してDNAの配列を「Xpandomer」と呼ばれ

10

20

30

40

50

る測定可能なポリマー上に転写する、拡張による配列決定 (Sequencing by Expansion (SBX)) と呼ばれる方法を開発した (例えば、Kokoris et al.、米国特許第 7,939,259 号、'High Throughput Nucleic Acid Sequencing by Expansion' を参照されたい)。転写された配列は、約 10 nm 離れた高シグナル対ノイズレポーターにおいて Xpandomer 骨格に沿ってコード化され、高シグナル対ノイズ、高分化応答のために設計される。これらの違いは、天然の DNA と比較して、Xpandomer の配列リード効率及び精度の著しい性能向上を提供する。Xpandomer は、いくつかの次世代 DNA 配列決定検出技術を可能にすることができ、ナノポア配列決定によく適している。

【0005】

-ヘモリシン (-HL) は、主にその小さい内径及び構造再現性のために、単一分子分析に最も広く使用されている生物学的ナノポアである。-HL は、脂質二重層膜中で自己アセンブルして、直径 2.6 nm の前庭部及び直径 1.5 nm の限界開口 (ポアの最も狭い点) を有する膜貫通七量体孔を形成する単量体ポリペプチドである。-HL ナノポアの限界開口は、一本鎖 DNA と同程度の寸法を有する線状分子が通過すること、又は「移行する」ことを可能にするが、約 2.0 nm より大きい直径を有する分子、例えば二本鎖 DNA は、移行から除外される。DNA 配列決定におけるその利点にもかかわらず、-HL (及び他のオリゴマー膜貫通タンパク質ナノポア) は、例えば、水溶液中の天然オリゴマーの安定性の低下及び脂質膜中の天然タンパク質の不完全なアセンブリのために、依然として固有の構造的制限を有し、生物学的ナノポアセンサを作製するための改善された方法及び組成物の必要性を生じさせる。

【0006】

本発明は、これらのニーズを満たし、以下で説明するように、更なる関連する改善の利点を提供する。

【0007】

背景技術のセクションで説明した主題の全てが必ずしも先行技術ではなく、単に背景技術のセクションにおける説明の結果として先行技術であると仮定すべきではない。これらの道筋に沿って、背景技術のセクションで説明されているか、又はそのような主題に関連する先行技術の問題の認識は、先行技術であると明示的に述べられていない限り、先行技術として扱われるべきではない。代わりに、背景技術のセクションにおける任意の主題の議論は、それ自体もまた発明的であり得る特定の問題に対する発明者のアプローチの一部として扱われるべきである。

【発明の概要】

【0008】

1 つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の説明に示されている。他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0009】

簡潔には、本開示は、ナノポアベースのセンサの改善された製造のための方法及び組成物を提供する。特定の実施形態では、方法及び組成物は、天然ナノポア構造の同化が改善された生物学的ナノポアベースのセンサの製造を可能にする。

【0010】

一態様では、本発明は、1 つ以上の天然ナノポアタンパク質を含む検出装置を作製する方法であって、(a) ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質 (MSP) と、第 1 の脂質とを含む水性混合物を形成して、ナノディスク-ナノポアタンパク質複合体のサンプルを生成する工程であって、サンプル中のナノディスクナノポアタンパク質複合体の集合がそれぞれ、天然ナノポアタンパク質を含む、工程、(b) 1 つ以上の開口を含む固体支持体を提供する工程であって、開口の各々の上に膜が形成され、膜が第 2 の脂質を含み、膜が検出装置内のトランスチャンバからシスチャンバを分離する、工程、及び (c) 1 つ以上の膜を、天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体の集合と接触させて、天然ナノポアタンパク質を膜の各々に同化させる工程、を含む方法を提供する。一

10

20

30

40

50

実施形態では、方法は、1つ以上の膜を天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体の集合と接触させる工程の前に、天然ナノポアタンパク質を含むナノポアナノディスク複合体の集合を水性混合物から精製する工程を更に含む。更なる実施形態では、天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体の集合を精製する工程が、サイズ排除クロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィーの一方又は両方を含む。別の実施形態では、水性混合物が洗浄剤を更に含み、洗浄剤の最終濃度が約14 mM～約40 mMである。更なる実施形態では、第1の脂質が1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPhPC)であり、MSPがMSP1D1又はその変異体であり、ナノポアタンパク質が-ヘモリシン(-HL)又はその変異体であり、洗浄剤がコール酸塩であり、第2の脂質が1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPhPE)である。なお更なる実施形態では、脂質対MSP対ナノポアタンパク質のモル比が約101:6:1又は約120:6:1である。別の実施形態では、固体支持体が複数の開口部を含み、複数の開口部の各々の上に膜が形成され、膜の各々が天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体と接触する。

10

【0011】

別の態様では、本発明は、上記の検出装置のいずれかの使用を含む、ポリマーを配列決定する方法を提供する。特定の実施形態では、ポリマーは、Xpandomerである。

【0012】

別の態様では、本発明は、膜中に天然ナノポアタンパク質を形成する方法であって、(a)ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質(MSP)と、第1の脂質とを含む水性混合物を形成して、ナノディスク-ナノポアタンパク質複合体のサンプルを生成する工程であって、ナノディスクナノポアタンパク質複合体の集合がそれぞれ天然ナノポアタンパク質を含む、工程、(b)第2の脂質を含む膜を提供する工程、及び(c)膜を天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体の集合と接触させて、膜の天然ナノポアタンパク質を同化させる工程を含む、方法を提供する。一実施形態では、方法は、膜を天然ナノポアタンパク質を含むナノポア-ナノディスク複合体の集合と接触させる工程の前に、天然ナノポアタンパク質を含むナノポアナノディスク複合体の集合を水性混合物から精製する工程を更に含む。特定の実施形態では、ナノポア-ナノディスク複合体の集合を精製する工程が、サイズ排除クロマトグラフィー及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィーの一方又は両方を含む。別の実施形態では、水性混合物が洗浄剤を更に含み、洗浄剤の最終濃度が14 mM超～40 mMである。更なる実施形態では、第1の脂質が1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPhPC)であり、MSPがMSP1D1又はその変異体であり、ナノポアタンパク質が-ヘモリシン(-HL)又はその変異体であり、洗浄剤がコール酸塩であり、第2の脂質が1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPhPE)である。更に別の実施形態では、脂質対MSP対ナノポアタンパク質のモル比が約101:6:1又は約120:6:1である。

20

30

【0013】

別の態様では、本発明は、水性緩衝液中にナノポア-ナノディスク複合体を含む組成物であって、ナノポア-ナノディスク複合体が天然ナノポアタンパク質と、膜足場タンパク質(MSP)と、脂質とを含み、水性緩衝液が洗浄剤を含む、組成物を提供する。一実施形態では、天然ナノポアタンパク質が-ヘモリシン(-HL)又はその変異体であり、MSPがMSP1D1又はその変異体であり、脂質が1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPhPC)であり、洗浄剤がコール酸塩である。更なる実施形態では、脂質対MSP対ナノポアタンパク質のモル比が約101:6:1又は約120:6:1であり、コール酸塩の濃度が14 mM超～40 mMである。

40

【0014】

別の態様では、本発明は、ナノポア-ナノディスク複合体を含む凍結乾燥粉末を含む組成物であって、ナノポア-ナノディスク複合体が、天然ナノポアタンパク質と、膜足場タ

50

ンパク質 (MSP) と、脂質とを含む、組成物を提供する。一実施形態では、天然ナノポアタンパク質が -ヘモリシン (-HL) 又はその変異体であり、MSP が MSP1D1 又はその変異体であり、脂質が 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPHPC) である。更なる実施形態では、脂質対 MSP 対ナノポアタンパク質のモル比が約 101 : 6 : 1 又は約 120 : 6 : 1 である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】生物学的ナノポアに基づく検出システムを作製する方法の一実施形態を示すフローチャートである。

【0016】

【図2A】図2A、図2B、図2C、及び図2Dは、一般化されたXNTPの主要な特徴及び拡張による配列決定(SBX)におけるそれらの使用を示す要約された概略図である。

【図2B】図2A、図2B、図2C、及び図2Dは、一般化されたXNTPの主要な特徴及び拡張による配列決定(SBX)におけるそれらの使用を示す要約された概略図である。

【図2C】図2A、図2B、図2C、及び図2Dは、一般化されたXNTPの主要な特徴及び拡張による配列決定(SBX)におけるそれらの使用を示す要約された概略図である。

【図2D】図2A、図2B、図2C、及び図2Dは、一般化されたXNTPの主要な特徴及び拡張による配列決定(SBX)におけるそれらの使用を示す要約された概略図である。

【0017】

【図3】経時的な溶出サンプルのA₂₈₀を示すSECTレースである。

【0018】

【図4】ナノポア精製プロセスの様々な段階から採取されたタンパク質のサンプルを示すゲルである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明は、本発明の好ましい実施形態及び本明細書に含まれる実施例の以下の詳細な説明を参照することによってより容易に理解され得る。別段の説明がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当技術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。

【0020】

核酸配列決定技術において使用が見出されている生物学的ナノポアタンパク質には、個々のポリペプチドサブユニットが膜内で自己アセンブルし、それらの天然の高次構造にオリゴマー化すると細孔を形成する天然の膜貫通タンパク質に基づくものが含まれる。従来の生物学的ナノポアセンサ、例えばHLナノポアは、典型的には、可溶化されたタンパク質の水溶液を検出器システムのミクロンサイズの膜構成要素に適用することによってアセンブルされる。機能性ナノポアを形成するためには、可溶性タンパク質サブユニットが膜に挿入され、正しく自己アセンブルして天然の高次構造を形成しなければならない。脂質二重層中の天然の膜タンパク質の再構成は、例えば、水溶液中のタンパク質の低い溶解度及び安定性、並びに脂質基質中の適切な天然構造を効率的かつ一貫してアセンブリすることが困難であることに起因して、いくつかの技術的課題を呈する。本開示は、ナノポアセンサを製造するための方法及び組成物を提供することによってこれらの課題に対処し、膜内でナノポアを同化させる前に天然オリゴマーナノポア構造体を脂質ナノディスク内でアセンブルする。天然ナノポアタンパク質(例えば、適切なサイズの複合体及び/又は異種検出「タグ」の組み込み)を組み込んだナノディスクを、任意に、混合物から精製して、天然ナノポアのより均一なサンプルを得ることができる。次いで、精製されたナノポア-ナノディスク複合体を脂質二重層膜に適用して、天然のタンパク質構造を膜に同化させて機能的ナノポアセンサ又は検出器を形成することができる。本発明によって提供される更なる利点は、天然ナノポアタンパク質の構造がナノディスク内で形成されたときに大きく安定化され、したがって、例えば天然ナノポアタンパク質の貯蔵及び輸送のための改善された組成物を提供することである。

10

20

30

40

50

【0021】

バイオマーカーは、当該技術分野において周知である。いくつかの実施形態では、ナノディスクは、膜足場タンパク質(MSP)と呼ばれる2つの周囲の両親媒性らせんタンパク質「ベルト」によって安定化され、水溶液中で可溶性になるナノスケール円盤状リン脂質二重層である。ナノディスクは、目的の膜タンパク質(MP)を二重層に組み込んでMPの構造及び活性を保存するためのビヒクルとして使用することができ、MPの生物物理学的、酵素的又は構造的調査のために伝統的に使用されてきた(総説については、例えば Bayburt and Sligar, FEBS Lett.; 584(9): 172-1727(2010)を参照されたい)。このアプローチでは、膜タンパク質標的及び/又はリン脂質を、包囲する両親媒性らせんMSPの存在下で洗浄剤で一時的に可溶化する。透析又は疎水性ビーズへの吸着によって洗浄剤が除去されると、標的MPは同時にリン脂質とアSEMBルして、MSPの長さによって制御されるサイズを有する円盤状二重層になる。したがって、得られたナノディスクは、膜タンパク質を溶液中に保持し、組み込まれた標的の安定性及び機能的要件を提供し、標的膜タンパク質のオリゴマー状態の制御も可能にする天然様リン脂質二重層環境を提供する。ナノディスクは堅牢であることが知られており、組み込まれたMPと共に凍結又は凍結乾燥することができる。本発明者らは、本明細書で更に検討するように、ナノディスクがナノポア送達及び貯蔵ビヒクルとしていくつかの利点を提供することを見出した。

10

【0022】

本明細書で使用される場合、「膜足場タンパク質」という用語は、二重層周辺部に結合することによってナノディスク内のリン脂質二重層を安定化することができるタンパク質を指す。一般に、膜足場タンパク質は、リン脂質二重層の非極性内部と会合することができる疎水性面と、水性緩衝液などの極性溶媒と有利に相互作用する親水性面とを有する。膜足場タンパク質配列は、天然に存在し得るか、又は組換え技術を使用して操作され得るか、又はde novoで構築され得る。天然に存在する膜足場タンパク質としては、リポタンパク質の成分であるアポリタンパク質が挙げられる。既知のクラスのアポリタンパク質としては、A(例えば、アポA-I及びアポA-IIを含む)、B、C、D、E及びHが挙げられる。天然に存在しない膜足場タンパク質としては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,691,414号に記載されているMSP1及びMSP2が挙げられる。例示的な市販の天然に存在しないMSPは、例えばSigmaから入手可能なMSP1D1である。膜足場タンパク質は、全長タンパク質、又はタンパク質の切断型であり得る。膜足場タンパク質は、イオンチャンネル及び他の膜貫通受容体、ポリン、特定の細胞接着分子、並びにNADHデヒドロゲナーゼ及びATPシンターゼなどの電子輸送タンパク質を含むがこれらに限定されない様々な機能性膜タンパク質を包含することを意図しない。

20

30

【0023】

本明細書で使用される場合、「ナノポアタンパク質」という用語は、適切な高次構造が形成されたときに膜を貫通する開口部を作り出すことができるポリペプチドサブユニット及びサブユニットの多量体を指す。ナノポアタンパク質は、多量体ナノポアタンパク質の単一ポリペプチドサブユニット又は単一ポリペプチドサブユニットの異なるオリゴマー形態を指す場合がある。「ナノポアタンパク質の混合物」は、ナノポアタンパク質の単一形態及び/又はオリゴマー形態の異種の組み合わせを含有し得る溶液を指す。「天然ナノポアタンパク質」とは、膜内に機能性ナノポアを形成することができるサブユニットオリゴマー化の天然の高次状態を指す。例示的なナノポアタンパク質、すなわち生物学的ナノポアとしては、ヘモリシン、マイコバクテリウム・スメグマティス(Mycobacterium smegmatis)ポリンA(MspA)、エアロリシン、phi29、グラミシジンA、マルトポリン、OmpG、OmpF、OmpC、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholerae)細胞溶解素、PhoE、Tsx及びF-pilusが挙げられる。

40

【0024】

50

好ましいナノポアタンパク質は α -ヘモリシン (α -HL) である。 α -HLは、細菌スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) によって放出される主要な細胞毒性物質であり、ベータ-バレル毒素ファミリーを形成するポアの最初に同定されたメンバーである。この毒素は、大部分が、わずか約10%の α -ヘリックスを有するベータ-シート (68%) からなる。*S. アウレウス* (*S. aureus*) 染色体上の *hla* 遺伝子は、細胞膜中に七量体オリゴマーを形成して完全なベータ-バレルポアを形成する293残基タンパク質モノマーをコードする。したがって、天然の α -HLナノポアタンパク質は、7つの α -HLタンパク質モノマーのアセンブリ、すなわちオリゴマーである。

【0025】

従来 of 生物学的突然変異誘発を使用して、本明細書に記載の組成物又は方法で使用するためにナノポア-ナノディスク複合体の任意のタンパク質成分を最適化することができる。いくつかの実施形態では、ナノディスク-ナノポア複合体を単離するプロセスは、MSP又はナノポアタンパク質のいずれかに連結されたポリヒスチジンアフィニティタグ (すなわち、「His-tag」) から利益を得ることができ、これは固定化金属アフィニティカラム (例えば、ニッケルアフィニティカラム) での複合体の精製に使用される。SDS-PAGEゲルによって実証されるように、末端6xHisタグを有する α -HL又はMSPを発現させ、再構成し、精製することができる。精製されたHisタグ付きタンパク質の生物学的機能性は、非タグ付きタンパク質の生物学的機能性と同様であると予想される。精製目的のために他の変異を導入することもできる。例えば、システイン部分を突然変異誘発によってタンパク質配列に導入し、アフィニティタグのチオール反応性部分 (例えば、マレイミド又はヨードアセトアミド) への化学的複合体化に使用することができる。例示的なアフィニティタグとしては、ビオチン (固相ストレプトアビジンを通じて精製を媒介することができる)、DNA及びRNA (相補的配列を有する固相核酸を通じて精製を媒介することができる)、エピトープ (固相抗体又は抗体断片を通じて精製を媒介することができる)、又は他のリガンド (それらのリガンドの固相受容体を通じて精製を媒介することができる) が挙げられる。

【0026】

タンパク質工学及び突然変異誘発技術を使用して、生物学的ポアの構造を変更し、特定の用途のためにそれらの特性を調整することができる。特定の実施形態では、 α -溶血素を変異させて、安定性が改善された及び/又は表面電荷が変化した変異体を、例えばポアの内部で生成して、目的的分析物の検出を最適化することができる。適切な α -HL変異体としては、公開されたPCT出願である国際公開第2016069806号、国際公開第2018002125号及び国際公開第2019166458号、並びに米国特許第15,274,770号及び同第10,351,908号に開示されているものが挙げられ、これらは参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、適切な α -HL変異体は、以下の変異の1つ以上を含み得る: A1K/R、D2N、S3K、D4K/N、K8R、T12K/R、N17K/R、D24A、V26D、H35D/E/G/L、K37S、N47K、E70K、S99K、Y101D、S106K、T109K、E111N/S、M113A/S、D127G、D128G/K、T129G、T131G、L135I、T145S、K147N/S、V149K、P151K、T233R、E287R、及びM298A。

【0027】

本明細書で使用される場合、「膜」は、センサ又は検出システム又は装置の構成要素であり、ナノポア-ナノディスク複合体の構成要素ではない。膜は、2つの区画又はリザーバ (例えば、シスチャンバ及びトランスチャンバ) を分離し、これらの間のイオン及び他の分子の自由拡散を防止する薄膜である。適切な膜は、両親媒性分子、すなわち親水性及び親油性の両方の特性を有する分子で形成される両親媒性層である。そのような両親媒性分子は、リン脂質などの天然に存在するもの、又は合成のもののもいづれであってもよい。例示的な両親媒性物質としては、種々のリン脂質、1,2-ジフィタノイル-sn-グリ

10

20

30

40

50

セロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPHPE)、パルミトイル - オレオイル - ホスファチジルコリン (POPC)、ジオレオイル - ホスファチジメチルエステル (DOPME)、1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン (DPHPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ホスファチジルコリン、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジリノシトール、ホスファチジルグリセロール及びスフィンゴミエリン等が挙げられる。例示的な合成両親媒性分子としては、ポリ(n - ブチルメタクリレート - ホスホリルコリン)、ポリ(エステルアミド) - ホスホリルコリン、ポリラクチド - ホスホリルコリン、ポリエチレングリコール - ポリ(カプロラクトン) - ジ - 又はトリ - ブロック、ポリエチレングリコール - ポリラクチド - ジ - 又はトリ - ブロック及びポリエチレングリコール -

10

【0028】

好ましくは、膜は脂質二重層である。脂質二重層は細胞膜のモデルであり、実験目的で広く使用されている。膜はまた、固体膜、すなわち、1つ以上の開口が形成された固体材料から調製された層であってもよい。膜は、支持基材上のコーティング又はフィルムなどの層であってもよく、又は自立型要素であってもよい。薄膜固体膜に用いられる材料としては、窒化ケイ素、酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ケイ素などが挙げられる。

【0029】

図1は、本発明による検出装置のナノポアセンサ構成要素を形成するための例示的な方法の3つの基本工程を要約したものであり、各工程の詳細は、本明細書で更に説明される。工程1では、ナノポアタンパク質、適切な脂質、及び適切な膜足場タンパク質の水性混合物を形成して、ナノポア - ナノディスク複合体のサンプルを提供する。一実施形態では、ナノポアはHLであり、適切な脂質はDPHPCであり、膜足場タンパク質はMSPD1である。このサンプルは、それぞれが天然ナノポアタンパク質を含有するナノポア - ナノディスク複合体の集合を含むが、サンプル中のすべての複合体が、適切にアセンブリされた天然ナノポアタンパク質を必ずしも含むわけではないため、特定の実施形態では、サンプルは「異種サンプル」として記載され得、1つ以上の精製工程を実施して、目的のナノポア - ナノディスク複合体が濃縮されたサンプルを提供することが有利であり得る。工程2A及び2Bにおいて、適切な物理的特性を有するナノポア - ナノディスク複合体は、任意に水性混合物から単離又は精製され得る。この実施形態では、2つの逐次精製工程即ち、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC、工程2A)及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC、工程2B)を行う。精製工程は、天然ナノポアタンパク質を含むナノポア - ナノディスク複合体の集合を濃縮する。当該技術分野で既知の任意の適切な精製プロトコルを本明細書に記載の方法に従って使用することができることを理解されたい。工程3において、精製されたナノポア - ナノディスク複合体を検出細胞の脂質二重層成分、すなわち膜に適用して、天然ナノポアタンパク質の膜への同化を可能にして、機能的ナノポアセンサを形成する。有利には、この方法論によれば、天然のオリゴマータンパク質が濃縮されたサンプルが膜に適用されるため、機能的センサを形成する効率が向上する。対照的に、従来技術の方法論は、天然の高次構造を形成するためにタンパク質サブユニットの正しい膜内自己アセンブリを必要とし、これは、検出システムの機能性を損なう可能性がある効率が低くて潜在的にエラーを起こしやすいプロセスである。

20

30

40

【0030】

特定の実施形態では、ナノポア - ナノディスク複合体は、例えば、膜足場タンパク質(MSP)によって安定化された直径7 ~ 16 nmの脂質二重層ディスクであり得る。いくつかの実施形態では、MSPは、市販のMSP1D1タンパク質などのapoA-Iの適切な誘導体である。両親媒性ペプチドなどの他のタイプの両親媒性ナノディスク「ベルト」が本発明によって企図される。ナノポア - ナノディスク複合体は、7 nm未満(例えば、直径6 nm未満、5 nm、4 nm、2 nm以下)又は直径16 nm超(例えば、直径が18 nm超、20 nm、又は25 nm以上)を有することができることが理解されよう。典型的には、本明細書に記載の方法又は組成物で使用される脂質ディスクの面積は、約5

50

0,000 nm²以下、又は場合によっては約10,000 nm²以下、又は時には約1,000 nm²以下、又は更に他の時間では約500 nm²以下である。ナノポア-ナノディスク複合体は、必ずしもそうである必要はないが、円形領域を占めることができる。特定の条件では、ナノポア-ナノディスク複合体は、ナノディスクの水性ルーメンが存在しないために小胞又はリポソームと区別することができ、ナノディスク内に二重層が存在するためにミセルと区別することができる。ナノポア-ナノディスク複合体は、他の材料からも作製され得ることが理解されよう。例えば、ナノディスクを、非脂質膜から形成することができる。当業者は、ナノディスクの最適な物理的特性、例えば、標的タンパク質及び標的タンパク質が組み込まれる系の他の成分の物理的特性が、目的の特定の用途(複数次可)によって決定されることを理解するであろう。例えば、ナノポアタンパク質を組み込んだナノディスクは、ナノポア-ナノディスクアセンブリが脂質二重層に適用される場合、天然タンパク質の膜溶解度及び膜貫通孔構造を保存するのに適したサイズを有しなくてはならない。ナノディスクがDPhPC、MSP1D1及びHLとアセンブルしている特定の実施形態では、複合体は直径約9.7 nm及び厚さ約4.6~5.6 nmであると予想される。

10

【0031】

本明細書に記載されるように、脂質ナノディスクは、2つの平行なベルト状MSPに囲まれた脂質分子の二重層で構成され得、MSPの両親媒性ヘリックスは、脂質ディスクの縁部の疎水性脂肪酸を安定化する。特に有用な脂質ナノディスク並びにそれらの製造のための組成物及び方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,083,958号及び第7,662,410号に記載されている。本発明の一定の実施形態では、ナノディスクの形成に有用な脂質として、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPhPC)及び1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)が挙げられる。

20

【0032】

特定の実施形態では、脂質ナノディスクは、MSPを洗浄剤安定化リン脂質と混合することによって調製され得る。ナノディスクの自己アセンブリは、本明細書に記載されるように、混合物からの洗浄剤の除去中に起こる。MSPの存在は、脂質ナノディスクの形状及びサイズを制限し、洗浄剤を含まない水溶液中で狭いサイズ分布(+/-3%)、優れた再現性及び並外れた安定性を提供することが実証された。MSP対洗浄剤の比は、ナノディスクの所望のサイズ及び特性を達成するように選択することができる。例えば、MSPの構造単位の数は、参照により本明細書に組み込まれるDenisov et al., J. Am. Chem. Soc. 126, 3477-3487 (2004)に記載されているように、ナノディスク直径を9.8 nm~12.9 nmに調整することを可能にするように変更することができる。膜タンパク質をナノディスクに組み込むための例示的な方法は、Raschle et al., J. Am. Chem. Soc. 131, 17777-17779 (2009)に記載されている。同様の方法を使用して、HL、MspA、エアロリジンなどのタンパク質ナノポアを脂質ナノディスクに挿入することができる。いくつかの実施形態では、ナノポア-ナノディスク複合体は、20 mMのトリス、pH 7.4、0.5 MのEDTA、100 mMのNaCl及び14 mM~40 mMのコール酸塩で構成される水性緩衝液中で形成される。特定の実施形態では、緩衝液は19 mMのコール酸塩を含む。いくつかの実施形態では、DPhPC脂質を、50 mMのDPhPC、20 mMのTris、pH 7.4及び100 mMのコール酸ナトリウムを含有する溶液中で水性混合物に添加する。いくつかの実施形態では、ナノディスクアセンブリ反応におけるコール酸塩の最終濃度は、約14 mMより高く、具体的な一実施形態では、コール酸塩の最終濃度は約19 mMである。

30

40

【0033】

特定の実施形態では、ナノポア-ナノディスク複合体は、膜足場タンパク質(MSP)、洗浄剤に可溶化されたリン脂質(例えば、DPhPC)、及びナノポアタンパク質の混合物で形成される。混合物中では、MSPは、洗浄剤に可溶化されたリン脂質と自己アセ

50

ンプルして、 α -HL ナノポアタンパク質を包埋するナノディスクを形成する。自己アセンブリは、例えば、Bio-Beads（登録商標）（Bio-Rad、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用して、洗浄剤が混合物から除去されるときに起こる。いくつかの実施形態では、脂質に対するナノポアタンパク質対 MSP タンパク質のモル比は、（約 0.5 ~ 約 5）~（約 1 ~ 約 15）~（約 50 ~ 約 200）となる。最適な比は経験的に決定され得、目的の複合体の特定のタンパク質及び脂質成分、並びにナノディスク複合体を形成する特定の方法に依存する。例示的な一実施形態では、 α -HL タンパク質対 MSP 1 D 1 タンパク質対 DPhPC 脂質のモル比は、約 1 対 6 対 120（すなわち、1 : 6 : 120）である。別の実施形態では、 α -HL タンパク質対 MSP 1 D 1 タンパク質対 DPhPC 脂質のモル比は、約 1 : 6 : 101 である。

10

【0034】

天然ナノポアタンパク質を含有するナノポア-ナノディスク複合体の集合は、当技術分野で周知の従来のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって混合物から精製することができる。目的のナノポア-ナノディスク複合体のサイズは、カラム及びクロマトグラフィープロトコルの特性及び詳細を決定するであろう。一実施形態では、約 10,000 ~ 600,000 の M_r を有する錯体を精製するように設計されたカラムを使用して、目的のナノポア-ナノディスク複合体を収集する。当該技術分野で公知の方法（例えば、ゲル電気泳動及びウエスタンブロッティング）を使用して、適切な画分が SEC カラム溶出液から保持されていることを確認することができる。特定の実施形態では、天然ナノポアタンパク質を含有するナノポア-ナノディスク複合体を更に濃縮するために、追加の精製工程が用いられる。例えば、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（例えば、ニッケル系親和性マトリックス）を使用して、MSP 又はナノポアタンパク質のいずれかがポリヒスチジンアフィニータグを発現するように操作されている複合体を特異的に保持することができる。そのような方法論は、当該技術分野において十分に記載されている。

20

【0035】

本明細書に記載のナノポア-ナノディスク複合体は、水性緩衝液中での改善された安定性を示し、例えば貯蔵及び輸送のために凍結乾燥させ、例えばナノポアセンサ又は検出システムの形成に使用するために必要に応じて再構成することもできる。本明細書で使用される場合、「緩衝液」という用語は、溶液の pH をほぼ一定の値に維持することができる水溶液を指す。緩衝剤は、少量の酸又は塩基の添加後に pH が実質的に変化しないように、弱酸及びその共役塩基を含むことによってこれを達成する。代表的な緩衝剤としては、クエン酸、酢酸、リン酸二カリウム（ K_2HPO_4 ）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸（CHES）及びホウ酸塩が挙げられる。一般的に使用される緩衝剤としては、TAPS、ピシン、トリス、トリシン、TAPSO、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸塩、SSC、MES 及びコハク酸が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ナノポア-ナノディスク複合体を、4 の水性緩衝液中に保存することができる。

30

【0036】

本明細書に記載のナノポア-ナノディスク複合体は、組成物の成分であり得る。成分は、例えば、乾燥させてもよく（例えば、粉末）、又は安定な緩衝液（例えば、化学的に安定化され、熱的に安定化される）中で乾燥させてもよい。乾燥成分は、例えば、凍結乾燥、真空及び遠心補助乾燥及び/又は周囲乾燥によって調製することができる。様々な実施形態では、ナノポア-ナノディスク複合体を含む組成物は、単一の容器内で凍結乾燥形態である。他の実施形態では、組成物は、4 で保存した場合に安定なナノポア-ナノディスク複合体を含む水溶液である。

40

【0037】

本発明による製剤に関連して本明細書で使用される場合、「凍結乾燥する」という用語は、組成物が当該技術分野で公知の凍結乾燥方法によって安定化される方法を示す。溶媒（例えば水）は、真空下での昇華及び高温での残留水の離脱後の凍結によって除去される

50

。医薬分野では、凍結乾燥組成物は、通常、約 0.1 ~ 5% (w/w) の残留水分を有し、粉末又は物理的に安定なケーキとして存在する。凍結乾燥物は、再構成媒体の添加後に迅速に溶解することによって特性決定される。

【0038】

本明細書で使用される場合、「再構築製剤」という用語は、凍結乾燥され、希釈剤の添加によって再溶解される製剤を示す。希釈剤は、限定されないが、水、塩化ナトリウム溶液（例えば 0.9% (w/v) NaCl）、グルコース溶液（例えば 5% グルコース）、界面活性剤含有溶液（例えば 0.01% ポリソルベート 20 又はポリソルベート 80）、pH 緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝溶液）、及びそれらの組み合わせを含むことができる。

【0039】

本開示は、データ収集のためのシステム（例えば、センサ又は検出装置）の製造における本明細書に記載のナノポア-ナノディスク複合体の使用を提供する。例示的なシステムでは、脂質二重層膜が、例えば PTFE 固体支持細胞の開口部を横切って形成される。脂質二重層膜は、以下の工程に従って形成され得る：i) ヘキサンに溶解した脂質の薄いコート（例えば、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、「DPHPE」）で支持細胞をプライミングする工程、ii) 塗布された細胞を風乾させてヘキサンを除去する工程、iii) PE を 1-ヘキサデセンに溶解し、プライミングされた支持細胞の上にピペットで溶液を堆積させることによって支持細胞の上に脂質を塗布する工程、及び iv) 支持細胞の開口部の上に気泡を移動させて開口部の上に脂質二重層膜を形成する工程。ナノポアを膜に挿入するために、ナノポア-ナノディスク複合体を脂質二重層膜に適用すると、ナノポアタンパク質が膜に同化する（すなわち、挿入する）。特定の実施形態では、天然ナノポアは、機械的力によって、例えばエレクトロポレーションによって、又は気泡を使用することによって膜に挿入される。

【0040】

検出システムは、シスチャンバとトランスチャンバとを分離する膜を含む。ナノポアのシス側及びトランス側の標準的な電極、例えば Ag/AgCl は、電流源を提供する。電流感知回路を使用して、2つのイオン感応性電極間に適切な電解質、例えば 1M 超の KCl を含む溶液中のナノポアを通過するイオン電流を測定する。電極は、周波数範囲にわたるイオン電流に比例する電圧出力を提供するトランスインピーダンス増幅器を介して回路を完成させる。ナノポアからのデータは、Axopatch 200B 増幅器を用いて取得することができる。このタイプのシステムは、ナノポア技術における分析能力を評価するために使用される従来のシステムと一致する。天然ナノポアタンパク質の膜への同化は、電流が膜を横切って流れることを可能にする機能センサを生成する。このようにして、膜への天然ナノポアタンパク質の適切な同化は、システム内のイオン電流を監視することによって検出ことができ、例えば、天然ナノポアの正しい同化の際に -100 mV の予想電流は約 200 pA であり得る。

【0041】

いくつかの実施形態では、検出システムは、任意の適切な数のナノポアを有するナノポアのアレイを含み得る。いくつかの場合において、アレイは、約 200、約 400、約 600、約 800、約 1000、約 1500、約 2000、約 3000、約 4000、約 5000、約 10000、約 15000、約 20000、約 40000、約 60000、約 80000、約 100000、約 200000、約 400000、約 600000、約 800000、約 1000000 などのナノポアを含む。場合によっては、アレイは、センサ回路又は検出電極に近接した少なくとも 200、少なくとも 400、少なくとも 600、少なくとも 800、少なくとも 1000、少なくとも 1500、少なくとも 2000、少なくとも 3000、少なくとも 4000、少なくとも 5000、少なくとも 10,000、少なくとも 15,000、少なくとも 20,000、少なくとも 40,000、少なくとも 60,000、少なくとも 80,000、少なくとも 100,000、少なくとも 200,000、少なくとも 400,000、少なくとも 600,000、少なくとも 800,000、又は少なくとも 1,000,000 のナノポアを含む。1つ以上のナノポ

10

20

30

40

50

アは、個々の電極及び検知集積回路、又は複数の電極及び検知集積回路に関連付けられてもよい。いくつかの実施形態では、CMOSに実装されたトランスインピーダンスアンプのレイは、独立したセンサ電流のレイを並列に測定するように構成される。そのような増幅器レイの例は、Kim et al. (例えば、Kim, B. N., Herbst, A. D., Kim, S. J., Minch, B. A., & Lindau, M. 2013. Parallel Recording of Neurotransmitters Release from Chromaffin Cells using a 10x10 CMOS IC Potentiostat Array with On-Chip Working Electrodes. Biosensors and Bioelectronics, 41, 736-744を参照されたい)によって開示されている。ナノポアデバイスは、複数の個別にアドレス指定可能な検知電極を含み得る。各検知電極は、電極に隣接する膜と、膜内の1つ以上のナノポアとを含むことができる。

10

【0042】

特定の実施形態では、本明細書に記載のレイの膜に適用される脂質ナノディスクの各々は、その中に同化された1つ以下のタンパク質ナノポアを有する。あるいは、個々のナノディスクは、2つ以上のタンパク質ナノポアを含むことができる。

【0043】

本開示の検出装置は、イオン、核酸、ヌクレオチド、ポリペプチド、生物学的に活性な小分子、脂質、糖などを含むがこれらに限定されない様々な分析物のいずれかを検出するために使用することができる。したがって、これらの1つ以上の分析物は、本明細書に記載の装置内のタンパク質ナノポアの開口部内に存在することができるか、又は開口部を通過することができる。

20

【0044】

好ましい実施形態では、本開示は、「拡張による配列決定」に基づいて核酸を配列決定するためのシステム及び方法を更に提供する。Stratos Genomics (例えば、Kokoris et al., 米国特許第7,939,259号、'High Throughput Nucleic Acid Sequencing by Expansion')を参照されたい)によって開発された拡張による配列決定(SBX)プロトコルは、「XNTP」として公知の非天然モノマー基質の重合に基づいている。一般に、SBXは、この生化学的重合を使用して、DNA鋳型の配列を「Xpandomer」と呼ばれる測定可能なポリマー上に転写する。転写された配列は、約10nm離れた高シグナル対ノイズレポーターにおいてXpandomer骨格に沿ってコード化され、高シグナル対ノイズ、高分化応答のために設計される。これらの違いは、天然DNAと比較して、Xpandomerの配列リード効率及び精度の著しい性能向上を提供する。SBXプロセスの一般化された概要を図2A、図2B、図2C、及び図2Dに示す。

30

【0045】

XNTPは、鋳型依存性酵素重合と適合性の拡張可能な5'三リン酸修飾非天然基質である。高度に単純化されたXNTPが図2Aに示されており、これは、これらの非天然基質の固有の特徴を強調している、XNTP200は、2つの異なる機能領域を有する。すなわち、5'-ホスフェート215を核酸塩基205に連結する選択的に切断可能なホスホルアミデート結合210と、ホスホルアミデート結合のヌクレオチド内切断による制御された拡張を可能にする位置でヌクレオシドトリホスホルアミデート内に結合されるつなぎ鎖220である。XNTPのつなぎ鎖は、選択的に切断可能なホスホルアミデート結合によって分離されたリンカーアーム部分225A及び225Bから構成される。各リンカーは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Kokorisらによる米国特許第8,324,360号明細書に開示されているように、連結基(LG)を介してレポーター230の一端に結合する。XNTP200は、重合後のXNTP基質及び娘鎖に特徴的な「拘束された配置」に示されている。重合XNTPの拘束された構成は、Xpandomer産物に見られるように、拡張された構成の前駆体である。拘束された構成から拡張された構成への移行は、娘鎖の一次骨格内のホスホルアミデートのP-P結合の切断

40

50

時に起こる。

【0046】

X p a n d o m e r ポリマーの合成を図2B及び図2Cに要約する。アセンブリ中、モノマーX N T P基質245 (X A T P、X C T P、X G T P、及びX T T P)は、ガイドとして一本鎖鋳型240を使用する鋳型指向性重合のプロセスによって新生娘鎖250の伸長可能末端上で重合される。一般的に、このプロセスは、プライマーから開始され、5'から3'方向に進行する。一般的に、DNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用して娘鎖を形成し、鋳型鎖の相補的コピーが得られるように条件を選択する。娘鎖が合成された後、カップリングされたつなぎ鎖は、娘鎖を更に含む拘束されたX p a n d o m e rを含む。娘鎖中のつなぎ鎖は、X N T P基質の「拘束された配置」を有する。つなぎ鎖の拘束された配置は、X p a n d o m e r産物に見られるように、拡張された配置の前駆体である。

10

【0047】

図2Cに示されるように、拘束された構成260から、拡張された構成265への移行は、娘鎖の一次骨格内の選択的に切断可能なホスホルアミデート結合(単純化のために陰影のない楕円によって示す)の切断に起因する。この実施形態では、つなぎ鎖は、それらが連結されている核酸塩基に特異的な1つ以上のレポーター構築物又はレポーター構築物230A、230C、230G、又は230Tを含み、それによって鋳型の配列情報をコードする。このようにして、つなぎ鎖は、X p a n d o m e rの長さを拡張し、親鎖の配列情報の線密度を低下させる手段を提供する。

20

【0048】

図2Dは、シスリザーバ275からトランスリザーバ285にナノポア280を通過して移動するX p a n d o m e r 265を示す。図1に示すように、-HLナノポア-ナノディスクアセンブリは、電解質の2つのリザーバを分離して電氣的に単離する脂質二重層膜に同化される。典型的な電解質は、7.0のpHに緩衝された1モルのKClを有する。-HLナノポアは、最初に幹側からX p a n d o m e rを捕捉するように配向されている。この配向は、最初に前庭部に入るときに生じる閉塞アーチファクトをより少なくすることから、転座制御法を使用することが有利である。典型的には100mVの小さい電圧が、二重層を通過して印加される場合、ナノポアは、イオン電流の流れを拘束し、回路内の一次抵抗である。ナノポアを通過する際、線状化X p a n d o m e rのレポーターコンストラクト(この図では、「G」、「C」、及び「T」とラベル付けされている)のそれぞれは、それが連結されている核酸塩基に特異的な別個の再現性のある電子シグナル(重畳トレース290によって示す)を生成する。

30

【実施例】

【0049】

実施例1

ナノディスク担体における -ヘモライシンナノポアのアセンブリ及び精製
ナノディスク形成

【0050】

この実施例は、脂質ナノディスク中の天然の -ヘモリシンナノポアタンパク質の再構成、及び脂質膜中の天然のナノポアタンパク質の同化のためのナノポア-ナノディスク複合体の精製を記載する。

40

【0051】

-ヘモリシンタンパク質、MSPタンパク質、及びDPHPC脂質を共に1:6:101のモル比でインキュベートすることによって、ナノポア-ナノディスク複合体を形成した。反応緩衝液は、20mM Tris、pH7.4、0.5mM EDTA、100mM NaCl及び30mMコール酸塩で構成されていた。野生型 -ヘモリシンタンパク質をSigmaから入手し、(七量体型について計算した)20µMのストック溶液を50%グリセロール/50%水中で調製した。DPHPC(Avantipolar Lipidsから入手可能)の50mMストック溶液を、100mMコール酸ナトリウムを補

50

充した20 mM Tris (pH 7.4) 中で調製した。MSP1D1タンパク質(N末端Hisタグを有する)をSigmaから入手し、製造業者の指示に従って202 μMストック溶液を調製した。134 μLのナノディスクアセンブリ体混合物は、0.675 mMのDPHPC、6.67 μMの-HL、及び40 μMのMSPを含んでいた。コール酸塩の最終濃度は14 mM超であると決定され、本発明者らは、これが-HL/DPHPC/MSPナノディスク錯体のアセンブリに好ましいことを見出した。アセンブリ混合物を室温で60分間インキュベートした。洗浄剤を除去するため、78.8 mgのバイオビーズSM-2(BioRadから入手可能)を添加し、混合物を室温で2.5時間、1200 rpmで振盪した。混合物を45 μmフィルタに通すことによってビーズを除去した。ナノポア-ナノディスク複合体

10

【0052】

天然の七量体-HLタンパク質を含有するナノポア-ナノディスク複合体を単離するため、まず、目的の複合体の予測されるサイズに基づいて選択されたSuperdex 200 Increaseカラム(GEHから市販)を使用してサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行った。カラムをMSP緩衝液(20 mM Tris、pH 7.4、100 mM NaCl及び0.5 mM EDTA)で平衡化し、次いで105 μLのナノディスクアセンブリ混合物を添加し、流速を160 psiで0.5 mL/分に調整した。カラムトレースを図13に示し、収集された2つの画分を「1」及び「2」として示す。画分2中の七量体-HLタンパク質の存在をゲル電気泳動によって確認した。

【0053】

20

次に、Ni-NTA精製工程を行った。空のNi-NTAスピンカラムに50 μLの樹脂を添加することによってカラム樹脂(Qiagenから市販)を調製し、カラムを700 x gで2分間回転させて保存緩衝液を除去した。次いで、カラムを、20 mM Tris、pH 7.5及び10 mMイミダゾールを含有する400 μLのEQ緩衝液で平衡化した。カラムを700 x gで2分間回転させることによって、EQ緩衝液を除去した。次いで、F2ナノディスクサンプルをカラムに添加し、カラムをエンドオーバーエンドローター上に15分間固定することによってカラム内容物を混合した。カラムを700 x gで2分間遠心分離し、20 mM Tris、pH 7.5及び25 mMイミダゾールを含有する700 μLの洗浄緩衝液で3回洗浄した。次いで、Hisタグ付きタンパク質/ナノディスクアセンブリを、20 mM Tris、pH 7.5及び250 mMイミダゾールを含有する150 μLの緩衝液を添加することによって溶出した。カラムを5分間インキュベートし、次いで、カラムを700 x gで2分間遠心分離することによって溶出液を回収した。

30

【0054】

精製工程の有効性をモニタリングし、ゲル電気泳動による以下のサンプルの分析によって評価した：ロードサンプル(SECカラムに適用されたサンプル1 μL)；サンプル1(16:30~17:55にSECカラムから収集された15 μLの画分1)；サンプル2(19:00~20:45にSECカラムから収集された15 μLの画分2)；FTサンプル(15 μLのカラムフロースルー)；サンプルW1、W2及びW3(IMACからの第1、第2、及び第3の洗浄サンプルそれぞれ15 μL)；並びにサンプルE1(15 μLのサンプルがIMACから溶出した)。代表的なゲルを図3に示す。矢印は、七量体-HLタンパク質及びMSPタンパク質の位置を示す。これらの結果は、天然ナノポアタンパク質を含有する-HLナノポア-ナノディスク複合体のアセンブリ及び精製の成功を裏付けている。単量体-HLタンパク質を表すゲル上のかすかなバンドは、タンパク質サンプルがゲル中で泳動されるとき天然の七量体オリゴマーの解離の結果であり得る。

40

【0055】

本発明は、本明細書において広く一般的に記載されている。一般的な開示に含まれるより狭い種及び亜属の群のそれぞれも、本発明の一部を形成する。これは、切除された材料が本明細書に具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除去する

50

という条件又は否定的限定を伴う本発明の一般的な説明を含む。

【0056】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が、明確に別段の指示をしない限り、複数への言及を含み、「X及び/又はY」という用語は、「X」又は「Y」、又は「X」と「Y」の両方を意味し、名詞に続く文字「s」は、名詞の複数形と単数形の両方を示すことも理解されたい。さらに、本発明の特徴又は態様がマーカッシュ群に関して記載されている場合、本発明は、マーカッシュ群の任意の個々のメンバー及びメンバーの任意のサブグループに関するも包含し、それによって記載されることが意図されており、当業者により認識されることであり、出願人は、マーカッシュ群の任意の個々のメンバー又はメンバーの任意のサブグループを具体的に指すように、本出願又は特許請求の範囲を修正する権利を留保する。

10

【0057】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、限定することを意図するものではないことを理解するべきである。本明細書で具体的に定義されない限り、本明細書で使用される用語は、関連技術で知られているその従来の意味を与えられるべきであることを更に理解されたい。

【0058】

本明細書全体を通して「一実施形態」又は「実施形態」及びその変形への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、又は特性が少なくとも一実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して種々の場所における「一実施形態では」又は「実施形態では」という句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指すとは限らない。更にまた、特定の特徴、構造、又は特性は、1つ以上の実施形態において、任意の適切な方法で組み合わせられることができる。

20

【0059】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容及び文脈が、明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象、すなわち1つ以上を含む。例えば、「センサ」という用語は1つ以上のセンサを指し、「センサを備える検出装置」という用語は、少なくとも1つのセンサを含む検出装置を指し、センサを備える検出装置は、例えば、1個のセンサ、10個のセンサ、 10^2 個のセンサ、 10^3 個のセンサ、 10^4 個のセンサ、 10^5 個のセンサ、 10^6 個のセンサ、又は 10^6 個を超えるセンサを有することができる。複数のセンサは、1を超えるセンサを指す。また、接続的用語「及び (and)」及び「又は (or)」は、一般的に、内容及び文脈が場合によって包括性又は排他性を明確に指示しない限り、「及び/又は (and/or)」を含むように最も広い意味で用いられることにも留意されたい。したがって、代替形態 (例えば、「又は」) の使用は、代替形態のいずれか1つ、両方、又はそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。さらに、本明細書で「及び/又は」と記載されている場合の「及び」及び「又は」の構成は、全ての関連する項目又はアイデアを含む実施形態、及び全てよりは少ない、関連する項目又はアイデアを含む1つ以上の他の代替実施形態を包含することを意図している。

30

【0060】

文脈上他の意味に解釈すべき場合を除き、明細書及びその後の特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」という単語、並びに「有する (have)」及び「含む (include)」等のその同義語及び変形、並びに「含む (comprises)」及び「含む (comprising)」などのその変形は、オープンで包括的な意味、例えば、「含むが、限定されない」と解釈されるべきである。「本質的にからなる」という用語は、特定の材料若しくは工程、又は特許請求される本発明の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響を及ぼさないものに特許請求の範囲を限定する。

40

【0061】

本文書内で使用される任意の見出しは、読者によるその検討を促進するために利用されているにすぎず、本発明又は特許請求の範囲を限定するものとして決して解釈されるべき

50

ではない。したがって、本明細書で提供される見出し及び開示の要約は、便宜上のものに過ぎず、実施形態の範囲又は意味を解釈するものではない。

【 0 0 6 2 】

ある範囲の値が本明細書で提供される場合、文脈が、明確に別段の指示をしない限り、その範囲の上限と下限との間における、下限の単位の10分の1までの各介在値、及び記載された範囲内の任意の他の記載値又は介在値は、本発明に包含されることは理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限が、より小さい範囲に独立して含まれ得ることも、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限界を条件として、本発明に包含される。記載された範囲が制限の一方又は双方を含む場合は、包含された制限の一方又は双方を除いた範囲もまた、本発明に含まれる。

10

【 0 0 6 3 】

例えば、本明細書で提供される任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、又は整数範囲は、特に別段の説明がない限り、記載された範囲内の任意の整数、及び適切な場合、その分数（例えば、整数の10分の1及び100分の1）の値を含むと理解されるべきである。また、ポリマーサブユニット、サイズ、又は厚さ等の任意の物理的特徴に関する本明細書に記載された任意の数の範囲は、別段の説明がない限り、記載された範囲内の任意の整数を含むと理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別段の説明がない限り、示された範囲、値、又は構造の±20%を意味する。

【 0 0 6 4 】

2019年10月30日に出願された米国仮特許出願第62/928,207号を含むがこれらに限定されない、本明細書で言及された及び/又は出願データシートに列挙された米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許刊行物は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような文献は、例えば、本明細書に記載された発明に関連して使用され得る刊行物に記載された材料及び方法論を説明及び開示する目的で、参照により組み込まれ得る。上記及び本文全体で説明されている刊行物は、本出願の出願日より前の開示のためにのみ提供されている。本明細書中のいかなるものも、本開示が先行発明によってそのような刊行物に先行する権利がないことの承認として解釈されるべきではない。

20

【 0 0 6 5 】

本明細書で参照又は言及される全ての特許、出版物、科学論文、ウェブサイト、並びに他の文書及び資料は、本発明が関係する当業者の技術レベルを示しており、そのような参照された各文書及び資料は、参照によりその全体が個別に組み込まれているか、又はその全体が、本明細書に記載されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。出願人は、そのような特許、出版物、科学論文、ウェブサイト、電子的に利用可能な情報、及び他の参照される資料又は文書からのありとあらゆる資料及び情報を本明細書に物理的に組み込む権利を留保する。

30

【 0 0 6 6 】

一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を明細書及び特許請求の範囲に開示された特定の実施形態に限定すると解釈されるべきではなく、そのような特許請求の範囲が権利を有する均等物の全範囲と共に全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

40

【 0 0 6 7 】

さらに、この特許の記述の部分は、全ての特許請求の範囲を含む。さらに、全ての元の特許請求の範囲並びに任意の及び全ての優先権書類からの全ての特許請求の範囲を含む全ての特許請求の範囲は、参照によりその全体が本明細書の明細書の明細書部分に組み込まれ、出願人は、そのような特許請求の範囲のいずれか及び全てを明細書又は本出願の他の部分に物理的に組み込む権利を留保する。したがって、例えば、特許は、いかなる状況下でも、請求項の正確な文言が特許の明細書の部分の *h a e c v e r b a* に記載されていないという主張に対して、請求項の明細書を提供していないと解釈されることはない。

50

【 0 0 6 8 】

特許請求の範囲は、法律に従って解釈される。しかしながら、請求項又はその一部の解釈が容易又は困難であると主張又は認識されているにもかかわらず、いかなる状況下でも、本特許につながる出願又は出願の遂行中の請求項又はその一部の調整又は修正は、先行技術の一部を形成しないそのありとあらゆる等価物に対する権利を放棄したと解釈されてはならない。

【 0 0 6 9 】

他の非限定的な実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。特許は、本明細書に具体的及び／又は明示的に開示された特定の例又は非限定的な実施形態又は方法に限定されると解釈されてはならない。いかなる状況下においても、本特許は、いかなる審査官又は特許商標庁の他の役人若しくは従業員によってなされた陳述によっても限定されると解釈されてはならない。ただし、そのような陳述が具体的に、かつ、出願人による応答書面において明示的に採用された資格又は留保がない場合を除く。

10

20

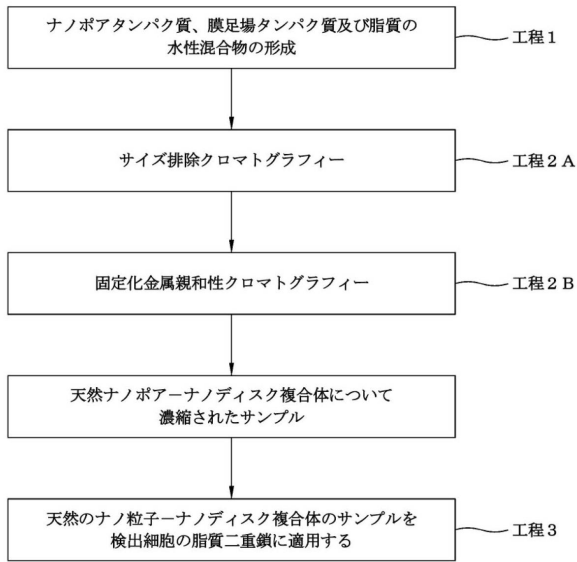
30

40

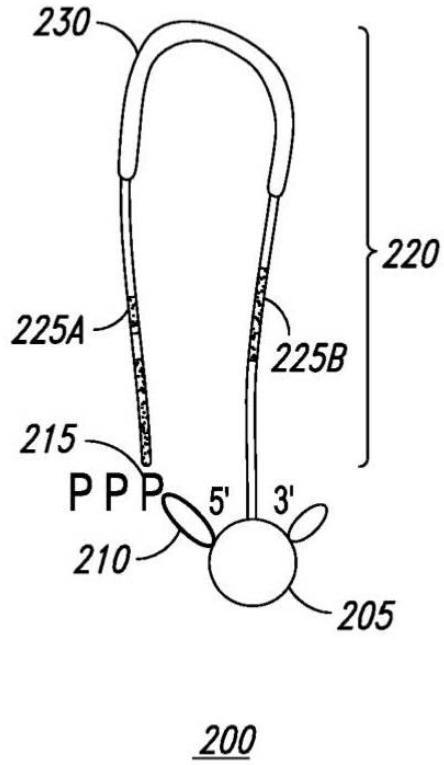
50

【 図 面 】

【 図 1 】



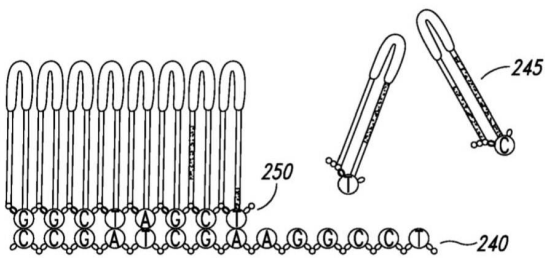
【 図 2 A 】



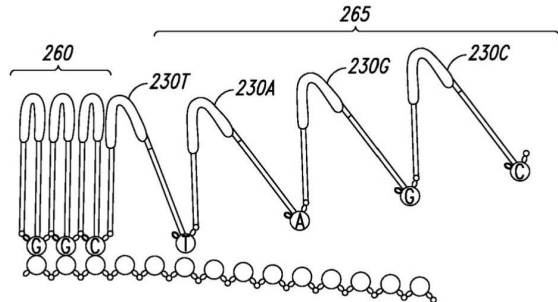
10

20

【 図 2 B 】



【 図 2 C 】

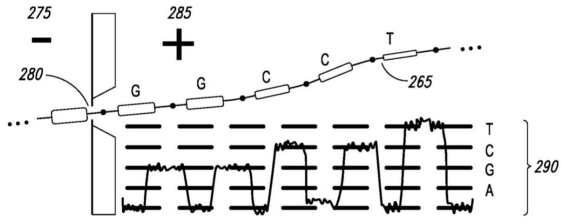


30

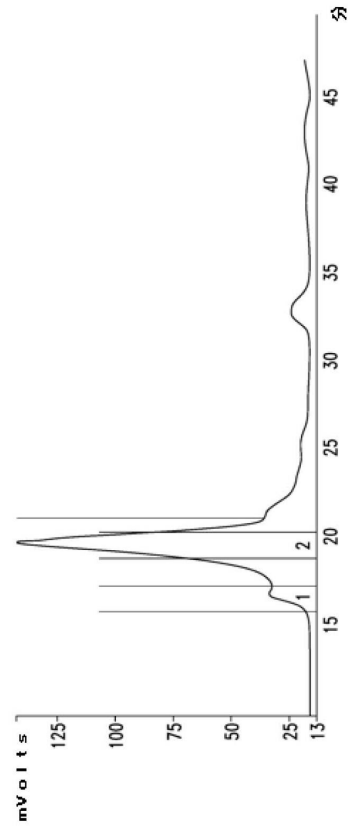
40

50

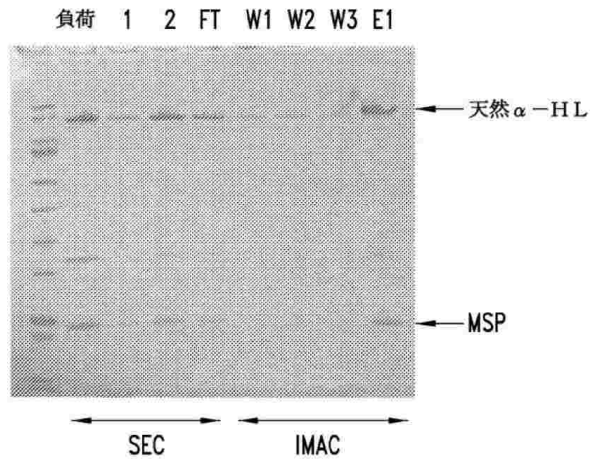
【 図 2 D 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
C 0 7 K	1/22 (2006.01)	C 0 7 K	1/22		
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	

(72)発明者

ブサム, ロバート

アメリカ合衆国ワシントン州9 8 1 2 1, シアトル, エルリオット・アベニュー 2 2 1 1, スイート 2 1 0, ワールド・トレード・センター・イースト

(72)発明者

チェフ, シンシア・エイ

アメリカ合衆国ワシントン州9 8 1 2 1, シアトル, エルリオット・アベニュー 2 2 1 1, スイート 2 1 0, ワールド・トレード・センター・イースト

審査官 小倉 梢

(56)参考文献

特表2 0 1 7 - 5 2 3 4 2 4 (J P , A)
Methods, 2013年, Vol. 59, p. 287-300

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B名)

C 1 2 M 1 / 0 0 - 1 / 4 2

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0

G 0 1 N 3 3 / 5 0 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)