

(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2016-517275

(P2016-517275A)

(43) 公表日 平成28年6月16日(2016.6.16)

(51) Int.Cl.

**C 12 Q 1/68 (2006.01)**  
**C 12 N 15/09 (2006.01)**  
**G 01 N 33/53 (2006.01)**  
**G 01 N 27/00 (2006.01)**

F 1

C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00  
G 01 N 33/53  
G 01 N 27/00

Z N A A  
A  
M  
Z

テーマコード(参考)

2 G 06 0  
4 B 02 4  
4 B 06 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2016-502813 (P2016-502813)  
(86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)  
(85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015.11.16)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2014/028528  
(87) 國際公開番号 WO2014/144217  
(87) 國際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)  
(31) 優先権主張番号 61/788,589  
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504238378  
ザ キュレイターズ オブ ザ ユニバ  
シティ オブ ミズーリ  
アメリカ合衆国 65211 ミズーリ州  
コロンビア ユニバーシティホール31  
6  
(74) 代理人 100114890  
弁理士 アインゼル・フェリックス=ライ  
ンハルト  
(74) 代理人 100099483  
弁理士 久野 琢也  
(72) 発明者 リン-チュン グー  
アメリカ合衆国 ミズーリ コロンビア  
ラード トレイル 4912

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多重核酸検出のためのコード化ナノポアセンサー

## (57) 【要約】

本発明は、ナノポア技法に基づき、標的オリゴヌクレオチドに相補性を有する配列を含んでいる1つ以上のプローブ、プローブの3'末端、5'末端、又は両末端での末端伸長部ならびに末端に結合するラベルを用いて新規かつ改善されたオリゴヌクレオチド多重検出法を提供する。改善されたプローブとプローブセットは、miRNAのような別個の標的オリゴヌクレオチドの感受性で、選択的かつ直接的な多重検出、識別及び定量化を可能にする。本発明の検出法は、患者の組織サンプル中のmiRNAレベルに基づき、非侵襲的かつ費用効率のよい診断法として使用してもよい。

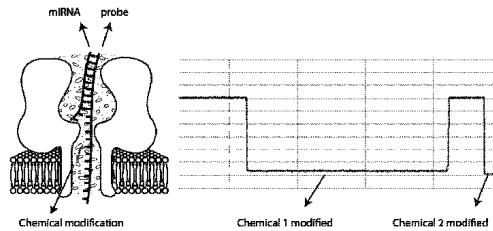


Figure 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子を含んでいるプローブ分子のセットであって、その際、少なくとも2つのプローブ分子は、

a) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 b) キャプチャ領域の5'末端、3'末端又は5'末端と3'末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び

c) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベルを含み、

その際、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、その際、第一のプローブ分子のポリマーラベルは、第二のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、ナノポア系において第一及び第二の標的核酸の独立した検出を提供する、前記プローブ分子のセット。

## 【請求項 2】

第一及び第二のプローブ分子のポリマーラベルは、それらの個々の標的とハイブリダイズし、かつナノポア系において印加電圧をかけた際に別個のシグネチャコンダクタンス遮断を提供する、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 3】

ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 4】

ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 5】

ポリグリコールは、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(MPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリブチレングリコール(PBG)及びこれらのコポリマーから成る群から選択される、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 6】

キャプチャ領域と末端伸長部は、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択される、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 7】

末端伸長部は、キャプチャ領域の3'末端に共有結合される、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 8】

末端伸長部は、ポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dG)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dA)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dT)<sub>(27-33)</sub>及びポリ(dN)<sub>(27-33)</sub>(Nは、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び5-メチルシチジンのいずれかの組合せである)から成る群から選択される、請求項1に記載のプローブセット。

## 【請求項 9】

プローブセットは、少なくとも1つの付加的なプローブ分子を含み、該プローブ分子は、

a) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 b) キャプチャ領域の5'末端又は3'末端に共有結合する末端伸長部、及び  
 c) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベルを含み、その際、付加的なプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一及び第二の標的核酸とは別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、またその際、各々の付加的なプローブ分子のポリマーラベルは、第一のプローブ分子、第二のプローブ分子及び他の付加的なプローブ分子のいずれかのポリマーラベルとは異なっていて、かつナノポア系にお

10

20

30

40

50

いて第一、第二及び付加的な標的核酸の独立した検出を提供する、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項10】

プローブセットは、3、4、6又は8個のプローブ分子を含み、その際、前記プローブ分子の各々のキャプチャ領域は、別個の標的核酸に対して相補性を有する別個の配列を含み、またその際、前記プローブ分子の各々のポリマーラベルは、他のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、かつナノポア系において各プローブに相補性を有する各標的核酸の独立した検出を提供する、請求項9に記載のプローブセット。

【請求項11】

標的核酸は、別個のゲノムDNA、mRNA、未熟miRNA、成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA、ノンコーディングRNA、核酸バイオマーカー又は合成アプタマー分子である、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項12】

プローブ分子の核酸キャプチャ領域は、約15ヌクレオチドから約30ヌクレオチドの長さである、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項13】

第一のプローブ分子又は第二のプローブ分子の少なくとも1つの核酸キャプチャ領域は、その相補的標的核酸の全配列と相補的な配列を含む、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項14】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルと第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、それらの重合の量の点で異なる、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項15】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレングリコールであり、かつ第二のプローブ分子の伸長部に付着しているラベルは、第一のプローブ分子に付着しているポリエチレングリコールとは異なる長さのポリエチレングリコールである、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項16】

付加的な別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含んでいるキャプチャ領域と、場合により末端領域とを有するプローブを更に含み、その際、前記プローブはポリマーラベルを欠如しており、かつ付加的な別個の標的核酸の独立した検出を提供する、請求項1に記載のプローブセット。

【請求項17】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の5'又は3'共有結合の9残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している、請求項1から16までのいずれか1項に記載のプローブセット。

【請求項18】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から5'又は3'に位置する末端伸長部の2~5番目の残基に付着している、請求項17に記載のプローブセット。

【請求項19】

ナノポア系を用いてサンプル中の少なくとも2つの別個の一本鎖標的核酸を検出する方法において、該方法は、

a)サンプルと少なくとも2つのプローブ分子のセットとを接触させ、かつプローブ分子をサンプル中に存在するいずれかの標的核酸とハイブリダイズさせて、ハイブリダイズされたサンプルを形成すること、

その際、プローブ分子のセットは少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子とを含み、その両方は、

(i)標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、

(ii)キャプチャ領域の5'末端、3'末端、又は5'末端と3'末端との両方に共有

10

20

30

40

50

結合する末端伸長部、及び

(i) 少なくとも 1 つの末端伸長部に付着している少なくとも 1 つのポリマーラベルを含み、その際、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸とハイブリダイズし、また、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸領域とハイブリダイズし、その際、第一のプローブ分子のポリマーラベルは、第二のプローブ分子のポリマーラベルとは異なっている；

b) デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中で、前記ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ハイブリダイズされたプローブ / 標的核酸複合体をナノポア中で捕捉し、かつ前記ハイブリダイズされたプローブと標的核酸との、アンジッピング・プロセスによる前記系のナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかけること、及び

c) 経時的に前記ナノポア系中の電流パターンを分析すること、

その際、サンプル中の前記別個の一本鎖の標的核酸の存在が、ナノポア中のそれぞれ別個にハイブリダイズされたプローブと標的核酸との捕捉に相応する 2 個の別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される

を含む前記方法。

#### 【請求項 20】

サンプル中の第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在は、別個のシグネチャコンダクタンス遮断である別個のシグネチャ電流遮断を生じる、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 21】

第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在は別々に検出される、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 22】

プローブセットは、少なくとも 1 つの付加的な標的核酸の存在を別々に検出できる 1 つ以上の付加的なプローブ分子を更に含む、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 23】

付加的なプローブは、付加的な別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含んでいるキャプチャ領域と、場合により末端領域とを有するプローブであり、前記プローブはポリマーラベルを欠如している、請求項 22 に記載の方法。

#### 【請求項 24】

標的核酸は、別個のゲノム DNA、mRNA、未熟 miRNA、成熟 miRNA、人工 miRNA、ノンコーディング DNA、ノンコーディング RNA、核酸バイオマーカー又は合成アプタマー分子である、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 25】

プローブ分子の核酸キャプチャ領域は、約 15 ヌクレオチドから約 30 ヌクレオチドの長さである、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 26】

第一のプローブ分子又は第二のプローブ分子の少なくとも 1 つの核酸キャプチャ領域は、その相補的標的核酸の全配列と相補的な配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 27】

ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 28】

ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 29】

ポリグリコールは、ポリエチレンギリコール (PEG)、メトキシポリエチレンギリコール (MPEG)、ポリプロピレンギリコール (PPG)、ポリブチレンギリコール (PBG) 及びこれらのコポリマーから成る群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

#### 【請求項 30】

キャプチャ領域と末端伸長部とは、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択さ

10

20

30

40

50

れる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 31】

末端伸長部は、キャプチャ領域の 3' 末端に共有結合されている、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 32】

末端伸長部は、ポリ (d C)<sub>(27-33)</sub>、ポリ (d G)<sub>(27-33)</sub>、ポリ (d A)<sub>(27-33)</sub>、ポリ (d T)<sub>(27-33)</sub> 及びポリ (d N)<sub>(27-33)</sub> (N は、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び 5-メチルシチジンのいずれかの組合せである) から成る群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 33】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルと第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、その重合の量の点で異なる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 34】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレングリコールであり、第二のプローブ分子の伸長部に付着しているラベルは、第一のプローブ分子に結合されるポリエチレングリコールとは異なる長さのポリエチレングリコールである、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 35】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の 5' 又は 3' 共有結合の 9 残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している、請求項 19 から 34 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から 5' 又は 3' に位置する末端伸長部の 2 番目から 5 番目の残基に付着している、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

(i) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 (ii) キャプチャ領域の 5' 末端、3' 末端、又は 5' 末端と 3' 末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び  
 (iii) 少なくとも 1 つの末端伸長部に付着している少なくとも 1 つのポリマーラベルを含んでいるプローブ分子であって、その際、前記プローブ分子はナノポア系における標的核酸の検出を提供する前記プローブ分子。

30

【請求項 38】

a) 核酸キャプチャ領域は、  
 i) 標的核酸とハイブリダイズできる、又は  
 ii) 標的核酸とハイブリダイズでき、かつ標的核酸の配列と相補的な配列を含む；  
 b) 末端伸長部は、核酸キャプチャ領域の 3' 末端に共有結合されるポリ (d C)<sub>(27-33)</sub> である、及び  
 c) ポリマーラベルは、ポリ (d C) 末端伸長部に付着している、  
 請求項 37 に記載のプローブ分子。

40

【請求項 39】

標的核酸は、ゲノムDNA、mRNA、未熟若しくは成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA若しくはRNA、核酸バイオマーカー又は合成アブタマーである、請求項 37 又は 38 に記載のプローブ分子。

【請求項 40】

核酸キャプチャ領域は、約 15 ヌクレオチドから約 30 ヌクレオチドの長さである、請求項 37 又は 38 に記載のプローブ分子。

【請求項 41】

核酸キャプチャ領域は、標的核酸の全配列と相補的な配列を含む、請求項 37 又は 38

50

に記載のプローブ分子。

【請求項 4 2】

ポリ ( d C ) 末端伸長部は、ポリ ( d C ) <sub>(30)</sub> 末端伸長部である、請求項 3 8 に記載のプローブ分子。

【請求項 4 3】

末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、ホモポリマー又はヘテロポリマーである、請求項 3 7 又は 3 8 に記載のプローブ分子。

【請求項 4 4】

ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである、請求項 3 7 又は 3 8 に記載のプローブ分子。

10

【請求項 4 5】

ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される、請求項 3 7 又は 3 8 に記載のプローブ分子。

【請求項 4 6】

ポリグリコールは、ポリエチレングリコール (PEG)、メトキシポリエチレングリコール (MPEG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリブチレングリコール (PBG) 及びこれらのコポリマーから成る群から選択される、請求項 4 5 に記載のプローブ分子。

【請求項 4 7】

キャプチャ領域と末端伸長部は、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択される、請求項 3 7 又は 3 8 に記載のプローブ分子。

20

【請求項 4 8】

末端伸長部は、キャプチャ領域の 3' 末端に共有結合されている、請求項 3 7 に記載のプローブ分子。

【請求項 4 9】

末端伸長部は、ポリ ( d C ) <sub>(27-33)</sub>、ポリ ( d G ) <sub>(27-33)</sub>、ポリ ( d A ) <sub>(27-33)</sub>、ポリ ( d T ) <sub>(27-33)</sub> 及びポリ ( d N ) <sub>(27-33)</sub> (N は、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び 5-メチルシチジンのいずれかの組合せである) から成る群から選択される、請求項 3 7 に記載のプローブ分子。

【請求項 5 0】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の 5' 又は 3' 共有結合の 9 残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している、請求項 3 7 又は 3 8 のいずれか 1 項に記載のプローブ分子。

30

【請求項 5 1】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から 5' 又は 3' に位置する末端伸長部の 2 ~ 5 番目の残基に付着している、請求項 5 0 に記載のプローブ分子。

【請求項 5 2】

ナノポア系を用いてサンプル中の少なくとも 1 つの別個の一本鎖標的核酸を検出する方法において、該方法は、

a) サンプルと、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の少なくとも 1 つのプローブ分子のセットとを接触させ、プローブ分子をサンプル中に存在するいずれかの標的核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされたサンプルを形成すること、

40

その際、プローブ分子のセットは少なくとも、1 つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子を含む、

b) デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中の前記ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ハイブリダイズされたプローブ / 標的核酸複合体をナノポア中で捕捉し、かつ前記ハイブリダイズされたプローブと標的核酸とのアンジッピング・プロセスによる前記系のナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかけること、及び

c) 経時的に前記ナノポア系中の電流パターンを分析すること、

その際、サンプル中の前記別個の一本鎖標的核酸の存在が、前記ハイブリダイズされた

50

プローブと標的核酸とのナノポアを通る移行に相応する別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される  
を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の交互参照

本国際特許出願は、2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/788589号の利益を請求するものであり、その全体を本明細書中に参照してそのまま組み込むこととする。

10

【0002】

交付文書

本発明は、国立衛生研究所により付与された認可番号R01GM079613による政府支援のもと作成されたものである。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表の挿入

配列表は、2831バイトのサイズで(MS-Windows(登録商標)で測定)、2014年3月13日に作成されたファイル名“13 UMC050\_SEQ\_LIST\_ST25.txt”でUSPTO's EFSシステムにより国際出願の一部分として提供され、かつ本明細書中に参照してそのまま組み込むこととする。

20

【0004】

発明の背景

ナノポアは、溶液を両側に分ける隔膜中に組立てられた分子スケールのポア構造体である。ポアを貫通する個々の標的分子は、ポアコンダクタンスを特徴的に遮断し、結果として標的の同定と量子化の両方に関するシグネチャを生じる。ナノポアテクノロジーは、様々なバイオ技術用途、特に次世代DNAシーケンシング<sup>20-23</sup>に固有の単分子のプラットフォームを提供する。miRNA検出では、ナノポアセンサーはプログラム可能なDNAプローブを使用し、標的に特異的なシグネチャシグナルを生じ、かつピコモラー以下のレベルのmiRNA(癌に関するmiRNAのようなもの)を定量でき、かつmiRNAファミリーメンバー間で一本鎖ヌクレオチドの違いを識別できる。このアプローチは、定量的miRNA検出、疾患マークーの発見及び癌のような疾患の非侵襲的初期診断に潜在的に有用である。

30

【0005】

以前に開示されたナノポアに基づく多重検出系には、多様な二価金属イオンのナノポア検出が含まれ、これはポアルーメン中で設計されたキレート剤を使用し、別個のシグネチャ<sup>24</sup>を生じ、かつ分子アダプターを使用し、薬剤<sup>25</sup>、エナンチオマー<sup>26,27</sup>及びヌクレオチド<sup>28,29</sup>を含む構造類似化合物を識別する。

30

【0006】

多様なタンパク質は、ポリマーを認識基に付与することによりナノポア中でも検出された<sup>30</sup>。ナノポアの-バレルを通って移行する遊離ポリエチレングリコール(PEG)の種々の長さは、ナノポアコンダクタンスレベルにより分けることができる<sup>33</sup>。ポリペプチドでラベルされたDNAは、ナノポア中に捕捉される場合にシグネチャを生じることもできると報告されている<sup>31</sup>。タグ付け法に関しては、ペプチドタグでのDNAの化学変性は、DNA移行速度を遅くするだけではなく、一塩基突然変異<sup>32</sup>を含む個々のDNA断片<sup>31</sup>の感度を高めるシグネチャを生じることもできる。ナノポアは、単分子マススペクトロメトリーとしても機能し、ポアを通って移行する種々の大きさのポリ(エチレングリコール)(PEG)ポリマーを分析しており<sup>33</sup>、また最近ではナノポアは、5'-ホスフェート-改変ヌクレオチドから放出される種々の大きさの4個のPEGタグを検出することにより4塩基を識別することが示してきた<sup>34</sup>。クラウンタグでの化学変性により、個々のDNA非塩基部位は、ナノポアを通る電気泳動的移行の間に検出できる<sup>35</sup>。しかし、各ポアは、1つのオリゴヌクレオチドを測定するハイスループットのナノポアアレイの開発は、なお挑戦段階である

40

50

。

## 【0007】

ナノポア検出の臨床適用への挑戦のうちの1つは、通常は特異的疾患診断には1種類のmiRNAよりも複数のmiRNAから成るバイオマーカーパネルの正確な検出を必要とすることである。例えば、3個のmiRNAのバイオマーカーであるmiR-155、miR-182及びmiRNA-197の組合せは、感度81%及び特異度87%まで肺癌の識別能を高めることができる<sup>4</sup>。これには複数のmiRNAの同時検出が必要である。

## 【0008】

従って、改善された感度、迅速なプロセス及び費用効率が良くならびに多重検出を提供するためにナノスケールのポア構造に基づいた新規オリゴヌクレオチド検出法を提供する必要がある。

## 【0009】

## 概要

以下の部分の明細書、図面及び表に記載のプローブ分子、プローブ分子のセット、ナノポア、プローブ分子を含んでいるキット、プローブ分子のセット及びナノポアならびに関連する使用法が提供される請求項である。プローブ分子の使用、標的核酸を検出するためのプローブ分子のセットも明細書中に提供される。

## 【0010】

本明細書中に提供されているものは、少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子を含んでいるプローブ分子のセットであり、その際、少なくとも2つのプローブ分子は、

a) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、

b) キャプチャ領域の5'末端、3'末端又は5'末端と3'末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び

c) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベルを含み、その際、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、またその際、第一のプローブ分子のポリマーラベルは、第二のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、かつナノポア系において第一及び第二の標的核酸の独立した検出を提供する。

## 【0011】

特定の実施態様において、第一及び第二のプローブ分子のポリマーラベルは、それらの個々の標的とハイブリダイズし、かつナノポア系において印加電圧をかけた際に別個のシグネチャコンダクタンス遮断を提供する。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される。特定の実施態様において、ポリグリコールは、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(MPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリブチレングリコール(PBG)及びこれらのコポリマーから成る群から選択される。前記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、キャプチャ領域と末端伸長部とは、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択される。前記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部はキャプチャ領域の3'末端に共有結合される。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部は、ポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dG)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dA)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dT)<sub>(27-33)</sub>及びポリ(dN)<sub>(27-33)</sub>(Nは、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基(a base)、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び5-メチルシチジンのいずれかの組合せである)から成る群から選択される。上記プローブセットのうちいずれかの特定の実施態様において、プローブセットは、少なくとも1つの付加的なプローブ分子を含み、これは、

10

20

30

40

50

a ) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 b ) キャプチャ領域の 5' 又は 3' 末端に共有結合する末端伸長部、及び  
 c ) 少なくとも 1 つの末端伸長部に付着している少なくとも 1 つのポリマーラベル  
 を含み、その際、付加的なプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一及び第二の標的核酸とは別個である標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、またその際、他の各々の付加的なプローブ分子のポリマーラベルは、第一のプローブ分子、第二のプローブ分子及び他のプローブ分子のいずれとも異なり、かつナノポア系において第一、第二の標的及び他の標的核酸の独立した検出を提供する。前記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、プローブセットは、3、4、6 又は 8 個のプローブ分子を含み、その際、各々のプローブ分子のキャプチャ領域は、別個の標的核酸に対して相補性を有する別個の配列を含み、またその際、各々のプローブ分子のポリマーラベルは、他のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、かつナノポア系における各プローブに相補性を有する各々の標的核酸の独立した検出を提供する。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、標的核酸は、別個のゲノムDNA、mRNA、未熟miRNA、成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA、ノンコーディングRNA、核酸バイオマーカー又は合成アプタマー分子である。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、プローブ分子の核酸キャプチャ領域は、約 15 ヌクレオチドから約 30 ヌクレオチドの長さである。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、第一のプローブ分子又は第二のプローブ分子の少なくとも 1 つの核酸キャプチャ領域は、その相補的標的核酸の全体配列と相補的な配列を含む。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様では、第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルと第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルとは、それらの重合の量の点で異なる。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様では、第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレンギリコールであり、第二のプローブ分子の伸長部に付着しているラベルは、第一のプローブ分子に結合されるポリエチレンギリコールとは異なる長さのポリエチレンギリコールである。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、プローブセットは、付加的な別個の標的核酸に対して相補性を有する配列と、場合により末端領域とを含んでいるキャプチャ領域を有するプローブを更に含むことができ、その際、該プローブは、ポリマーラベルを欠如しており、他の別個の標的核酸の独立した検出を提供する。前記プローブセットのいずれかの特定の実施例では、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の 5' 又は 3' 共有結合の 9 残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している。上記プローブセットのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から 5' 又は 3' に位置する末端伸長部の 2 番目から 5 番目の残基に付着している。  
**【0012】**

また、本明細書中で提供されているものは、ナノポア系を用いてサンプル中で、少なくとも 2 個の別個の一本鎖標的核酸を検出する方法であり、該方法は、

a ) サンプルと少なくとも 2 つのプローブ分子のセットとを接触させ、該プローブ分子をサンプル中に存在するいずれかの標的核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされたサンプルを形成すること、

その際、プローブ分子のセットは少なくとも、1 つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子とを含み、その両方は、

(i) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 (ii) キャプチャ領域の 5' 末端、3' 末端、又は 5' 末端と 3' 末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び

(iii) 末端伸長部のうち少なくとも 1 つに付着している少なくとも 1 つのポリマーラベル

を含み、その際、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸とハイブリダイズし、その際、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸領域とハイブリダイズし、またその際、第一のプローブ分子のポリマーラベルは、第二のプロ

10

20

30

40

50

ープ分子のポリマーラベルとは異なっている；

b) デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中で、ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ナノポア中に、ハイブリダイズされたプローブ／標的核酸複合体を捕捉し、ハイブリダイズされたプローブと標的核酸との前記系のアンジッピング・プロセスによるナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかけること、及び

c) 経時的に前記ナノポア系中の電流パターンを分析すること  
を含み、その際、サンプル中の別個の一本鎖標的核酸の存在が、ナノポア中のそれぞれ別個にハイブリダイズされたプローブと標的核酸との捕捉に相応する2個の別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、サンプル中の第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在とは、別個のシグネチャコンダクタンス遮断である別個のシグネチャ電流遮断を生じる。

【0013】

前記方法のいずれかの特定の実施態様において、第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在は、別々に検出される。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、プローブセットは、少なくとも1つの付加的な標的核酸の存在を別々に検出できる1つ以上の付加的なプローブ分子を更に含む。特定の実施態様において、付加的なプローブとは、付加的な別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含んでいるキャプチャ領域と、場合により末端領域とを有するプローブであり、その際、該プローブはポリマーラベルを欠如している。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、標的核酸は別個のゲノムDNA、mRNA、未熟miRNA、成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA、ノンコーディングRNA、核酸バイオマーカー又は合成アプタマー分子である。特定の実施態様において、プローブ分子の核酸キャプチャ領域は、約15ヌクレオチドから約30ヌクレオチドの長さである。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、第一のプローブ分子又は第二のプローブ分子の少なくとも1つの核酸キャプチャ領域は、その相補的な標的核酸の全配列と相補的な配列を含む。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、ポリグリコールは、ポリエチレンギリコール(PEG)、メトキシポリエチレンギリコール(MPEG)、ポリプロピレンギリコール(PPG)、ポリブチレンギリコール(PBG)及びこれらのコポリマーから成る群から選択される。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、キャプチャ領域と末端伸長部は、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択される。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部はキャプチャ領域の3'末端に共有結合されている。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部はポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dG)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dA)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dT)<sub>(27-33)</sub>及びポリ(dN)<sub>(27-33)</sub>(Nは、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び5-メチルシチジンのいずれかの組合せである)から成る群から選択される。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルと、第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルとは、それらの重合量が異なる。

【0014】

前記方法のいずれかの特定の実施態様において、第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレンギリコールであり、第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、第一のプローブ分子に付着しているポリエチレンギリコールとは異なる長さのポリエチレンギリコールである。前記方法のいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の5'又は3'共有結合の9残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着されている。上記方法のいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から5'又は3'に位置する末端伸長部の2番目から5番目の残基に付着されている。

10

20

30

40

50

## 【0015】

また、本明細書中で提供されるものは、  
 (i) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、  
 (ii) キャプチャ領域の5'末端、3'末端又は5'末端と3'末端との両方に共有結合している末端伸長部、及び  
 (iii) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベルを含むプローブ分子であり、該プローブ分子は、ナノポア系において標的核酸を検出するために提供される。

## 【0016】

特定の実施態様において、核酸キャプチャ領域は  
 (i) 標的核酸とハイブリダイズすることができる、又は  
 (ii) 標的核酸とハイブリダイズすることができ、また標的核酸の配列と相補的な配列を含む、  
 (b) 末端伸長部は、核酸キャプチャ領域の3'末端に共有結合されるポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>である、及び  
 (c) ポリマーラベルは、ポリ(dC)末端伸長部に付着している。

## 【0017】

上記プローブのいずれかの特定の実施態様では、標的核酸はゲノムDNA、mRNA、未熟miRNA若しくは成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA若しくはRNA、核酸バイオマーカー、又は合成アプタマーである。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、核酸キャプチャ領域は、約15ヌクレオチドから約30ヌクレオチドの長さである。上記プローブのいずれかの特定の実施態様では、核酸キャプチャ領域は、標的核酸の全配列と相補的な配列を含む。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、ポリ(dC)末端伸長部はポリ(dC)<sub>(30)</sub>末端伸長部である。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、ホモポリマー又はヘテロポリマーである。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、ポリグリコールは、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(MPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリブチレングリコール(PBG)及びこれらのコポリマーから成る群から選択される。前記プローブのいずれかの特定の実施態様において、キャプチャ領域と末端伸長部は、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択される。前記プローブのいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部はキャプチャ領域の3'末端に共有結合している。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、末端伸長部は、ポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dG)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dA)<sub>(27-33)</sub>、ポリ(dT)<sub>(27-33)</sub>及びポリ(dN)<sub>(27-33)</sub>(Nは、シトシン、グアノシン、アデノシン、チミン、非塩基、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び5-メチルシチジンのいずれかの組合せである)から成る群から選択される。上記プローブのうちいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の5'又は3'共有結合の9残基以内に位置している末端伸長部の残基に付着している。上記プローブのいずれかの特定の実施態様において、ポリマーラベルは、キャプチャ領域への共有結合から5'又は3'に位置している末端伸長部の2~5番目の残基に付着している。また、提供されるものは、少なくとも1つの別個の一本鎖標的核酸を検出する方法であり、該方法は次を含む：(a)サンプルを、上記プローブ分子のいずれかの少なくとも1つのセットと接触させて、プローブ分子をサンプル中に存在する標的核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされたサンプルを形成させ、その際、プローブ分子のセットは、少なくとも第一のプローブ分子と第二のプローブ分子を含む；(b)デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中で、ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ナノポア中に、ハイブリダイズされたプ

10

20

30

40

50

ロープ / 標的核酸複合体を捕捉し、かつハイブリダイズされたプローブと標的核酸とのアンジッピング・プロセスによる系のナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかける；及びc) 経時的にナノポア系中の電流パターンを分析し、その際、サンプル中の別個の一本鎖の標的核酸の存在が、ハイブリダイズされたプローブと標的核酸とのナノポアを通る移行に相応する別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される。

【0018】

図面の説明は以下の通りである：

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、プローブによりコード化されたナノポアを用いる核酸の多重検出の原理を示す。モデル（左）に示されているように、miRNA・プローブハイブリッドは、-へノリジンタンパク質ナノポア中に捕捉されている。各プローブは、特徴的タグ（赤）でラベルされている。種々のmiRNAは、異なってタグ付けされているプローブの使用により検出される。ノナポアの感知ゾーン中に捕捉されたこれらのタグ付けされたプローブ（左）は、別個のコンダクタンスレベルでシグネチャ遮断を生じることができる（右）。結果として、サンプル中の複数のmiRNAは、それらのシグネチャプロファイルに基づいて同定でき、かつ各タイプのシグネチャの出現度を数えることにより正確に量子化できる。

【図2】図2は、クリックケミストリーにより、PEG8とプローブであるmiR-155-プローブ-C30-アルキン2とのコンジュゲーションについてのMALDI-TOF-MSスペクトロスコピーの結果を示している。

【図3】図3は、種々のバーコードタグを有する4個のプローブとハイブリダイズしたmiR-155のシグネチャ電流遮断を示している。バーコード設計は、4個の識別可能な電流遮断レベルを生じ、これは特定のタイプのプローブに対する各遮断の正確なアサインメントを可能にした。10 mM Tris (pH 7.5) で緩衝された1M KCl中、+120 mVで電流を記録した。

【図4】図4は、種々にコード化された4個のプローブとハイブリダイズした4個のmiRNAによって生じたシグネチャ電流遮断を示す。特に、miR-155は変性無しのプローブにより、miR-182-5pはPEG3タグ付けプローブにより、miR-210はPEG-8タグ付けプローブにより及びmiR-21はPEG24-タグ付けプローブにより検出された。バーコード設計は、識別不可能な電流遮断レベルを有する4タイプのシグネチャを生じた。各タイプのシグネチャは、プローブによりコード化された1種類のmiRNAに相応する。10 mM Tris (pH 7.5) で緩衝された1M KCl中 +120 mVで電流を記録した。

【図5】図5は、1つのナノポア中の複数のmiRNAの同時検出を示す電流トレースを示す。4個のmiRNAは溶液中に存在する。miR-155は変性無しのプローブにより、miR-182-5pはPEG3タグ付けプローブにより、miR-210はPEG-8タグ付けプローブにより及びmiR-21はPEG24タグ付けプローブにより検出された。連続して生じるシグネチャ遮断は、種々の電流レベルを特徴とし、そのプローブと結合する種々のmiRNAを示している。

【図6】図6は、複数のmiRNA検出において計測したシグネチャ遮断の電流振幅ヒストグラムを示している。4個のmiRNAは、溶液中に存在している。miR-155は変性無しのプローブにより、miR-182-5pはPEG3タグ付けプローブにより、miR-210はPEG-8タグ付けプローブにより及びmiR-21はPEG24タグ付けプローブにより検出された。4個の別々の振幅ピークは、混合物中に共存する4個のmiRNAに割り当てられる。各ピークを覆っている面積は、miRNAの全遮断数とみなされる。これはmiRNA濃度に直線状に相関する。

【図7】図7は、例示的なナノポア感知システムの図式的説明を示している。図7に示されているように、感知チャンバー（1）は、シスコンパートメント（2）とトランスコンパートメント（3）を含み、これらはパーティション（4）により分けられている。両方のコンパートメントは、予め選択された1M KClのような記録溶液で満たされている。パーティション（4）は、1つの開口部（5）を有し、その真ん中の領域では、上方に脂質二重層が形成されており、ナノポア（6）は脂質二重層を通って差し込まれている。電力（7）は、2つのコンパートメント中の一組の電極を介して負荷される電圧を提供する；

10

20

30

40

50

電流検出器、例えば、ピコ - アンペア増幅器 (8) が連結されて電流変化をモニターする。試験に際し、標的オリゴヌクレオチドの混合サンプル (9) 及びその相補的プローブ (10) をシスコンパートメント (2) 中に装填した。

【図 8 a】図 8 a は、例示的な検出の間に記録された例示的な電流トレース、電流遮断事象の増幅された電気的特徴を説明している。

【図 8 b】図 8 b は、電流遮断に関連する相応するアンジッピング - 移行事象の図式的説明とを説明している。

【0020】

詳細な説明

上記のことを鑑み、本発明の幾つかの利点が達成及び獲得されることが分かるであろう。

10

【0021】

定義

本明細書で使用されているように、“シグネチャコンダクタンス遮断”というフレーズは、空のナノポアを通過する電流 (I) に対するナノポア中に所定の核酸 / プローブ複合体を捕捉することにより得られる電流遮断 (I<sub>b</sub>) の比率 (I<sub>b</sub> / I) を意味する。

【0022】

本明細書で使用されているように、“相補性”という用語は、互いにハイブリダイズできる 2 個の核酸を指して使用される場合には、完全に又は部分的に相補的な核酸を意味する。従って、プローブ核酸は、相補性の領域に 1 個、2 個、3 個、4 個又はそれより多くの塩基の不適合がある場合には、標的核酸に対して相補性を示すことができる。

20

【0023】

先行する定義のいずれかが本明細書中に参照して組み込まれている特許文献又は非特許文献に提供されている定義と不一致である限りにおいて、本明細書中に記載されている特許又は非特許参考文献、又はその他の場所で見出される特許又は非特許文献において、先行する定義が本明細書で使用されることになると解釈される。

【0024】

実施態様の更なる説明

複数のフォーマット中で別個の一本鎖オリゴヌクレオチドを感知的、選択的及び直接的に検出し、識別ならびに定量化できるようにする頑健なナノポア感知システムが本明細書中で提供される。更に本発明の感知技法は、複数のフォーマット中で別個の miRNA を識別するためにも使用できる。更に本発明の技法は、非侵襲的及び費用効率のよい初期診断ならびに患者の血液サンプル中のマーカーを連続的にモニタリングする可能性もある。

30

【0025】

1 つの幅広い態様では、本発明はプローブ、ナノポア、前記プローブ及びナノポアを含むキット、並びに関連する使用法にむけられ、これはサンプル中の 2 つ又はそれより多い別個のオリゴヌクレオチド標的の多重分析を提供する。特定の実施態様では、多重検出に使用されるプローブセットは“シグネチャ”電流遮断事象を提供し、これは第一のプローブと別個の第一のプローブ標的核酸との相互作用から生じる事象を、別個の第二のプローブと第二のプローブ標的核酸との相互作用から生じる他の事象と識別する。特定の実施態様では、別個のプローブ分子 / 標的核酸複合体から生じる識別事象で使用されるシグネチャ電流遮断事象は、“シグネチャコンダクタンス遮断”であり、これは空のナノポアを通過する電流 (I) に対するナノポア中に捕捉される所定の核酸 / プローブ複合体から得られる電流遮断 (I<sub>b</sub>) の比率 (I<sub>b</sub> / I) は、ナノポア中の種々の核酸 / ポア複合体を捕捉することから得られる比率 (I<sub>b</sub> / I) と識別できる。種々のプローブ分子 / 標的核酸ハイブリダイズ複合体を識別するために使用されるシグネチャ電流遮断事象の特徴には、次のもののうち少なくとも 1 つを含むことができるが、これに限定されるわけではない：i ) 様々な期間の電流遮断； i i ) 別個の電流遮断レベルの様々な数； i i i ) バックグラウンド電流遮断とは異なる種々の大きさの電流遮断レベルの出現頻度；又は i ) 、 i i ) 又は i i i ) のいずれかの組合せ。

40

50

## 【 0 0 2 6 】

特定の実施態様では、別個のプローブ分子 / 標的核酸複合体から生じる識別事象において使用されるシグネチャ電流遮断事象は、次のものうち少なくとも 1 つである： i ) 様々な期間の電流遮断； ii ) 別個の電流遮断レベルの様々な数； iii ) バックグラウンド電流遮断とは異なる種々の大きさの電流遮断レベルの出現頻度； iv ) シグネチャコンダクタンス遮断；又は ( i )、( ii ) 又は ( iii ) 及び / 又は ( iv ) のいずれかの組合せ。

## 【 0 0 2 7 】

特定の実施態様では、シグネチャ事象は、平らな脂質二重層系で - ヘモリシン ( HL ) 又は遺伝子操作されたその変異体により形成されるタンパク質ナノポアを含むナノポア系で提供される。特定の実施態様では、シグネチャ事象は、単一タンパク質ナノポアが埋まっているヒドロゲルにカプセル封入された脂質二重層により、又はマイクロドロプレット二重層系により形成されるバイオチップ中で提供することもできる。バイオチップとマイクロドロプレット二重層系は、記載されている ( Shim and Gu; Stochastic Sensing on a Modular Chip Containing a Single-Ion Channel Anal. Chem. 2007, 79, 2207-2213; Bayley H. et al. Droplet interface bilayers. Mol. Biosyst. 4, 1191-1208 (2008) )。

10

## 【 0 0 2 8 】

特定の実施態様では、シグネチャ事象を合成ナノポアにおいて提供することもできる。合成ナノポアには、窒化ケイ素又はグラフェンを含むナノポアが含まれるが、これらに限定されるわけではない。デュアルコンパートメントナノポア系の一般的な特徴は、図 7 に記載されている。プローブ / 標的核酸ハイブリダイゼーション複合体の捕捉から生じる電流遮断事象の一般的な特徴、及びそれに引き続くプローブと標的のアンジッピングと移行は図 8 に記載されている。PCT 公報 WO2012009578 には、デュアルコンパートメントナノポア系及びプローブ / 標的核酸ハイブリダイゼーション複合体の捕捉から生じる電流遮断、ならびにそれに引き続くプローブと標的のアンジッピングと移行が記載されている。PCT 公報 WO2012009578 を参照して本明細書にそのまま取り入れることとする。

20

## 【 0 0 2 9 】

本発明の特定の実施態様は、標的核酸を検出するための 1 つ以上のプローブ分子を提供する。特定の実施態様では、標的核酸は一本鎖の核酸であり、かつ特定の実施態様では、標的核酸は miRNA である。プローブ分子の構造は次のものを含む： ( i ) 核酸キャプチャ領域； ( ii ) 核酸キャプチャ領域に共有結合する 1 つ以上の末端伸長部；及び ( iii ) プローブ分子に付着されているラベル。核酸キャプチャ領域は、標的核酸にハイブリダイズし、その検出を可能にするプローブの部分である。通常の当業者のうち一人は、標的核酸が核酸配列を含むことを理解するであろう。特定の実施態様では、核酸キャプチャ領域は標的核酸の配列と相補的な配列を有する。標的核酸には、約 18 ~ 約 24 ヌクレオチド、ヌクレオ塩基の残基長さである miRNA が含まれるがこれに限定されるわけではない。特定の実施態様では、核酸キャプチャ領域は、標的核酸に相補的な少なくとも約 4、6、8、10、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 個のヌクレオチド又はヌクレオ塩基の残基を有する。一般的に、キャプチャ領域と標的核酸の間で相補的な配列の長さが長いほど、プローブはより特異的になる。特定の実施態様では、核酸キャプチャ領域は、標的核酸の全配列と相補的な配列を含む。本明細書中で提供されるプローブのキャプチャ領域は、標的分子を捕捉するために使用される。特定の実施態様では、キャプチャ領域は標的配列に完全に相補的であるか又は部分的に相補的であることができる。特定の実施態様では、キャプチャ領域は、天然ヌクレオチド ( A、T、G、C ( DNA ) ) 又は a、u、g、c ( RNA ) を含むオリゴヌクレオチド及び / 又はイノシン、キサントシン、7 - メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び 5 - メチルシチジンのようなヌクレオシドを含む人工ヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されるわけではない。特定の実施態様では、キャプチャ領域はロック核酸 ( LNA ) 又はペプチド核酸 ( PNA ) を含むことができる。ロック核酸は、リボース環が 2 位 - 酸素と 4 位

30

40

50

- 炭素の間にメチレン結合を含む場合にはRNA誘導体を含む。ペプチド核酸(PNA)は、又クレオ塩基側鎖を有するペプチド骨格を含む。特定の実施態様では、LNA又はPNAキャップチャ領域は、天然ヌクレオ塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシン又はウラシル)、及び/又は、ヒポキサンチン、キサントシン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル及び5-メチルシトシンを含む人工ヌクレオ塩基を含むことができるが、これらに限定されるわけではない。特定の実施態様では、オリゴヌクレオチド、LNA又はPNAのコポリマーを含むプローブキャップチャ領域が提供される。特定の実施態様では、プローブのキャップチャ領域は、標的核酸に相補的である少なくとも約4、6、8、10、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個のヌクレオチド又はヌクレオ塩基の残基を有するであろう。特定の実施態様では、プローブの中心領域は、標的核酸に相補的な少なくとも約4、6、8、10、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個から約30、35、40、又は50個のヌクレオチド又はヌクレオ塩基の残基のいずれかを有するであろう。特定の実施態様では、配列に挿入された合成ヌクレオチド又はヌクレオ塩基は、一本鎖ヌクレオチドの多形性、メチル化のような標的の特徴、又はmiRNAとその標的メッセンジャーRNAとの間の相互作用を識別することができるように、標的とのハイブリダイゼーションエネルギーを正確に調節することができる。

10

## 【0030】

本明細書中で提供されるプローブ分子は、それらの5'及び/又は3'末端の一方又は両方で末端伸長部を含むことができる。

20

## 【0031】

1つ以上の末端伸長部は、3'末端、5'末端、又は両方でキャップチャ領域に共有結合していてもよい。プローブ分子の末端伸長部は、いずれかの長さの、電荷を帯びた又は親水性ポリマーを含むことができる。特定の実施態様では、末端伸長部ポリマーは負に荷電した一本鎖核酸であることができる。このような核酸末端伸長部の利点には、極めて低コストでの合成及びpH、塩濃度及び温度による調節可能な電荷が含まれるが、これに限定されるわけではない。このような核酸伸長部は、ホモポリマー、ヘテロポリマー、コポリマー又はそれらの組合せを含むことができる。特定の実施態様では、このような核酸末端伸長部の長さは、約1又は2ヌクレオチド~約50ヌクレオチドの範囲であることができる。なお他の実施態様では、核酸伸長部は約5~約40ヌクレオチド、約15~約35ヌクレオチドの長さの範囲、又は約20~約35ヌクレオチドの長さの範囲であることができる。ここで提供される例示的な末端伸長部は、ホモポリマーポリ(dC)<sub>30</sub>である。しかし、CTCTCTCT...、又はCATCATCAT...、のようなジ-又はトリ-ヌクレオチドヘテロポリマーを含むヘテロポリマー配列も使用できるが、次のものに限定されるわけではない。非塩基は、塩基を有さないが、ホスフェートにより提供される負の電荷を有するヌクレオチドである。非塩基の大きさが通常のヌクレオチドよりも狭いので、近隣のヌクレオチドにより形成されるシグナルとは異なるシグネチャ事象を生じてもよい。特定の実施態様では、末端伸長部はポリ(dC)伸長部である。特定の実施態様では、末端伸長部はキャップチャ領域の3'末端に共有結合されるポリ(dC)伸長部である。ポリ(dC)伸長部の長さは、約30ヌクレオチド又はヌクレオ塩基の残基であってもよく、例えば、27と33の間(ポリ(dC)(27~33))であり、及び好ましくはポリ(dC)(30)である。

30

## 【0032】

プローブ分子末端伸長部は、ポリペプチドを含むこともできる。アミノ酸のより豊富な選択は、オリゴヌクレオチド末端伸長部よりもポリペプチド末端伸長部の配列及び官能性をよりプログラム可能なものにする。例えば、ポリペプチド末端伸長部は、最適化された位置への荷電性アミノ酸の挿入を可能にし、より識別可能なプローブ/標的シグネチャ事象を生じる。追及が理論に制限されないが、プローブ/標的複合体は、適切な電圧の下に正に荷電したポリペプチド末端伸長部を含むプローブを使用して選択的に捕捉でき、他方で、混合物中のその他の負に荷電した標的ではない全てのオリゴヌクレオチドはポアに侵

40

50

入することを妨げられ、その結果、極めて選択的な検出を生じると考えられている。特定の実施態様では、ポリペプチド末端伸長部は、正電荷を有することができる2個、3個、4個又はそれ以上のアミノ酸残基を含むことができる（すなわち、リジン及び／又はアルギニン及び／又はヒスチジン）。特定の実施態様では、正に荷電した十分な数の残基は、ポリペプチド末端伸長部に含まれ、プローブが標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる場合に正味の正電荷を提供する。正電荷を有する末端伸長部を含んでいるプローブがリジン、アルギニン又はヒスチジンのような残基により付与される特定の実施態様では、関連するナノポアに基づく検出法の性能は、酸性条件（すなわち、pH値が7未満の場合）下に、又は残基がプロトン化される条件下に向上させることができる。

## 【0033】

10

従って、約1～約6.9、1～約6.0、約1～約5.5、約3～約5.5及びそのようなpH値でこのようなプローブは使用される。特定の実施態様では、このようなペプチド末端伸長部の長さは約1又は2残基から約30残基の範囲であることができる。なお他の実施態様では、ポリペプチド伸長部は、約5～約20残基、約8～約20残基、又は約8～約15残基の長さの範囲であることができる。例示的な実施態様では、正に荷電したアルギニン及びリジン残基を含むHIV-TATポリペプチドは、末端伸長部として使用できる。特定の実施態様では、標的オリゴヌクレオチドに相補的なプローブの中心領域は、正電荷を有するアミノ酸を含んでいる末端伸長部に共有結合するペプチド核酸を含むことができる。特定の実施態様では、ペプチド核酸を含んでいる中心領域は、正電荷を有するアミノ酸を含んでいる末端伸長部と組み合わせて使用され、プローブが標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる場合に、正味の正電荷を提供する。

20

## 【0034】

特定の実施態様では、以下に限定されるわけではないが、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、チロキシンなどを含む芳香族側鎖を有するアミノ酸を含むポリペプチド末端伸長部を、ポリペプチド末端伸長部に挿入することができる。追及が理論により制限されないが、このような芳香族アミノ酸は芳香族の積み重ねを通じてポアと相互作用でき、かつナノポアに基づく検出法において得られるシグネチャで有用な変化を提供すると考えられている。

## 【0035】

30

ラベルは、プローブ分子のキャプチャ領域、又はプローブ分子の3'若しくは5'末端伸長部に付着させることができる。特定の実施態様では、ラベルは、5'若しくは3'末端伸長部、又は5'若しくは3'末端伸長部の両方に付着している。またラベルは、3'末端伸長部又は3'末端ポリ(dC)伸長部に付着することもできる。ラベルはホモポリマー若しくはヘテロポリマーのようなポリマーであってもよい。特定の実施態様では、ラベルは少なくとも適度に親水性であるか又は親水性である。ポリマーラベルの実例には、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ポリアミン、ポリペプチド及びポリグリコールが含まれる。

## 【0036】

40

ポリアミンに対する核酸の付着方法は、J. Med. Chem. 2003, 46, 5478-5483に記載されている。核酸に対するペプチドの付着方法は、Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 5565-5568に記載されている。ラベルはプローブ分子に共有的に付着してもよい。ラベルは、プローブ分子の残基中への反応性部分の挿入によりプローブ分子に付着できる。特定の実施態様では、ラベルはクリックケミストリーによりプローブ分子に付着できる。アジド基と末端アセチレンの間の金属接触反応を伴うクリックケミストリーは、少なくとも米国特許第7375234号に記載されている。これを本明細書に参照してそのまま取り入れることとする。ペプチドとオリゴ糖を含む様々な対象分子を核酸に結合するクリックケミストリーの適用も記載されている (El-Sagheer and Brown Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 1388-1405)。クリックケミストリーの適用にオリゴ糖を誘導化する方法は、記載されている (Chem. Lett. 2013, 42, 197-199)。プローブ分子をペプチド及びクラウンエーテルでラベリングする様々な技法は記載されている<sup>31, 32, 39</sup>。このように、Cu<sup>+</sup>接触によるクリック

50

クケミストリー、アジドと反応するシクロオクチニンのようなシクロ化合物、マレイミドと反応するチオール基、メタンチオスルホネート (MTS) 付着ホモ又はヘテロポリマーを使用する銅不含クリックケミストリー、ならびにヌクレオチド上にラベルできるチオール含有ピリジン変種を含む方法によりラベルをプローブに結合できるが、これらの方法により限定されるわけではない。1つの例示的かつ限定されないこの方法の実施態様は、以下の例4に記載されている。ラベルが3'末端伸長部に共有的に付着している特定の実施態様では、伸長部はキャップチャ領域の3'末端の9残基以内に位置するのが好ましく、キャップチャ領域の3'末端の2番目又は3番目の残基に位置するのが好ましい。その標的核酸とハイブリダイズする場合には、ハイブリダイズしたプローブ分子はナノポアのシグネチャコンダクタンスにおいて減少を生じ得る。同じ末端伸長部に共有結合しているが、ラベルを欠如している同じキャップチャ領域を含む他のプローブ分子と比べた場合に、ラベルされたプローブ分子はナノポアのシグナルコンダクタンスを下げる。

## 【0037】

プローブセットのプローブ分子に付着するラベルは、ポリマー分子、例えばホモポリマー及びヘテロポリマーであってもよいがこれらに限定されるわけではない。この実例には、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ポリペプチド、ポリアミン及びポリグリコールが含まれるがこれらに限定されるわけではない。使用できるポリグリコールラベルは、ポリエチレングリコール (PEG)、メトキシポリエチレングリコール (MPEG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリブチレングリコール (PBG) 及びこれらのコポリマーが含まれるが、これらに限定されるわけではない。プローブ分子のセットに引き合いに出された特定の実施態様では、ある1つのプローブ分子のラベルは、該ラベルが異なるタイプのポリマー分子である点において他のプローブ分子のラベルとは異なる。特定の実施態様では、ある1つのプローブ分子のラベルは、該ラベルが同じタイプのポリマー分子であるが、しかしそれらの重合の量の点で異なる点において他のプローブ分子のラベルとは異なる。特定の実施態様では、第一のプローブ分子のポリ (dC) 伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレングリコールであり、付加的なプローブ分子のポリ (dC) 伸長部に付着しているラベルもポリエチレングリコールであるが、第一のプローブ分子に付着しているポリエチレングリコールとは異なる長さのものであり、及び/又は他のプローブ分子に付着しているラベルとは異なる長さのものである。

## 【0038】

種々の長さのポリエチレングリコール (PEG) の実例には、PEG3、PEG8及びPEG24が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

## 【0039】

特定の実施態様では、ポアのトランス - 開口部で負に荷電した環を有するナノポアを使用できる。この文脈上、ポアのトランス開口部とは、分子が出ると考えられるポアの部分であると解釈されるのに対して、ポアのシス開口部は分子が入ると考えられる部分であると解釈される。これらの実施態様では、ポアのトランス開口部で負に荷電した環は、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するように適切に合成及び/又は誘導化されたどのタイプのナノポアを使用しても得られると解釈される。このようなポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するナノポアには、タンパク質ナノポア及び合成ナノポアが含まれるがこれに限定されるわけではない。ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するタンパク質ナノポアには、-ヘモリシンタンパク質の遺伝子操作された変異体が含まれるがこれに限定されるわけではない。特定の実施態様では、遺伝子操作されたヘモリシン変異体は、K131D、K131E又はK131Hアミノ酸置換を含む黄色ブドウ球菌ヘモリシンを有することができる。

## 【0040】

例示的かつ限定されない黄色ブドウ球菌ヘモリシン野生型配列は、WO2012009578に提供されている（配列番号20として、核酸コード領域；配列番号21：タンパク質コード領域、これらを各々参照してそのまま取り入れることとする）及びその他の場所で入手可能なものの（National Center for Bioinformatics or GenBank Accession Numbers M9053

10

20

30

40

50

6及びAAA26598）。例示的かつ限定されないK131D置換を含んでいる黄色ブドウ球菌ヘモリシン変異体は、WO2012009578に遺伝子配列番号22として提供されている。特定の実施態様では、遺伝子操作されたヘモリシン変異体は、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を提供する部分で誘導化された適切に誘導化変異体を含むことができる。置換又は誘導化し、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するタンパク質ナノポアを提供できる例示的野生型黄色ブドウ球菌のヘモリシンタンパク質は、WO2012009578に配列番号21として提供されている。しかし、ポアを形成できる他のヘモリシンの変異体も置換又は誘導化し、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するタンパク質ナノポアを提供できる。ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有する合成ナノポアもまた提供される。特定の実施態様では、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を有するこのような合成ナノポアには、ポアのトランス開口部で負に荷電した環を提供する部分で適切に誘導化された窒化ケイ素又はグラフェンナノポアが含まれるが、これに限定されるわけではない。PCT公報WO2012009578を参照して本明細書にそのまま取り入れることとする。

10

#### 【0041】

本発明の特定の実施態様は、少なくとも2個の標的核酸で検出するためのプローブ分子のセットを提供する。すなわち、種々の標的核酸の多重検出を可能にするか、又はラベル以外は構造が同一であるプローブ分子に付着されているときに種々のタイプのラベルの間での比較が可能となる。このプローブ分子のセットは、少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び第二のプローブ分子を含み、それぞれ本発明のプローブ分子の構造を含んでいる。特定の実施態様では、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は第一の標的核酸とハイブリダイズし、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は第二の標的核酸とハイブリダイズする。特定の実施態様では、第一のプローブ分子のラベルは第二のプローブ分子のラベルとは異なる。特定の実施態様では、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸の配列とハイブリダイズする配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸の配列とハイブリダイズする配列を含み、第一のプローブ分子のラベルは、第二のプローブ分子のラベルとは異なる。このように、第一の核酸標的にハイブリダイズするプローブ分子及びその結果として生じるナノポア検出系で検出されるそのシグナルを、第二の核酸標的にハイブリダイズするプローブ分子およびその結果生じるナノポア検出系で検出されるそのシグナルと識別することができる。特定の実施態様では、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸の配列と相補的な配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸の配列と相補的な配列を含む。

20

30

30

#### 【0042】

特定の実施態様では、第一のプローブ分子のラベルは、第二のプローブ分子のラベルとは異なる。特定の実施態様では、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸の配列と相補的な配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸の配列と相補的な配列を含み、かつ第一のプローブ分子のラベルは第二のプローブ分子のラベルとは異なり、このように第一の核酸標的に相補的な配列を含んでいるプローブ分子及びその結果生じるナノポア検出系で検出されるそのシグナルを、第二の核酸標的に相補的な配列を含んでいるプローブ分子及びその結果生じるナノポア検出系で検出されるそのシグナルと識別することができる。

40

#### 【0043】

プローブセットは、例えば、付加的な標的核酸を検出するために2つよりも多いプローブ分子を含んでいてもよい。付加的なプローブ分子は、第一の標的核酸の配列及び/又は第二の標的核酸の配列とは異なる標的核酸とハイブリダイズするか、又はハイブリダイズし、かつ相補的な配列を有していてもよい。付加的なプローブ分子は、第一のプローブ分子のラベル及び/又は第二のプローブ分子のラベルとは異なるラベルを含んでいてもよい。特定の実施態様では、付加的なプローブ分子はラベルを欠如していてもよい。特定の実施態様では、付加的なプローブ分子は、第一の標的核酸の配列と第二の標的核酸の配列とは異なる標的核酸の配列とハイブリダイズするか、又はハイブリダイズし、かつ相補的な

50

配列を含んでいてもよく、また第一のプローブ分子のラベル及び第二のプローブ分子のラベルとは異なるラベルを含んでいてもよく、従って付加的なプローブ分子、ならびにそれらの結果生じるナノポア検出系において検出されるそのシグナルを、プローブ分子のセット中の第一、第二及び／又はその他の分子と識別することができる。

【0044】

特定の実施態様において、それらの標的核酸にハイブリダイズする場合に、本発明のこの局面のハイブリダイズされたプローブ分子は、同じ末端伸長部に共有結合している同じキャップチャ領域を含んでいるが、ラベルを欠如しているプローブ分子と比べて、ナノポアのシグネチャコンダクタンスを下げるが、これはラベルを欠如したプローブ分子が標的核酸にハイブリダイズする場合である。1つのプローブ分子のラベルが付加的なプローブ分子のラベルと異なる場合、例えば、同じ末端伸長部に共有結合する同じキャップチャ領域を含んでいるが、異なるタイプのラベルを有するか、又は重合度の異なるラベルを有する異なるプローブ分子の場合は、ハイブリダイズされた第一のプローブ分子により引き起こされるナノポア検出系におけるシグネチャコンダクタンスの減少は、ハイブリダイズされた付加的なプローブ分子により引き起こされるシグネチャコンダクタンスにおける減少とは異なる。このことは、標的核酸にハイブリダイズした種々のプローブ及びそれらの結果として生じるそのシグナルを、本発明の複数のナノポア系において区別して検出できるようになる。1つのプローブ分子のラベルが付加的なプローブ分子のラベルと異なる場合、例えば、異なるタイプのラベルを有するか又は異なる重合度を有するラベルの場合、また異なるプローブ分子が異なる標的核酸にハイブリダイズする異なる核酸キャップチャ領域を有する場合には、ハイブリダイズされた第一のプローブ分子により引き起こされるシグネチャコンダクタンスにおける減少は、ハイブリダイズされた付加的なプローブ分子により引き起こされるシグネチャコンダクタンスにおける減少とは異なり、このことは種々の標的核酸にハイブリダイズした種々のプローブ及びそれらの結果として生じるそのシグナルを、本発明の複数のナノポア系において識別して検出可能にし、従って、複数の標的核酸の多重同定を可能にする。

10

20

30

40

【0045】

本発明の特定の実施態様は、少なくとも2個の標的核酸で検出する多重方法を提供する。該方法の特定の実施態様では、標的核酸は一本鎖の核酸であり、また特定の実施態様では、一本鎖標的核酸はmiRNAである。標的核酸はサンプル中で検出される。実例には、組織、血液又は核酸を含有する他の体液及びそれらから誘導される核酸含有の液体のサンプルが含まれる。サンプルを、本明細書で記載した構造体を含んでいる少なくとも第一のプローブ分子と第二のプローブ分子のセットと接触させる。第一のプローブ分子の核酸キャップチャ領域は、第一の標的核酸の配列を認識する配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャップチャ領域は、第二の標的核酸の配列を認識する配列を含む。第一のプローブ分子のラベルは、第二のプローブ分子のラベルとは異なる。プローブ分子は、サンプル中の核酸標的とのハイブリダイズを可能にし、ハイブリダイズされた標的核酸・プローブ複合体のハイブリダイズされたサンプルを形成する。例示的ハイブリダイズ条件は、サンプルとプローブ分子を95℃で10分間接触させ、次にこの混合物を徐々に室温まで冷却させてハイブリダイズされたサンプルを形成する。ハイブリダイズされたサンプルは、デュアルチャンバーナノポア系のシス側に添加され、かつイオン流をこの系のナノポアに通過させる。シグネチャコンダクタンスを測定し、かつ経時的にナノポア系のイオン流パターンを分析することができる。コンダクタンスレベルの減少は、ナノポア中に捕捉されたハイブリダイズされたプローブの不活性化を示している。特定のラベルを有する第一のプローブ分子にハイブリダイズする第一の標的核酸のサンプル中の存在及び異なるラベルを有する第二の標的核酸の存在が、異なるレベルの減少したコンダクタンスを生じるので、第一のプローブ分子と第二のプローブ分子の存在と量を多重様式で別々に検出することができる。

【0046】

複数の標的核酸又はオリゴヌクレオチドは、プローブ分子、プローブ分子セット、ナノポア、プローブ分子及びプローブ分子セットを含んでいるキット、ならびに本明細書で提

50

供される方法におけるこのプローブ分子及びプローブ分子セットの関連した使用によって、多重アッセイにおいて検出可能であり、かつ他の標的核酸から識別できる。特定の実施態様では、標的は、細胞、体液、組織、細菌又はウイルスからの核酸又はその断片であることができる。特定の実施態様では、標的はPCR産物又は合成ヌクレオチドであることができる。特定の実施態様では、標的はゲノムDNA、mRNA、未熟miRNA、成熟miRNA、人工miRNA、ノンコーディングDNA若しくはRNA、核酸バイオマーカー、又は合成アプタマー分子を含むことができる。特定の実施態様では、miRNA標的は、プラズマ及びホルマリン固定及びパラフィン埋没組織のようないずれかの組織からの生体液からのRNA抽出物から由来してよい。特定の実施態様では、標的核酸は、いずれかの核酸結合タンパク質と複合化した核酸断片、抗体、又は標的タンパク質と結合したアプタマーを含むことができる。特定の実施態様では、標的核酸は、これに限定されるわけではないが薬品を含む低分子量化合物と複合化された核酸断片を含むことができる。特定の実施態様では、標的は突然変異を有する配列、1ヌクレオチド遺伝子多型を有する配列、又はメチル化及びリン酸化のような化学変性を有する配列を含むことができる。

10

#### 【0047】

研究では、異常型miRNAレベルが多く癌の進行と関連し、このことがmiRNAに癌のバイオマーカー<sup>2</sup>としての可能性があることを示している。miRNAは、著しい安定性<sup>3,4</sup>で組織から血液に放出することができ、循環性miRNAの検出が非侵襲的癌診断及び臨床<sup>3-5</sup>用の新規ストラテジーとなる。

20

#### 【0048】

本発明の特定の局面では、ラベル又はmiRNA<sup>6</sup>の増殖の必要が無く、循環性miRNAの正確な検出のためのナノポアの单分子センサーを提供する。例えば、肺癌患者のような癌患者からの循環性miRNAの検出が行われる。バーコードストラテジーは、一連のラベルコード化されたプローブを利用し、1つのナノポアの使用により多重のmiRNAバイオマーカーを同時検出する。これは新規の多重のmiRNA検出法である。各々のプローブはバーコードラベルで化学的にラベルされる(図1左のパネル)。ポアの感知ゾーンにおけるバーコードラベルの捕捉は、別個のシグネチャコンダクタンスレベルを生じ、これがプローブによりハイブリダイズされるmiRNAのタイプの同定を可能にする。図1の右のパネルにより示されているように、ラベル(Tag)1とラベル(Tag)2でラベルされたプローブは、2個の別個のシグネチャを生産する。コンダクタンスレベルを分けることにより、2つのプローブにより結合されたmiRNA種を識別することができ、かつ複数のmiRNAを1つのポア中で同時に検出できる。

30

#### 【0049】

実施例は本発明の原理を最も良く説明するために選択及び記載されているものであり、その実用は他の当業者が本発明を様々な実施態様において、及び試みようとする実際の使用に合うように様々な変更を加えて最も良く利用することを可能にする。

40

#### 【0050】

##### 実施例

以下に開示された実施態様は単に本発明の代表であり、これを様々な形で具体化してもよい。従って、本明細書で開示された特殊な構造及び機能的詳細は限定されたものとしてみなされない。

#### 【0051】

##### 例1 多重核酸検出

###### 1. 材料と方法

化学式：

1. 11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (PEG3) (Jena Bioscience、ドイツ)

【化1】



【0052】

2.0-(2-アミノエチル)-0'-(2-アジドエチル)ヘプタエチレングリコール  
(PEG8) (Jena Bioscience、ドイツ)

【化2】

10

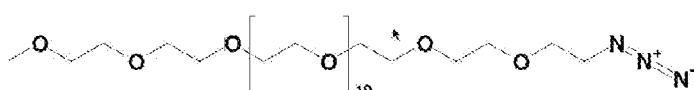


【0053】

3.1-[2-(2-2-[2-(2-2-[2-(2-2-[2-(2-アジド-エトキシ)-エトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ-エトキシ)-エトキシ]-2-メトキシ-エタン (PEG24) (Jena Bioscience、ドイツ)

【化3】

20

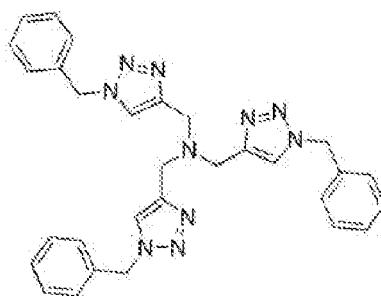


【0054】

4. 酢酸ナトリウム (CH<sub>3</sub>COONa, S8750-500G) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
5. 臭化銅 (I) (CuBr, 254185-10G) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
6. エタノール (CH<sub>3</sub>COOH, E7023-500ML) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
7. Tert-ブタノール ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COH, 471712-100ML) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
8. ジメチルスルホキシド (DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, D8418-50ML) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
9. トリス [(1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾ-ル-4イル)メチル]アミン (TBTA, 678937-50MG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

【化4】

30



40

10. ヌクレアーゼ不含水 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)。

【0055】

DNAとRNA：

全てのmiRNAとそれらのDNAプローブ（標準設計）を統合DNA技術により合成した。各miRNAについて、1つのプローブが3'ポリ(C)<sub>30</sub>のオーバーハングに隣接し、その他はク

50

リックケミストリーにより 2 番目と 3 番目のシトシンの間に、内部 5'-オクタジニルdUを挿入した。RNAとDNA配列は以下に記載してある：

## 【化 5】

## 1. miR-155

rUrUrArArUrGrCrUrArUrCrGrUrGrArUrArGrGrGrGrU (配列番号1)

## 2. miR-155- プローブ-C30

ACC CCT ATC ACG ATT AGC ATT AAC CCC CC (配列番号2)

10

## 3. miR-155- プローブ-C30-アルキン2

ACC CCT ATC ACG ATT AGC ATT AAC CNCC CCC CC (配列番号3)

## 【 0 0 5 6 】

【化 6】

- #### 4. miR-21

rUrArGrCrUrUrArUrCrArGrArCrUrGrArUrGrUrUrGrA (配列番号4)

- ## 5. miR-21-プローブ -C30

T CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA CCC (配列番号5)

10

- ## 6. miR-21-プローブ -C30- アルキン2

T CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA CC/i5OctdU/C CCC (配列番号6)

- ## 7. miR-210

rCrUrGrUrGrCrGrUrGrUrGrArCrArGrCrGrCrUrGrA (配列番号7)

30

- ## 8. miR-210-プローブ-C30

TCA GCC GCT GTC ACA CGC ACA GCC CCC C (配列番号8)

- ### 9. miR-210-プローブ-C30-アルキン2 (内部5-オクタジニルdU変性)

TCA GCC GCT GTC ACA CGC ACA GCC /i5OctdU/CCC CCC C (配列番号9)

30

- ## 10. miR-182-5p

rUrUrUrGrGrCrArArUrGrGrUrArGrArArCrUrCrArCrArCrU (配列番号10)

- ## 11. miR-182-5p-プローブ-C30

AGT GTG AGT TCT ACC ATT GCC AAA CCC (配列番号11)

40

- ## 12. miR-182-5p- プローブ -C30- アルキン2

AGT GTG AGT TCT ACC ATT GCC AAA CC/i5OctdU/C CCC CCC CCC CCC  
CCC CCC CCC CCC CCC (配列番号12)

【 0 0 5 7 】

1つのmiRNA / プローブをハイブリダイズするために、miRNA 500  $\mu$ M及びそのDNAプロ

50

ープ 500 μMを混合し、かつ 95 未満で 10 分間溶かし、かつ次に室温まで徐々に冷ました。複数のmiRNA / プローブをハイブリダイズするために、関与している全てのmiRNA とそれらのプローブ（様々なPEGタグ無しと有り）を全て 250 μMの濃度で、95 未満で 10 分間混合した。次にナノポア実験のために混合物を徐々に室温まで冷ました。

【0058】

装置：

以下の装置をクリックケミストリーに使用した：

1. コントロール環境系 25 インキュベーターカー (New Brunswick Scientific Co., INC., Edison, NJ)

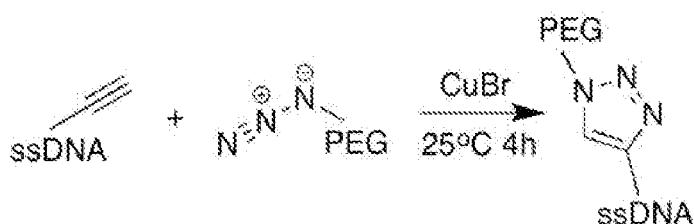
2. 遠心分離機 5415C (Eppendorf, Hauppauge, NY)

3. Maxi Mix I Type 16700 Mixer (Thermolyne)

バーコードタグでのDNAプローブのラベリング：

クリックケミストリーによりDNAプローブをPEGタグでラベルした。クリックケミストリー反応は以下のスキームに示されている。特殊なプロトコールには以下のものが含まれる：

【化7】



【0059】

1. t-BuOH 1ml と DMSO 3ml を混合し、及び混合物を 3 : 1 の DMSO / t - BuOH 溶剤が得られるにボルテックスする。

【0060】

2. CuBr 1 mg を 3 : 1 DMSO / t - BuOH 溶剤 70 μl 中に溶かし、0.1M 溶液を得られるようにする。この溶液は、新たに調製しなくてはならず、かつ貯蔵できない。

【0061】

3. TBTA 54 mg を 0.1M 溶液中の 3 : 1 DMSO / t - BuOH 溶液 1 mL 中に溶かし、かつ溶液を -20 で貯蔵する。

【0062】

4. 0.1M CuBr 溶液 10 μl を 0.1M TBTA 溶液 20 μl に素早く加え、クリック溶液を得る。

【0063】

5. クリック溶液 (DMSO / t - BuOH 3 : 1 中、0.1M CuBr / 0.1M TBTA 1 : 2) を使用前に新たに調製する。

【0064】

6. アルキン変性一本鎖DNAプローブをミリポア水中に溶かし、2 mM DNA溶液を得る。

【0065】

7. アジド変性PEGを 3 : 1 DMSO / t - BuOH 溶剤に溶かし、50 mM PEG 溶液 w を得る。

【0066】

8. NaOAc 0.2461 g を 10 mL ミリポア水中に溶かし、0.3 M NaOAc 溶液を得る。

【0067】

9. DNA溶液 (2 mM、20 nmol) 10 μl と PEG溶液 (50 mM、50 nmol) 2 μl を混合し、及び引き続き新たに調製したクリック溶液 3 μl を混合物に加える。混合物をよく混合し、及び 250 rpm で室温 (25) で 4 時間混ぜる。

10

20

30

40

50

## 【0068】

10. 反応混合物を0.3M NaOAc (120μl) で希釈し、及びDNAを1.5m1冷エタノールを使用して沈殿させる。

## 【0069】

11. 混合物を12000rpmで10分間遠心分離し、次に上澄み液を取り除き、及び沈殿物を冷エタノール1m1で2回洗浄し、及び混合物を12000rpmで10分間遠心分離する。

## 【0070】

12. 沈殿物（精製したラベルDNA）をヌクレアーゼ不含水18μl中に再度溶解させ、更に精製せずに使用できる。

10

## 【0071】

## シングルチャネル・レコーディング：

1, 2 - デフタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリンの膜を、2つの同じテフロンチャンバーを分けるテフロン隔膜中の小さなオリフィス上に形成した。各チャンバーは、電解溶液2mLを含有している (1M KC1、10mM Tris、pH7.4)。ヘモリシン1μg未満を攪拌しながら1つのチャンバー（本明細書中ではシスチャンバーと称される）に加え、コンダクタンスが上昇した後に、シングルチャネルの形成が示され、次にこのシングルチャネルをmiRNAに使用し始めた。miRNAとそのハイブリダイズされたプローブサンプル（すなわち、ハイブリダイズされたプローブ／標的核酸複合体）をイオン流の記録のためにシス側に添加した。 - ヘモリシンチャネルを通過するイオン流をAxoPatch 200B增幅器（Molecular Devices社、Foster City, C.A）により測定した。データを増幅し、Dig iData 1440 A（Molecular Devices社）でデジタル化し、及びpClamp 10.0プログラム（Molecular Devices社）を使用してコンピューター上で保存した。データ分析は、pClamp suite softwareを使用して実施した。

20

## 【0072】

2. 結果

## PEGタグでのDNAプローブのラベリング：

ナノポアセンサー中のプローブは、標的miRNAでハイブリダイズするためのキャプチャ領域と、3'末端に結合するポリ(dC)<sub>30</sub>オーバーハングとの2つの領域から成り、これはキャプチャ速度の増進に寄与し、及びmiRNA・プローブ複合体のシグネチャを形成する。ナノポア中に捕捉された場合に、ポリ(dC)<sub>30</sub>オーバーハングは、ポアの - バレル（5nm長さ）を曲がりくねって通り抜ける。コンダクタンスの変化は、この領域内一本鎖DNAに極めて感受性がある。以前の研究は、この領域内一本鎖DNAの1塩基を識別できることを示している<sup>36, 37</sup>。延長された一本鎖DNAに関しては、隣接するヌクレオチドの間の距離は、0.6~0.7nm<sup>38</sup>である。これは、キャプチャ領域の隣の初めの8~9個のシトシンだけが - バレルを占めることを意味する。ラベリング箇所は、好ましくはこれらの最初の8~9シトシンの範囲内である。この箇所は好ましくはキャプチャ領域に近すぎてはならない（例えば、1番目のシトシン）。なぜならば、これはmiRNA・プローブのハイブリダイゼーションに影響を与えるからである。他方で、ポアの入り口に近いラベリング（例えば6番目のシトシン）はあまり感受性ではなく、別個のシグネチャを生じるのが困難であり得る。従って、3番目のシトシンは、好ましいラベリング箇所であると考えられる。この研究では、プローブを種々のサイズのPEGでラベルし、シグネチャを別個のコンダクタンスのレベルに変化させる。クリックケミストリーを使用して、PEGとDNAプローブをコンジュゲートさせた。クリックケミストリーは簡素でありかつ迅速である；クリックケミストリーを可能にするPEGは市販されている（材料と方法の項目を参照）。ラベリングの手法は材料と方法の項目に記載されている。図2に結果が出されている質量分光法（MALDI-TOF-MS）は、PEGでラベルしたDNA生成物の高収率と高純度を示した（miR-155-プローブ-C30-アルキン2-PEG8により例示されている）。16457.86Daでのピークは、生成物miR-155-プローブ-C30-アルキン2-PEG8である。このピークを表1に示されているような2つの他のピークと比較した。

30

40

50

【 0 0 7 3 】

【表 1】

表1

期待値 [M-H] (Da)	測定値 [M-H] (Da)	差 (Da)	相対質量誤差
16458.91 (miR-155-プローブ- C30-アルキン2-PEG8)	16457.86 (メインピーク) 16519.0 16347.6	-1.0 -60.1 -111.3	-0.006% 0.4% 0.7%

10

【 0 0 7 4 】

PEGサイズに依存するシグネチャコンダクタンス：

まず、PEGでタグ付けされたmiRNAプローブがどのようにナノポア電流遮断を変化させるかを試験するために、1つだけのmiRNAを標的として利用し、多重検出用にそれらを分離した。標的のmiRNAはmiR-155であった（材料と方法の項目を参照）。miR-155プローブをPEG3、PEG8、PEG24を含む種々の長さのPEGでラベルした。これらのプローブをラベリング無しのプローブと比較した。図3は、代表的なシグネチャが4個のmiRNA・プローブ複合体を遮断したことを示している。シグネチャ遮断の残余電流は、PEGの長さが伸びるにつれて一貫して減少した。PEGラベリング無しのプローブを使用し、シグネチャは、開口部でのポアコンダクタンスに対して12%までコンダクタンスを下げた。相対的遮断レベル（ $I_b / I_0$ ）は、PEG3プローブについて7.6%まで下げ、PEG8プローブについて6.0%まで下げ、及びPEG24プローブについて1.9%まで下げた。これらのデータは、種々の長さのPEGでラベルしたプローブは、シグネチャの残余電流を変化させることができることを示した。

20

【 0 0 7 5 】

PEGの長さによるシグネチャコンダクタンスを調節するこのメカニズムは、他のmiRNAの検出にも普遍的であるように思われる。3つのmiRNA；miR-21、miR-210'及びmiR-182-5pを更に試験した。これらは、文献<sup>4,5</sup>によれば全ての肺癌に由来するmiRNAバイオマーカーである。各々のmiRNAに関して、4つのプローブを設計した。これらは、その標的にハイブリダイズする同一のキャプチャ領域を共有していた。1つのプローブはラベルせずに、他の3つはそれぞれPEG3、PEG8及びPEG24でラベルした。各miRNAとそのプローブの混合物をナノポアセンサーに加えた。各miRNA・プローブハイブリッドのシグネチャ電流レベル（ $I_b$ ）及び相対的遮断レベル（ $I_b / I_0$ ）を測定し、表2で比較した。3つのmiRNA；miR-21、miR-210'及びmiR-182-5pは、miR-155と全く同じ傾向であることが明らかになった。すなわち、シグネチャコンダクタンスはPEGの長さが増すにつれて一貫して減少した。

30

【 0 0 7 6 】

全ての4個のmiRNAの結果は、共通のメカニズムを示している：ナノポアコンダクタンスはポアルーメンを占めているPEGタグに極めて感受性である。理論に制限されないが、PEGが長くなるにつれて、その体積が膨張し、これがポアのイオン経路内でより多くの空間を遮断すると考えられている。結果として、プローブ上のPEGの長さが増すことによりシグネチャコンダクタンスは減少する。

40

【 0 0 7 7 】

バーコード付きのプローブでの多重miRNAの検出：

同一にラベルしたプローブの比較（表2中、各 $I_b / I$ の行）は、それらのmiRNA・プローブのシグネチャが同様のコンダクタンス（各PEGの行中、 $I_b / I$ ）を共有し、miRNAを識別できないことを示している。しかし、試験されたどのmiRNA（各miRNAの列、 $I_b / I$ ）も、種々にラベルしたプローブ生成物はそれらのシグネチャにおいて別個の遮断レベルを生成しているので、このようにラベルタイプを正確に識別できる。

【 0 0 7 8 】

## 【表2】

表2  
空のナノポアの電流 ( $I$ ) 対 多様なmiRNA—プローブ複合体によるシグネチャ遮断 ( $I_b$ )  
及び+120mVでのそれらの比 ( $I_b/I$ )

プローブ上のタグ		miR-155	miR-21	miR-210	miR-182-5p
					10
	$I$ (pA)	<b>121.02±0.03</b>	117.08±1.04	119.65±0.34	121.49±0.03
なし	$I_b$ (pA)	<b>14.56±0.11</b>	11.71±1.07	12.60±0.05	13.94±0.04
	$I_b/I$	<b>(12.0±0.1)%</b>	(10.0±1.8)%	(10.5±0.3)%	(11.5±0.1)%
	$I$ (pA)	121.99±0.03	120.10±0.35	124.76±0.23	<b>125.46±0.28</b>
PEG3	$I_b$ (pA)	9.23±0.03	8.28±0.46	9.51±0.04	<b>11.43±0.03</b>
	$I_b/I$	(7.6±0.1)%	(6.9±0.7)%	(7.6±0.2)%	<b>(9.1±0.3)%</b>
	$I$ (pA)	126.86±0.32	122.99±0.22	<b>131.12±0.49</b>	122.59±0.30
PEG8	$I_b$ (pA)	7.60±0.03	7.46±1.35	<b>7.27±0.03</b>	8.26±0.03
	$I_b/I$	(6.0±0.3)%	(6.1±1.3)%	<b>(5.6±0.4)%</b>	(6.7±0.3)%
	$I$ (pA)	122.63±0.03	<b>130.16±0.08</b>	124.70±0.33	118.18±0.40
PEG24	$I_b$ (pA)	2.34±0.04	<b>1.92±0.15</b>	2.51±0.03	2.89±0.03
	$I_b/I$	(1.9±0.1)%	<b>(1.5±0.2)%</b>	(2.0±0.3)%	(2.4±0.4)%

## 【0079】

ナノポアを野生型 - ヘモリシンにより形成した。miR-155、miR-21、miR-210及びmiRNA-182-5pを含む4個のmiRNAを標的として選択した。4個のプローブを各miRNA用に設計した。それらのうち、1つのプローブは変性せず、かつ他の3つはバーコードとしての別個のタグとコンジュゲートさせた。各miRNAを各プローブとハイブリダイズさせ、それらのシグネチャ遮断の電流レベルを特徴づけた。太字の値は、多重検出実験に選択されたmiRNA・プローブハイブリッドのものであった(図4と5参照)。

## 【0080】

4個のmiRNA用のプローブが異なってラベルされている場合には、全てのmiRNAの間で識別するために識別可能なシグネチャを生じることができると考えられている。正確な識別のために4個のmiRNAのシグネチャコンダクタンスを互いに十分に分けるために、標的のmiR-155には、最も高い残余電流を有するラベルしていないプローブ( $I_b/I = 12\%$ )を選択し、miR-21には、最も低い残余電流を有するPEG24-ラベルしたプローブ( $I_b/I = 1.5\%$ )を選択した。2つのレベルを仲介するために、miR-182-5pにはPEG3でラベルしたプローブ( $I_b/I = 9.1\%$ )を選択し、miR-210にはPEG8-ラベルしたプローブ( $I_b/I = 5.6\%$ )を選択した。このラベルタイプ/miRNA種の組合せは、種々のコンダクタンスの間のギャップを最大化し、種々のmiRNAの正確な識別を可能にする。図4は、このラベルタイプ/miRNA種の組合せの使用により、種々のmiRNAのシグネチャ遮断レベルを識別でき、これが多重検出を促進することを明らかに示している。多重検出試験では、miR-155、miR-182-5p、miR-210及びmiR-21を含む4個のmiRNAを異なってラベルされたそれらのプローブと混合した。多重miRNAハイブリダイズ混合物は、材料と方法の項目で記載したように調製した。この混合物を - ヘモリシンポアのシス側に加えた。図5は、+120mVでの混合物の電流

10

20

30

40

50

トレースを示している。4個のシグネチャコンダクタンスレベルを明らかに同定でき、各々は、miRNAに相当する。スパイクのような短い遮断(<1ms)も同定され、これはポアを通って迅速に移行する遊離miRNA又はDNAプローブにより生じる。シグネチャ事象の電流振幅ヒストグラムは、4つのピークがそれぞれがmiRNA種に相応することを明らかに証明している。高いコンダクタンスから低いものに、これらは特異的にラベルされたプローブを有するmiR-155、miR-182-5p、miR-210及びmiR-21の遮断レベルとそれぞれよく一致している。従って、これらはそれぞれmiR-155、miR-182-5p、miR-210及びmiR-21によるものであり得る。ヒストグラムは、シグネチャ数を計数することにより構築し、よってヒストグラム中の各ピークの下の面積は、各miRNAの濃度を評価するのに役立つ。

## 【0081】

10

例2. プローブの末端伸長部領域にポリアミン、オリゴ糖及びペプチドラベルを付着させるための例示的方法

ポリアミンを核酸に結合する予め記載した方法 (J. Med. Chem. 2003, 46, 5478-5483)により、様々なポリアミンをプローブの末端伸長部に結合できる。

## 【0082】

20

ペプチドを核酸に結合する予め記載した方法 (Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 5565-5568)を使用して様々なペプチドをプローブの末端伸長部に結合できる。付着可能な例示的なペプチドには、次のものが含まれるがこれらに限定されるわけではない: His-His-His-His-His-Cys (配列番号13) 及びGly-Tyr-Tyr-Tyr-Cys (配列番号14)。

## 【0083】

オリゴ糖を核酸に結合する予め記載した方法 (Chem. Lett. 2013, 42, 197-1990)を使用して、様々なオリゴ糖をプローブの末端伸長部に結合できる。

## 【0084】

30

本発明をその特定の実施態様と関連して記載したが、本発明の装置は、更に変更できることが分かるであろう。本特許明細書は、一般に本発明の原則に従って本発明のいずれかの変更、使用又は改造も網羅する意図があり、かつこのような本発明の開示からの逸脱が本発明が付属する当該分野の公知若しくは慣行の範囲内にあること及びここに明記する前の本質的な特徴に該当すること及び添付した請求項の範囲内に従うことを含める。ここで提供されるものは、プローブ、プローブセットならびにプローブとプローブセットから成るキット及びナノポア系を用いてサンプル中で1つ以上の核酸を検出する方法である。本発明により含まれるこのようなプローブ、プローブセット、キット及び方法は、これにより記載及び請求されたいずれかの実施態様及び/又はこれにより記載及び請求されたいずれかの実施態様の組合せを含むことができる。

## 【0085】

30

## 参考資料リスト

1. Landi, M. T. 等、Micro RNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. Clin. Cancer Res 16, 430~441頁 (2010)
2. Iorio, M. V. & Crone, C. M. MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. J. Clin. Oncol. 27, 5848-5856頁 (2009)
3. Mitchell, P. S. 等、Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 105, 10513-10518頁 (2008)
4. Zheng, D. 等、Plasma micronas as novel biomarkers for early detection of lung cancer. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 4, 575-586 (2011)
5. Boeri, M. 等、MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of compound tomography detected lung cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 3713-3718頁 (2011)
6. Wang, Y., Zheng, D., Tan, Q., Wang, M. X., & Gu, L. Q. Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. Nat. Nanotechnol. 6, 668-674頁 (2011)

40

50

- 7 . Bayley, H. & Jayasinghe, L. Functional engineered channels and pores-(Review). *Molecular Membrane Biology* 21, 209-220頁 (2004 )
- 8 . Bayley, H等、Droplet interface bilayers. *Mol. Biosyst.* 4, 1191-1208頁 (2008 )
- 9 . Gu, L. Q.& Shim, J. W. Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices. *Analyst* 135, 441-451頁 (2010 )
- 10 . Majd, S等、Applications of biological pores in nanomedicine, sensing and nanoelectronics. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 439-476頁 (2010 )
- 11 . Movileanu, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. *Trends Biotechnol.* 27, 333-341頁 (2009 ) 10
- 12 . Venkatesan, B. M. & Bashir, R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nat Nanotechnol.* 6, 615-624頁 (2011 )
- 13 . Ma, L. & Cockroft, S.L. Biological nanopores for single-molecule biophysics. *ChemBioChem* 11, 25-34頁 (2010 )
- 14 . Howorka, S. & Siwy, Z. Nanopore analytics: Sensing of single molecules. *Chemical Society Reviews* 38, 2360-2384頁 (2009 )
- 15 . Olasagasti, F等、Replication of individual DNA molecules under electronic control using a protein nanopore. *Nat. Nanotechnol.* 5, 798-806頁 (2010 )
- 16 . Hall, A. R.等、Hybrid pore formation by directed insertion of alpha-haemolysin into solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol.* 5, 874-877頁 (2010 ) 20
- 17 . Wendell, D等、Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. *Nat Nanotechnol.* 4, 765-772頁 (2009 )
- 18 . Wanunu, M., Morrison, W., Rabin, Y., Grosberg, A. Y., & Meller, A. Electrostatic focusing of unlabeled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nat. Nanotechnol.* 5, 160-165頁 (2010 )
- 19 . Hornblower, B等、Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores. *Nat Methods* 4, 315-317頁 (2007 )
- 20 . Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13770-137773頁 (1996 ) 30
- 21 . Branton, D等、The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26, 1146-1153頁 (2008 )
- 22 . Cherf, G. M.等、Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision. *Nat Biotechnol* 30, 344-348頁 (2012 )
- 23 . Manrao, E. A.等、Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol* 30, 349-353頁 (2012 )
- 24 . Braha, O.等、Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nature Biotechnology* 18, 1005-1007頁 (2000 )
- 25 . Gu, L. Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S., & Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* 398, 686-690頁 (1999 ) 40
- 26 . Kang, X. F., Cheley, S., Guan, X., & Bayley, H. Stochastic detection of enantiomers. *J Am. Chem Soc* 128, 10684-10685頁 (2006 )
- 27 . Gao, C., Ding, S., Tan, Q., & Gu, L. Q. Method of creating a nanopore-terminated probe for single-molecule enantiomer discrimination. *Anal. Chem* 81, 80-86 (2009 )
- 28 . Astier, Y., Braha, O., & Bayley, H. Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *J Am. Chem Soc* 128, 1705-1710頁 (2006 ) 50

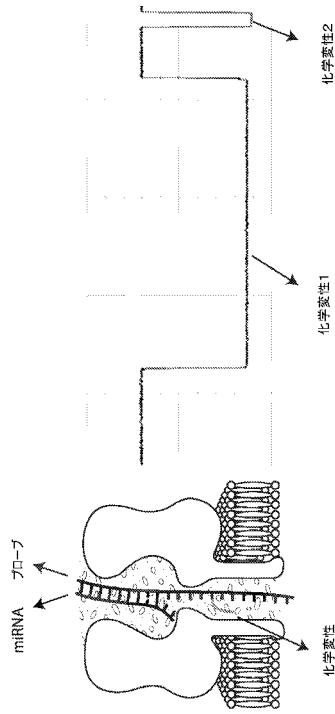
29. Clarke, J. 等、Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.* 4, 265-270頁 (2009)
30. Kasianowicz, J. J., Henrickson, S. E., Weetall, H. H., & Robertson, B. S. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. *Anal. Chem.* 73, 2268-2272頁 (2001)
31. Mitchell, N. & Howorka, S. Chemical tags facilitate the sensing of individual DNA strands with nanopores. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 5565-5568頁 (2008)
32. Borsenberger, V., Mitchell, N., & Howorka, S. Chemically labeled nucleotides and oligonucleotides encode DNA for sensing with nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7530-7531 (2009) 10
33. Robertson, J. W. 等、Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 8207-8211 (2007)
34. Kumar, S 等、PEG-labeled nucleotides and nanopore detection for single molecule DNA sequencing by synthesis. *Sci. Rep.* 2, 684 (2012)
35. An, N., Fleming, A. M., White, H. S., & Burrows, C. J. Crown ether-electrolyte interactions permit nanopore detection of individual DNA abasic sites in single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 109, 11504-11509頁 (2012)
36. Purnell, R. F., Mehta, K. K., & Schmidt, J. J. Nucleotide identification and orientation discrimination of DNA homopolymers immobilized in a protein nanopore. *Nano Lett.* 8, 3029-3034 (2008) 20
37. Stoddart, D., Heron, A. J., Mikhailova, E., Maglia, G., & Bayley, H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 7702-7707頁 (2009)
38. Murphy, M. C., Rasnik, I., Cheng, W., Lohman, T. M., & Ha, T. Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* 86, 2530-2537 (2004) 39. Na, A., Fleming, A. M., White, H. S. & Burrows, C. J. Crown Ether-Electrolyte Interactions Permit Nanopore Detection of Individual DNA Abasic Sites in Single Molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1-6, doi:10.1073/pnas.1201669109/-/DCSupplemental (2012) 30

## 【符号の説明】

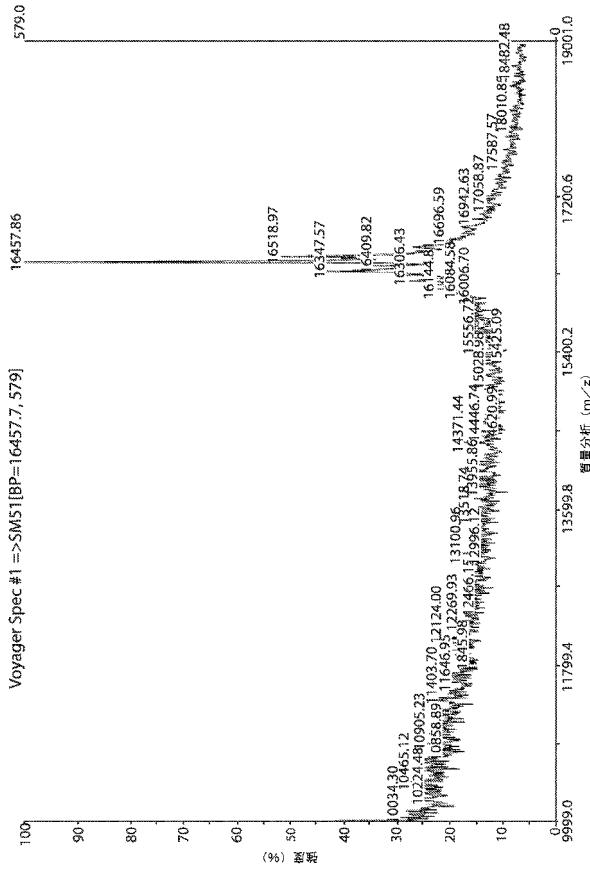
## 【0086】

- 1 感知チャンバー、 2 シスコンパートメント、 3 トランスコンパートメント、 4 パーティション、 6 ナノポア、 7 電力、 8 ピコ - アンペア増幅器、 9 標的オリゴヌクレオチドの混合サンプル、 10 相補的プローブ

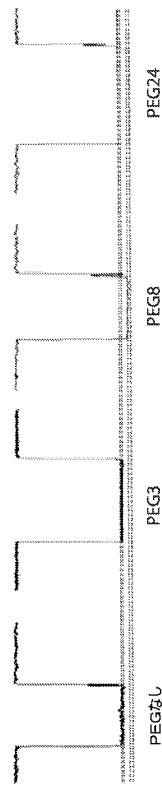
【 図 1 】



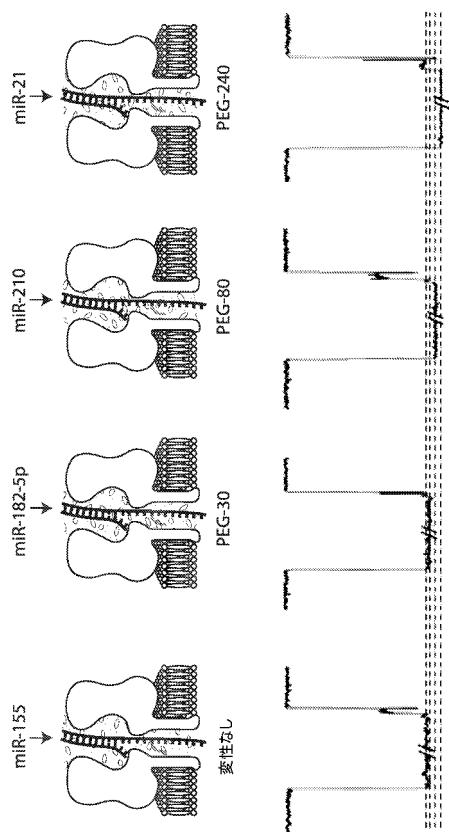
【 図 2 】



### 【 図 3 】



【 図 4 】



【図5】

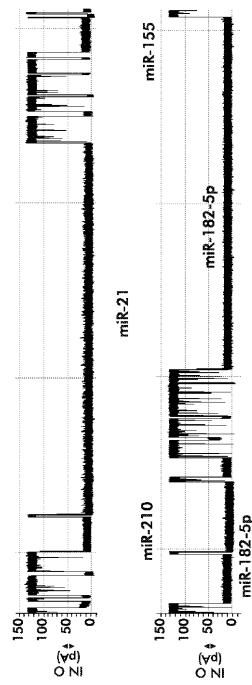
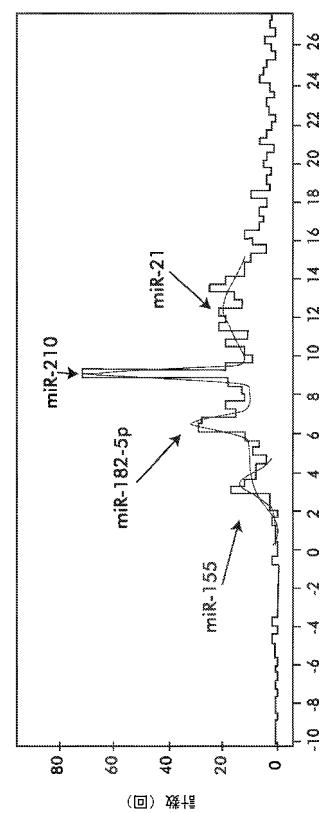


Figure 5

【図6】



(回) 時間 (回)

【図7】

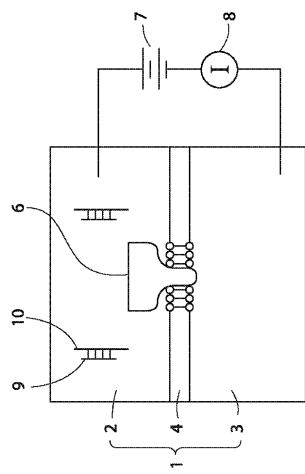


Figure 7

【図8 a】

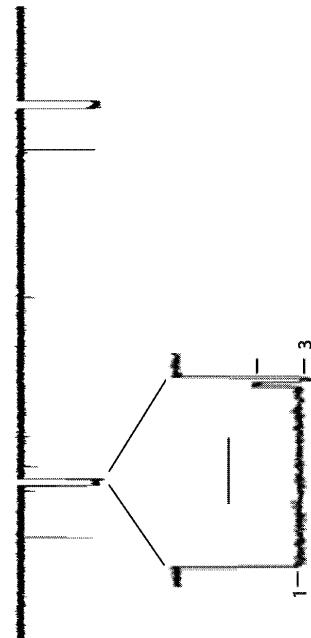
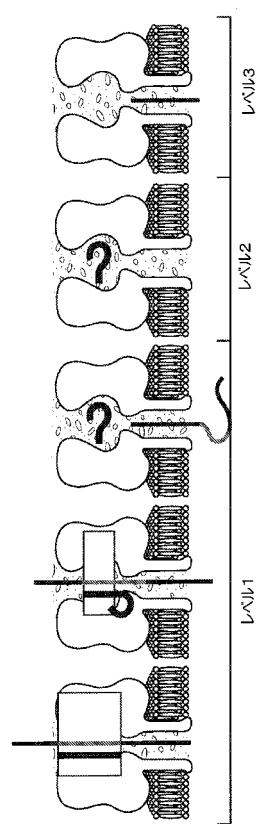


Figure 8a

【図 8 b】



【配列表】

2016517275000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/028528
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68 (2014.01) USPC - 435/6.11 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - B82B 3/00; C07H 19/00, 19/10, 21/00, 21/04; C12M 1/00; C12N 15/00; C12Q 1/00, 1/68; C40B 30/00, 30/02, 30/04, 40/00; G01N 33/00, 33/50, 33/53, 33/532, 33/533, 33/534, 33/535 (2014.01) USPC - 204/155, 452; 257/183, 202; 436/004, 006.1, 006.11, 006.12; 436/139; 506/002, 006, 008, 009		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - B01L 003/5027; B82Y 010/00, 015/00, 030/00; C07H 019/00, 021/00; C12Q 001/6816, 001/6825, 001/6869, 001/6874; G01N 003/48721, 003/6803; Y10S 977/953 (2014.02)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/009578 A2 (GU et al) 19 January 2012 (19.01.2012) entire document	1-8, 11-14, 17-21, 24-33, 35-52
Y	WO 2012/083249 A2 (JU et al) 21 June 2012 (21.06.2012) entire document	9, 10, 15, 22, 34, 49
Y	WO 2011/126869 A2 (MELLER et al) 13 October 2011 (13.10.2011) entire document	15, 34
Y	US 2007/0190542 A1 (LING et al) 16 August 2007 (16.08.2007) entire document	9, 10, 16, 22, 23
A	US 2005/0208574 A1 (BAYLEY et al) 22 September 2005 (22.09.2005) entire document	16, 23
A	WANG et al. 'Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients.' Nat Nanotechnol. 6(10): 668-674. April 2012. entire document	1-52
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 June 2014	Date of mailing of the international search report 18 JUL 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

---

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72)発明者 シンユー ジャン

アメリカ合衆国 ミズーリ コロンビア アッシュランド ロード 1326 アパートメント  
ディー

F ターム(参考) 2G060 AA07 AA15 AD06 AF01 AG06 AG08 HA01  
4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11 CA20  
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QQ53 QR32 QR35 QR36 QR55 QR82  
QS15 QS28 QS34 QS36 QS39 QX04