(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-513682
(P2025-513682A)
(43)公表日　令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｍ	*1/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/34	Ｚ	４Ｂ０２９
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｍ	*1/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/00	Ａ	
Ｂ８２Ｙ	*5/00 (2011.01)*	Ｂ８２Ｙ	5/00		
Ｂ８２Ｙ	*40/00 (2011.01)*	Ｂ８２Ｙ	40/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全66頁）

(21)出願番号　特願2024-549680(P2024-549680)
(86)(22)出願日　令和5年3月30日(2023.3.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月27日(2024.9.27)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/058383
(87)国際公開番号　WO2023/187104
(87)国際公開日　令和5年10月5日(2023.10.5)
(31)優先権主張番号　63/325,726
(32)優先日　令和4年3月31日(2022.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　500358711
イルミナ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２２ サンディエゴ イルミナ ウェイ ５２００
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100221501
弁理士　式見 真行
(72)発明者　リシェ，アレクサンドル
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９
(72)発明者　コンデ－ゴンサレス，アントニオ
英国シービー２１・６ディーエフ、ケン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むナノポアデバイス、及びその作製方法

(57)【要約】
ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むナノポアデバイス、及びその作製方法が本明細書において提供される。いくつかの実施例では、第１の流体と第２の流体との間のバリアは、開口部を画定するバリア支持体によって懸架される。バリアは、開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む１つ以上の層を含み得る。ブロックコポリマーの各分子は、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックとを含み得る。親水性ブロックは、バリアの外面を形成し、疎水性ブロックは、バリア内に位置し得る。疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含み得る。

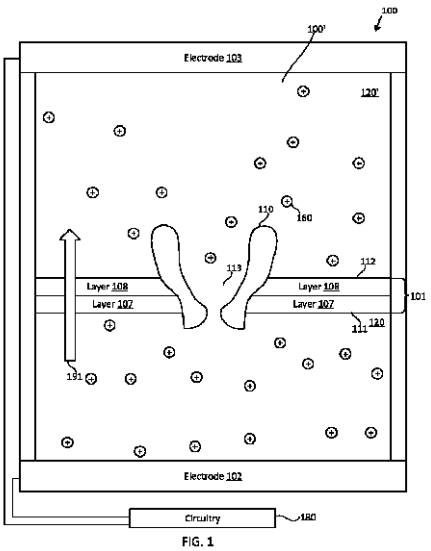


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、前記バリアが、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され、
前記開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む、１つ以上の層を含み、
前記ブロックコポリマーの各分子が、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックと、を含み、
前記親水性ブロックが、前記バリアの外面を形成し、前記疎水性ブロックが、前記バリア内に位置し、
前記疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、バリア。
【請求項２】
前記ブロックコポリマーが、ジブロックコポリマーである、請求項１に記載のバリア。
【請求項３】
前記疎水性ブロックが、ポリブタジエン（ＰＢｄ）である、請求項２に記載のバリア。
【請求項４】
前記バリアが、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有する、請求項２又は３に記載のバリア。
【請求項５】
前記ブロックコポリマーが、２つの親水性ブロック及び１つの疎水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである、請求項１に記載のバリア。
【請求項６】
前記疎水性ブロックが、ポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）である、請求項５に記載のバリア。
【請求項７】
前記バリアが、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有する、請求項５又は６に記載のバリア。
【請求項８】
前記ブロックコポリマーが、２つの疎水性ブロック及び１つの親水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである、請求項１に記載のバリア。
【請求項９】
前記バリアは、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有する、請求項８に記載のバリア。
【請求項１０】
前記バリア内に配置され、前記第１の流体と前記第２の流体との間の接触を提供するナノポアを更に備える、請求項１～９のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項１１】
第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、前記バリアが、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され、
前記開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む、１つ以上の層であって、
前記ブロックコポリマーの各分子が、第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックと、前記第１の親水性ブロック及び前記第２の親水性ブロックの間に配置された疎水性ブロックと、を含み、
前記第１の親水性ブロック及び前記第２の親水性ブロックが、前記バリアの外面を形成し、前記疎水性ブロックが、前記バリア内に位置する、１つ以上の層と、
前記バリア内に配置され、前記第１の流体と前記第２の流体との間の接触を提供するナノポアと、を備える、バリア。
【請求項１２】
前記第１の親水性ブロック及び前記第２の親水性ブロックが、おおよそ長さＡであり、

前記疎水性ブロックが、おおよそ長さＢであり、前記１つ以上の層の少なくとも一部が、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有し、前記バリアが、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有する、請求項１１に記載のバリア。

【請求項１３】

前記長さＡが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項１２に記載のバリア。

【請求項１４】

前記長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項１２又は１３に記載のバリア。

【請求項１５】

前記疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項１１～１４のいずれか一項に記載のバリア。

【請求項１６】

前記第１の親水性ブロック及び前記第２の親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項１１～１５のいずれか一項に記載のバリア。

【請求項１７】

前記疎水性ブロックが、約０℃未満のガラス転移温度（Ｔｇ）を有するポリマーを含む、請求項１１～１６のいずれか一項に記載のバリア。

【請求項１８】

前記第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックの少なくとも１つが、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分を含む、請求項１１～１６のいずれか一項に記載のバリア。

【請求項１９】

前記第１の親水性ブロックの前記部分が、メチル基又はカルボキシル基を含み、前記第２の親水性ブロックの前記部分が、メチル基又はカルボキシル基を含む、請求項１８に記載のバリア。

【請求項２０】

前記分子が、前記第１の親水性ブロックを前記疎水性ブロックの第１の末端に結合する第１のリンカー、及び前記第２の親水性ブロックを前記疎水性ブロックの第２の末端に結合する第２のリンカーを更に含む、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のバリア。

【請求項２１】

第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、

ジブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層であって、

前記ジブロックコポリマーの各分子が、親水性ブロックに結合された疎水性ブロックを含む、第１の層と、

前記ジブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層と、を含み、

前記第１の複数の分子の前記親水性ブロックが、前記バリアの第１の外面を形成し、

前記第２の複数の分子の前記親水性ブロックが、前記バリアの第２の外面を形成し、

前記第１の複数の分子及び前記第２の複数の分子の前記疎水性ブロックが、前記バリア内で互いに接触している、バリア。

【請求項２２】

前記親水性ブロックがおおよそ長さＡであり、前記疎水性ブロックがおおよそ長さＢであり、前記第１及び前記第２の層がそれぞれおおよそＡ＋Ｂの厚さを有し、前記バリアがおおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有する、請求項２１に記載のバリア。

【請求項２３】
前記長さＡが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項２２に記載のバリア。
【請求項２４】
前記長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項２２又は２３に記載のバリア。
【請求項２５】
前記親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項２１～２４のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項２６】
前記疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項２１～２５のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項２７】
前記分子のそれぞれが、前記疎水性ブロックを前記親水性ブロックに結合するリンカーを更に含む、請求項２１～２６のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項２８】
前記リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される少なくとも１つの部分を含む、請求項２７に記載のバリア。
【請求項２９】
前記第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックがそれぞれ、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から独立して選択される部分を含む、請求項２１～２８のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項３０】
前記バリア内に配置され、前記第１の流体を前記第２の流体に流体結合する開口部を提供する、ナノポアを更に備える、請求項２１～２９のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項３１】
第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、
トリブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層であって、
前記トリブロックコポリマーの各分子が、第１の疎水性ブロック及び第２の疎水性ブロックと、前記第１の疎水性ブロックと前記第２の疎水性ブロックとの間に配置された親水性ブロックと、を含む、第１の層と、
前記トリブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層と、を備え、
前記第１の複数の分子の前記親水性ブロックが、前記バリアの第１の外面を形成し、
前記第２の複数の分子の前記親水性ブロックが、前記バリアの第２の外面を形成し、
前記第１の複数の分子及び前記第２の複数の分子及び前記第２の複数の分子の前記疎水性ブロックが、前記バリア内で互いに接触している、バリア。
【請求項３２】
前記親水性ブロックが、おおよそ長さＡであり、各疎水性ブロックが、おおよそ長さＢであり、前記第１の層及び前記第２の層がそれぞれ、おおよそＡ／２＋Ｂの厚さを有し、前記バリアが、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有する、請求項３１に記載のバリア。
【請求項３３】
前記長さＡが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項３２に記載のバリア。
【請求項３４】
前記長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、請求項３２又は３３に記載の

バリア。
【請求項３５】
前記親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項３１～３４のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項３６】
前記疎水性ブロックがそれぞれ、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項３１～３５のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項３７】
前記第１の複数の分子及び前記第２の複数の分子及び前記第２の複数の分子の各分子が、各疎水性ブロックを前記親水性ブロックに結合させるリンカーを更に含む、請求項３１～３７のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項３８】
前記リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、請求項３７に記載のバリア。
【請求項３９】
前記親水性ブロックが、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分を含む、請求項３１～３８のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項４０】
前記バリア内に配置され、前記第１の流体を前記第２の流体に流体結合する開口部を提供する、ナノポアを更に備える、請求項３１～３９のいずれか一項に記載のバリア。
【請求項４１】
バリアを形成する方法であって、
第１の流体と第２の流体との間にバリアを形成することであって、前記バリアが、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され、前記バリアが、
前記開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む、１つ以上の層を備え、
前記ブロックコポリマーの各分子が、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックと、を含み、
前記１つ以上の親水性ブロックが、前記バリアの外面を形成し、前記疎水性ブロックが、前記バリア内に位置し、
前記１つ以上の疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、方法。
【請求項４２】
前記バリアが、塗装を使用して形成される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記塗装が、ブラシ塗装、機械塗装、及びバブル塗装からなる群から選択される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記１つ以上の親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】
前記バリアにナノポアを挿入することを更に含む、請求項４１～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記ナノポアが、前記第１の流体と前記第２の流体との間の接触を提供する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記ナノポアが、バリアエレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、又は界面活性剤支援ポア挿入に挿入される、請求項４５又は４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記ブロックコポリマーが、ジブロックコポリマーである、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記ブロックコポリマーが、２つの親水性ブロック及び１つの疎水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記ブロックコポリマーが、２つの疎水性ブロック及び１つの親水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、２０２２年３月３１日出願の「ＮＡＮＯＰＯＲＥ　ＤＥＶＩＣＥＳ　ＩＮＣＬＵＤＩＮＧ　ＢＡＲＲＩＥＲＳ　ＵＳＩＮＧ　ＤＩＢＬＯＣＫ　ＯＲ　ＴＲＩＢＬＯＣＫ　ＣＯＰＯＬＹＭＥＲＳ，ＡＮＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ　ＯＦ　ＭＡＫＩＮＧ　ＴＨＥ　ＳＡＭＥ」と題された米国特許出願第６３／３２５，７２６号の利益を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
（発明の分野）
本出願は、ブロックコポリマーを含むバリアに関する。
【背景技術】
【０００３】
ポリヌクレオチドの配列決定にナノポアを使用することに、学術的及び企業による莫大な量の時間及びエネルギーが費やされてきた。例えば、滞留時間が、適用された電場におけるナノポア上のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片（Ｋlenow fragment、ＫＦ）とのＤＮＡの複合体について測定されている。又は、例えば、電流又はフラックス測定センサが、α－溶血素ナノポア内に捕捉されたＤＮＡに対する実験において使用されている。又は、例えば、ＫＦ－ＤＮＡ複合体は、α－溶血素ナノポアの上の電場において捕捉されたときのそれらの特性に基づいて区別されている。更に別の例では、ポリヌクレオチド配列決定は、ポリメラーゼ酵素、及びナノポアの近位に付着した鋳型核酸を含む単一のポリメラーゼ酵素複合体と、溶液中のヌクレオチド類似体と、を使用して実行される。ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチド類似体が、合成されているポリヌクレオチドに組み込まれるときに、電荷遮断標識が切断されるように、ヌクレオチド類似体のポリリン酸部分に結合された電荷遮断標識を含む。電荷遮断標識は、ナノポアによって検出されて、組み込まれたヌクレオチドの存在及び固有性を決定し、それによって鋳型ポリヌクレオチドの配列を決定する。更に他の例では、構築物は、膜貫通タンパク質ポアサブユニット及び核酸ハンドリング酵素を含む。
【０００４】
しかしながら、そのような以前から知られているデバイス、システム、及び方法は、必ずしも十分に堅牢である、再現可能である、又は敏感であるとは限らず、例えば、費用効

率が高く、非常に正確な動作を要求する臨床及び他の設定におけるゲノム配列決定などの商業的用途を要求する、実用的な実施のために十分に高いスループットを有しない場合がある。したがって、必要とされるものは、ポリヌクレオチドを配列決定するための改善されたデバイス、システム、及び方法であり、これらは、その中に配置されたナノポアを有する膜を使用することを含み得る。

【発明の概要】

【０００５】

ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むナノポアデバイス、及びその作製方法が本明細書において提供される。

【０００６】

本明細書のいくつかの例は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを提供する。バリアは、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され得る。バリアは、開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む１つ以上の層を含み得る。ブロックコポリマーの各分子は、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックとを含む。親水性ブロックは、バリアの外面を形成し得、疎水性ブロックは、バリア内に位置し得る。いくつかの例では、疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む。

【０００７】

いくつかの例では、ブロックコポリマーは、ジブロックコポリマーである。いくつかの例では、疎水性ブロックは、ポリブタジエン（ＰＢｄ）である。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、バリアは、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有する。

【０００８】

いくつかの例では、ブロックコポリマーは、２つの親水性ブロック及び１つの疎水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである。いくつかの例では、疎水性ブロックは、ポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）である。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、バリアは、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有する。

【０００９】

いくつかの例では、ブロックコポリマーは、２つの疎水性ブロック及び１つの親水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである。いくつかの例では、バリアは、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有する。

【００１０】

いくつかの例では、バリア内に配置され、第１の流体と第２の流体との間の接触を提供するナノポアを含むことを更に含む。

【００１１】

本明細書のいくつかの例は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを提供する。バリアは、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され得る。バリアは、開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む１つ以上の層を含み得る。ブロックコポリマーの各分子は、第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックと、第１の親水性ブロックと第２の親水性ブロックとの間に配置された疎水性ブロックとを含み得る。第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックは、バリアの外面を形成し得、疎水性ブロックはバリア内に位置し得る。バリアは、バリア内に配置され、第１の流体と第２の流体との間の接触を提供する、ナノポアを更に含み得る。

【００１２】

いくつかの例では、第１及び第２の親水性ブロックは、おおよそ長さＡであり、疎水性ブロックは、おおよそ長さＢであり、１つ以上の層の少なくとも一部は、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有し、バリアは、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有する。いくつかの例では、長さＡは、約２反復単位～約１００反復単位である。追加的に又は代替的に、長さＢは、約２

反復単位～約１００反復単位である。
【００１３】
いくつかの例では、疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００１４】
いくつかの例では、第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックは、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００１５】
いくつかの例では、疎水性ブロックは、約０℃未満のガラス転移温度（Ｔｇ）を有するポリマーを含む。
【００１６】
いくつかの例では、第１及び第２の親水性ブロックの少なくとも１つは、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分を含む。
【００１７】
いくつかの例では、第１の親水性ブロックの部分は、メチル基又はカルボキシル基を含み、第２の親水性ブロックの部分は、メチル基又はカルボキシル基を含む。
【００１８】
いくつかの例では、分子は、第１の親水性ブロックを疎水性ブロックの第１の末端に結合する第１のリンカー、及び第２の親水性ブロックを疎水性ブロックの第２の末端に結合する第２のリンカーを更に含む。
【００１９】
本明細書のいくつかの例は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを提供する。バリアは、ジブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層を含み得る。ジブロックコポリマーの各分子は、親水性ブロックに結合された疎水性ブロックを含み得る。バリアは、ジブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層を更に含み得る。第１の複数の分子の親水性ブロックは、バリアの第１の外面を形成し得、第２の複数の分子の親水性ブロックは、バリアの第２の外面を形成し得、第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性ブロックは、バリア内で互いに接触し得る。
【００２０】
いくつかの例では、親水性ブロックは、おおよそ長さＡであり、疎水性ブロックは、おおよそ長さＢであり、第１の層及び第２の層はそれぞれ、おおよそＡ＋Ｂの厚さを有し、バリアは、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有する。いくつかの例では、長さＡは、約２反復単位～約１００反復単位である。追加的に又は代替的に、長さＢは、約２反復単位～約１００反復単位である。
【００２１】
いくつかの例では、親水性ブロックは、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００２２】
いくつかの例では、疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００２３】

いくつかの例では、分子のそれぞれは、疎水性ブロックを親水性ブロックに結合するリンカーを更に含む。

【００２４】

いくつかの例では、リンカーは、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される少なくとも１つの部分を含む。

【００２５】

いくつかの例では、第１及び第２の親水性ブロックはそれぞれ、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から独立して選択される部分を含む。

【００２６】

いくつかの例では、バリアは、バリア内に配置され、第１の流体を第２の流体に流体結合する開口部を提供する、ナノポアを更に含む。

【００２７】

本明細書のいくつかの例は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを提供する。バリアは、トリブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層を含み得る。トリブロックコポリマーの各分子は、第１の疎水性ブロック及び第２の疎水性ブロックと、第１の疎水性ブロックと第２の疎水性ブロックとの間に配置された親水性ブロックとを含み得る。バリアは、トリブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層を更に含み得る。第１の複数の分子の親水性ブロックは、バリアの第１の外面を形成し得、第２の複数の分子の親水性ブロックは、バリアの第２の外面を形成し得、第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性ブロックは、バリア内で互いに接触し得る。

【００２８】

いくつかの例では、親水性ブロックは、おおよそ長さＡであり、各疎水性ブロックは、おおよそ長さＢであり、第１の層及び第２の層はそれぞれ、おおよそＡ／２＋Ｂの厚さを有し、バリアは、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有する。いくつかの例では、長さＡは、約２反復単位～約１００反復単位である。追加的に又は代替的に、長さＢは、約２反復単位～約１００反復単位である。

【００２９】

いくつかの例では、親水性ブロックは、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む。

【００３０】

いくつかの例では、疎水性ブロックはそれぞれ、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む。

【００３１】

いくつかの例では、第１の複数の分子及び第２の複数の分子の各分子は、各疎水性ブロックを親水性ブロックに結合するリンカーを更に含む。いくつかの例では、リンカーは、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される。

【００３２】

いくつかの例では、親水性ブロックは、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分を含む。

【００３３】
いくつかの例では、バリアは、バリア内に配置され、第１の流体を第２の流体に流体結合する開口部を提供する、ナノポアを更に含む。
【００３４】
本明細書のいくつかの例は、バリアを作製する方法を提供する。本方法は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを形成することを含み得、バリアは、開口部を画定するバリア支持体によって懸架される。バリアは、開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む１つ以上の層を含み得る。ブロックコポリマーの各分子は、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックとを含み得る。親水性ブロックは、バリアの外面を形成し、疎水性ブロックは、バリア内に位置し得る。いくつかの例では、１つ以上の疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００３５】
いくつかの例では、バリアは、塗装を使用して形成される。いくつかの例では、塗装は、ブラシ塗装、機械塗装、及びバブル塗装からなる群から選択される。
【００３６】
いくつかの例では、１つ以上の親水性ブロックは、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む。
【００３７】
いくつかの例では、本方法は、ナノポアをバリアに挿入することを更に含む。いくつかの例では、ナノポアは、第１の流体と第２の流体との間の接触を提供する。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、ナノポアは、バリアエレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、又は界面活性剤支援ポア挿入に挿入され得る。
【００３８】
いくつかの例では、ブロックコポリマーは、ジブロックコポリマーである。
【００３９】
いくつかの例では、ブロックコポリマーは、２つの親水性ブロック及び１つの疎水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである。
【００４０】
いくつかの例では、ブロックコポリマーは、２つの疎水性ブロック及び１つの親水性ブロックを有するトリブロックコポリマーである。
【００４１】
本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意のそれぞれの特徴／例は、任意の適切な組み合わせで一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか１つ以上からの任意の特徴／例は、任意の適切な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。
【図面の簡単な説明】
【００４２】
【図１】ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含む例示的なナノポア組成物及びデバイスの断面図を概略的に示す。
【図２Ａ】図１のナノポア組成物及びデバイスに含まれ得るジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを概略的に示す。
【図２Ｂ】図１のナノポア組成物及びデバイスに含まれ得るジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを概略的に示す。
【図２Ｃ】図１のナノポア組成物及びデバイスに含まれ得るジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを概略的に示す。

【図３Ａ】図１のナノポア組成物及びデバイスにおいて使用するためのトリブロックコポリマーを調製するための例示的なスキームを概略的に示す。
【図３Ｂ】図１のナノポア組成物及びデバイスにおいて使用するためのトリブロックコポリマーを調製するための例示的なスキームを概略的に示す。
【図３Ｃ】図１のナノポア組成物及びデバイスにおいて使用するためのトリブロックコポリマーを調製するための例示的なスキームを概略的に示す。
【図４】図１の組成物及びデバイスの例示的使用の断面図を概略的に示す。
【図５】図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。
【図６】図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。
【図７】図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。
【図８】図１に示されているようなデバイスを形成するための動作のフローを示す。
【図９】ＤＰｈＰＣ、ＰＥＯ$_{500}$－ｂ－ＰＢｄ$_{700}$、及びＰＤＭＳ$_{500}$－ｂ－ＰＥＯ$_{420}$－ｂ－ＰＤＭＳ$_{500}$から形成された膜について測定された静電容量及び雑音を記載するプロット及び表を示す。
【図１０】ＤＰｈＰＣ、ＰＥＯ$_{500}$－ｂ－ＰＢｄ$_{700}$及びＰＤＭＳ$_{500}$－ｂ－ＰＥＯ$_{420}$－ｂ－ＰＤＭＳ$_{500}$膜について、測定された電圧の関数として、残りの膜の正規化された数のプロットを示す。
【図１１】１ＭのＫＣｌ＋５０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液中でのＭｓｐＡナノポア／ＰＥＯ$_{500}$－ｂ－ＰＢｄ$_{700}$膜構築物安定性のプロットを示す。
【図１２】本明細書の例に従って形成された膜について測定された破壊電圧を説明するプロットを示す。
【図１３】特定の条件下でのＭｓｐＡナノポア／膜構築物安定性のプロットを示す。
【図１４Ａ】図１のナノポア組成物及びデバイスの１つの非限定的な例の更なる詳細の平面図及び断面図を概略的に示す。
【図１４Ｂ】図１のナノポア組成物及びデバイスの１つの非限定的な例の更なる詳細の平面図及び断面図を概略的に示す。
【図１５】図１４Ａ～１４Ｂを参照して説明される例で使用され得る代替的なバリアを概略的に示す。
【図１６】図１４Ａ～１４Ｂを参照して説明された例で使用され得る別の代替バリアを概略的に示す。
【図１７】図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。
【発明を実施するための形態】
【００４３】
ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むナノポアデバイス、及びその作製方法が本明細書において提供される。
【００４４】
例えば、ナノポア配列決定は、バリアに挿入され、イオン及び／又は他の分子がバリアの一方の側面から他方の側面に流れることができる開口部を含むナノポアを利用し得る。回路は、例えば、合成による配列決定（ＳＢＳ）中に、ヌクレオチドの配列を検出するために使用され得、ＳＢＳでは、バリアの第１の側面で、ポリメラーゼが、成長するポリヌクレオチドがハイブリダイズされるテンプレートポリヌクレオチドの配列に基づく順序で、成長するポリヌクレオチドにヌクレオチドを付加する。回路の感度は、例えば、バリアの一方の側面で検出のための適切な電子輸送を提供する一方で、バリアの他方の側面でポリメラーゼの活性を適切に促進するために、バリアのそれぞれの側面で異なる組成を有する流体を使用することによって改善され得る。流体組成の差は、バリアを弱化させ得る浸透圧を発生させ得、したがって、通常の使用中にバリアが破損又は漏出し得る可能性を高める。しかしながら、ナノポアを強すぎるバリアに挿入することは困難であり得る。
【００４５】
本明細書で提供されるように、ナノポアデバイスで使用するためのバリアは、デバイスの長期使用に適した安定性特性を提供し、製造中に使用可能なデバイスの数を増加させる

ようにナノポア挿入も容易にするジブロック又はトリブロックコポリマーを含むことができる。以下により詳細に説明されるように、いくつかの例では、本発明のジブロックコポリマーは、疎水性ブロックに結合された親水性ブロックを含み得る。ジブロックコポリマー中の疎水性及び親水性ブロックのそれぞれの長さは、コポリマーが、親水性ブロックがそれぞれの層の外面（したがってバリアのそれぞれの外面）を形成し、疎水性ブロックがその層の内面を形成し、他の層の疎水性ブロックと接触する二重層構造に集合するように選択され得る。他の例では、本発明のトリブロックコポリマーは、２つの疎水性ブロックの間に結合された親水性ブロックを含み得る。ジブロックコポリマー中の疎水性及び親水性ブロックのそれぞれの長さは、コポリマーが、親水性ブロックがそれぞれの層の外面（したがってバリアのそれぞれの外面）を形成し、疎水性ブロックがその層の内面を形成し、他の層の疎水性ブロックと接触する二重層構造に集合するように選択され得る。更に他の例では、本発明のトリブロックコポリマーは、２つの親水性ブロックの間に結合された疎水性ブロックを含み得る。トリブロックコポリマー中の疎水性及び親水性ブロックのそれぞれの長さは、親水性ブロックがバリアの外面を形成し、疎水性ブロックがバリアの内側を形成する構造にコポリマーが集合するように選択され得る。

【００４６】

最初に、本明細書で使用されるいくつかの用語を簡単に説明する。次いで、ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むいくつかの例示的なデバイス、並びにその作製方法及び使用方法について説明する。

【００４７】

用語

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。「含むこと（including）」という用語、並びに「含む（include）」、「含む（includes）」及び「含まれた（included）」などの他の形態の使用は、限定ではない。「有すること（having）」という用語、並びに「有する（have）」、「有する（has）」及び「有した（had）」などの他の形態の使用は、限定ではない。本明細書で使用される場合、移行句中か又は請求項の本文中のいずれであっても、「含む（comprise）」及び「含む（comprising）」という用語は、オープンエンドの意味を有するものとして解釈されるべきである。すなわち、上記の用語は、語句「少なくとも有する」又は「少なくとも含む」と同義であると解釈されるべきである。例えば、プロセスの文脈において使用される場合、「含む（comprising）」という用語は、プロセスが少なくとも列挙された工程を含むが、追加の工程を含み得ることを意味する。化合物、組成物、又はシステムの文脈で使用される場合、「含む（comprising）」という用語は、化合物、組成物、又はシステムが少なくとも列挙された特色又は構成要素を含むが、追加の特色又は構成要素も含み得ることを意味する。

【００４８】

本明細書で使用される場合、単数形「１つ（a）」、「１つ（an）」及び「この（the）」は、内容が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。

【００４９】

本明細書全体を通して使用される「実質的に」、「おおよそ（approximately）」、及び「約」という用語は、処理のばらつきなどに起因する小さな変動を記載及び考慮するために使用されている。例えば、それらは、±５％以下など、±２％以下など、±１％以下など、±０．５％以下など、±０．２％以下など、±０．１％以下など、±０．０５％以下などの、±１０％以下を指し得る。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、糖、及び少なくとも１つのホスフェート基を含み、一部の例では、核酸塩基もまた含む分子を意味することが意図される。核酸塩基を欠くヌクレオチドは、「脱塩基」と称され得る。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド、修飾ペプチドヌクレオチド、修飾ホスフェート糖

骨格ヌクレオチド、及びそれらの混合物を含む。ヌクレオチドの例には、アデノシン一リン酸（adenosine monophosphate、ＡＭＰ）、アデノシン二リン酸（adenosine diphosphate、ＡＤＰ）、アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate、ＡＴＰ）、チミジン一リン酸（thymidine monophosphate、ＴＭＰ）、チミジン二リン酸（thymidine diphosphate、ＴＤＰ）、チミジン三リン酸（thymidine triphosphate、ＴＴＰ）、シチジン一リン酸（cytidine monophosphate、ＣＭＰ）、シチジン二リン酸（cytidine diphosphate、ＣＤＰ）、シチジン三リン酸（cytidine triphosphate、ＣＴＰ）、グアノシン一リン酸（guanosine monophosphate、ＧＭＰ）、グアノシン二リン酸（guanosine diphosphate、ＧＤＰ）、グアノシン三リン酸（guanosine triphosphate、ＧＴＰ）、ウリジン一リン酸（uridine monophosphate、ＵＭＰ）、ウリジン二リン酸（uridine diphosphate、ＵＤＰ）、ウリジン三リン酸（uridine triphosphate、ＵＴＰ）、デオキシアデノシン一リン酸（deoxyadenosine monophosphate、ｄＡＭＰ）、デオキシアデノシン二リン酸（deoxyadenosine diphosphate、ｄＡＤＰ）、デオキシアデノシン三リン酸（deoxyadenosine triphosphate、ｄＡＴＰ）、デオキシチミジン一リン酸（deoxythymidine monophosphate、ｄＴＭＰ）、デオキシチミジン二リン酸（deoxythymidine diphosphate、ｄＴＤＰ）、デオキシチミジン三リン酸（deoxythymidine triphosphate、ｄＴＴＰ）、デオキシシチジン二リン酸（deoxycytidine diphosphate、ｄＣＤＰ）、デオキシシチジン三リン酸（deoxycytidine triphosphate、ｄＣＴＰ）、デオキシグアノシン一リン酸（deoxyguanosine monophosphate、ｄＧＭＰ）、デオキシグアノシン二リン酸（deoxyguanosine diphosphate、ｄＧＤＰ）、デオキシグアノシン三リン酸（deoxyguanosine triphosphate、ｄＧＴＰ）、デオキシウリジン一リン酸（deoxyuridine monophosphate、ｄＵＭＰ）、デオキシウリジン二リン酸（deoxyuridine diphosphate、ｄＵＤＰ）及びデオキシウリジン三リン酸（deoxyuridine triphosphate、ｄＵＴＰ）が含まれる。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語はまた、天然に存在するヌクレオチドと比較して修飾された核酸塩基、糖、骨格及び／又はリン酸部分を含むタイプのヌクレオチドである、任意のヌクレオチドアナログを包含することが意図される。ヌクレオチド類似体はまた、「修飾核酸」と称され得る。例示的な修飾核酸塩基としては、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニン、２－アミノプリン、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、２－アミノアデニン、６－メチルアデニン、６－メチルグアニン、２－プロピルグアニン、２－プロピルアデニン、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、１５－ハロウラシル、１５－ハロシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、５－ウラシル、４－チオウラシル、８－ハロアデニン又はグアニン、８－アミノアデニン又はグアニン、８－チオールアデニン又はグアニン、８－チオアルキルアデニン又はグアニン、８－ヒドロキシルアデニン又はグアニン、５－ハロ置換ウラシル又はシトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニンなどが挙げられる。当該技術分野において既知のとおり、ある特定のヌクレオチドアナログは、ポリヌクレオチド、例えば、アデノシン５’－ホスホスルフェートなどのヌクレオチドアナログに組み込まれた状態にはなり得ない。ヌクレオチドは、任意の好適な数のホスファート、例えば、３、４、５、６、又は６を超えるホスフェートを含み得る。ヌクレオチド類似体には、ロック核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、及び５－ヒドロキシルブチニル－２’－デオキシウリジン（「スーパーＴ」）も含まれる。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、相互に結合しているヌクレオチドの配列を含む分子を指す。ポリヌクレオチドは、ポリマーの非限定的な一例

である。ポリヌクレオチドの例としては、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、並びにロック核酸（ＬＮＡ）及びペプチド核酸（ＰＮＡ）などの、それらの類似体が挙げられる。ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡなどのヌクレオチドの一本鎖配列であり得、二本鎖ＤＮＡなどのヌクレオチドの二本鎖配列であるか、又はヌクレオチドの一本鎖及び二本鎖配列の混合物を含み得る。二本鎖ＤＮＡ（double stranded DNA、ｄｓＤＮＡ）は、ゲノムＤＮＡ、及びＰＣＲ及び増幅生成物を含む。一本鎖ＤＮＡ（single stranded DNA、ｓｓＤＮＡ）は、ｄｓＤＮＡに変換され得、その反対もあり得る。ポリヌクレオチドには、エナンチオマーＤＮＡ、ＬＮＡ、又はＰＮＡなどの非自然発生ＤＮＡが含まれ得る。ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの正確な配列は、既知であっても未知であってもよい。以下は、ポリヌクレオチドの例である：遺伝子又は遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、発現配列タグ（expressed sequence tag、ＥＳＴ）、又は遺伝子発現連続分析（serial analysis of gene expression、ＳＡＧＥ）タグ）、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（messenger RNA、ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いかなる配列の単離されたＤＮＡ、いかなる配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブ、前述のいずれかのプライマー又は増幅されたコピー。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドをポリヌクレオチドに重合することによってポリヌクレオチドを組み立てる活性部位を有する酵素を意味することが意図される。ポリメラーゼは、プライマー及び一本鎖標的ポリヌクレオチドに結合することができ、ヌクレオチドを成長プライマーに連続的に付加して、標的ポリヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する「相補的コピー」ポリヌクレオチドを形成することができる。ＤＮＡポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチドに結合し、次いで、ヌクレオチドを、成長ポリヌクレオチド鎖の３’末端の遊離ヒドロキシル基に連続的に付加する標的ポリヌクレオチドを下流へ移動させ得る。ＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ鋳型から相補的ＤＮＡ分子を合成し得る。ＲＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ鋳型からＲＮＡ分子を合成し得る（転写）。逆転写酵素などの他のＲＮＡポリメラーゼは、ＲＮＡ鋳型からｃＤＮＡ分子を合成し得る。更に他のＲＮＡポリメラーゼは、ＲｄＲｐなどのＲＮＡ鋳型からＲＮＡ分子を合成し得る。ポリメラーゼは、短いＲＮＡ又はＤＮＡ鎖（プライマー）を使用して、鎖成長を開始し得る。いくつかのポリメラーゼは、それらが鎖に塩基を付加する部位の上流の鎖を置換し得る。かかるポリメラーゼは、鎖置換であるとも言われ得、これは、ポリメラーゼによって読み取られる鋳型鎖から相補鎖を除去する活性を有すると言われ得る。

【００５４】

例示的なＤＮＡポリメラーゼとしては、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、９°Ｎｍ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼＩ（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、ＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｌａｒｇｅ）、（クレノウ）断片、クレノウ断片（３’－５’ｅｘｏ－）、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＥＸＴ　ＤＮＡ、ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＩＩ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｈｕｓｉｏｎ（商標）Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＶｅｎｔＲ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ、ＶｅｎｔＲ（商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ、ＲｅｐｌｉＰＨＩ（商標）Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、ｒＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、ｒＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｌａｒｇｅ）、断片（ＩｓｏＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ）、ＭａｓｔｅｒＡｍｐ（商標）ＡｍｐｌｉＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＴｆｌＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｇｏ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＳＰ６　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｂｒ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼベータ、ＴｈｅｒｍｏＰｈｉ　ＤＮＡポリ

メラーゼ、及びＩｓｏｐｏｌ（商標）ＳＤ＋ポリメラーゼが挙げられる。特定の非限定的な例では、ポリメラーゼは、Ｂｓｔ、Ｂｓｕ、及びＰｈｉ２９からなる群から選択される。いくつかのポリメラーゼは、それらの後ろの鎖を分解する活性を有する（３’エキソヌクレアーゼ活性）。いくつかの有用なポリメラーゼは、３’及び／又は５’エキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異又は他の方法で修飾されている。

【００５５】

例示的なＲＮＡポリメラーゼとしては、所与のＲＮＡ鋳型に相補的なＲＮＡ鎖の合成を触媒するＲｄＲｐ（ＲＮＡ依存性、ＲＮＡポリメラーゼ）が挙げられる。例示的なＲｄＲｐとしては、ポリオウイルス３Ｄｐｏｌ、水疱性口内炎ウイルスＬ、及びＣ型肝炎ウイルスＮＳ５Ｂタンパク質が挙げられる。例示的なＲＮＡ逆転写酵素。非限定的な例示的なリストしては、トリ骨髄腫ウイルス（Avian Myelomatosis Virus、ＡＭＶ）、マウスモロニー白血病ウイルス（Murine Moloney Leukemia Virus、ＭＭＬＶ）、及び／又はヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus、ＨＩＶ）由来の逆転写酵素、（ｈＴＥＲＴ）などのテロメラーゼ逆転写酵素、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩＩ、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＶ逆転写酵素、ＰｒｏｔｏＳｃｒｉｐｔ（登録商標）ＩＩ逆転写酵素が挙げられる。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「プライマー」という用語は、ヌクレオチドが遊離３’ＯＨ基を介して付加され得るポリヌクレオチドとして定義される。プライマーは、ブロックが除去されるまで重合を防止する３’ブロックを含み得る。プライマーは、カップリング反応を可能にするか、又はプライマーを別の部分に結合することを可能にするための、５’末端の修飾を含み得る。プライマーは、例えば、ＵＶ光、化学物質、酵素などの適切な条件下で切断され得る、８－オキソ－Ｇなどの１つ以上の部分を含み得る。プライマーの長さは、任意の好適な数の塩基の長さであり得、天然及び／又は非天然ヌクレオチドの好適な組み合わせを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、プライマーにハイブリダイズする（プライマーに相補的な配列を有する）「増幅アダプター」又はより単純には「アダプター」を含み得、プライマーの遊離３’ＯＨ基にヌクレオチドを付加することによって相補的コピーポリヌクレオチドを生成するように増幅され得る。

【００５７】

本明細書で使用するとき、用語「複数の」とは、２つ以上の異なるメンバーの集団を意味することを意図する。複数とは、小さい、中程度、大きい、から非常に大きいサイズまでの範囲であり得る。小さいサイズの複数とは、例えば、数メンバー～数十メンバーの範囲であり得る。中程度のサイズの複数とは、例えば、数十メンバー～約１００メンバー又は数百メンバーの範囲であり得る。大きい複数とは、例えば、約数百メンバー～約１０００メンバー、数千メンバー、及び数万メンバーの範囲であり得る。非常に大きな複数とは、例えば、数万メンバー～約数十万、数百万、数千万、又は数億以上のメンバーの範囲であり得る。したがって、複数は、２から１億をはるかに超えるメンバーのサイズの範囲、並びにメンバーの数によって測定される全てのサイズの間及び上記の例示的な範囲よりも大きい範囲であり得る。したがって、この用語の定義は、２より大きい全ての整数値を含むことが意図される。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「二本鎖」という用語は、ポリヌクレオチドに関して使用される場合、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの全て又は実質的に全てが、相補的ポリヌクレオチド内のそれぞれのヌクレオチドに水素結合していることを意味することが意図される。二本鎖ポリヌクレオチドは「二重鎖」とも称され得る。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「一本鎖」という用語は、ポリヌクレオチドに関して使用される場合、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドのいずれも、相補的ポリヌクレオチド中のそれぞれのヌクレオチドに水素結合していないことを意味する。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「標的ポリヌクレオチド」という用語は、分析又は作用の対象となるポリヌクレオチドを意味することが意図され、「ライブラリーポリヌクレオチド」、「鋳型ポリヌクレオチド」、又は「ライブラリーテンプレート」などの用語を使用しても参照され得る。分析又は動作は、ポリヌクレオチドを増幅、シークエンシング、及び／又は他の手順に供することを含む。標的ポリヌクレオチドは、分析される標的配列に追加のヌクレオチド配列を含み得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、プライマー結合部位として機能する増幅アダプターを含む１つ以上のアダプターを含み得、それは、分析される標的ポリヌクレオチド配列の側方にある（flank）。特定の例では、複数の標的ポリヌクレオチドは、互いに異なる配列を有し得るが、互いに同じである第１及び第２のアダプターを有し得る。特定の標的ポリヌクレオチド配列に隣接し得る２つのアダプターは、互いに同じ配列、又は互いに相補的配列を有し得るか、又は２つのアダプターは、異なる配列を有し得る。したがって、複数の標的ポリヌクレオチド中の種は、例えば、配列決定（例えば、ＳＢＳ）によって評価される未知の配列領域が隣接した、既知の配列領域を含み得る。いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは、単一の末端で増幅アダプターを担持し、かかるアダプターは、標的ポリヌクレオチドの３’末端又は５’末端のいずれかに位置し得る。標的ポリヌクレオチドは、アダプターなしで使用され得、その場合、プライマー結合配列は、標的ポリヌクレオチドに存在する配列を直接用い得る。

【００６１】

「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書においては交換可能に使用される。用語の違いは、特に明記しない限り、サイズ、配列、又は他の特性の任意の特定の違いを示すことを意図するものではない。説明を明確にするために、いくつかのポリヌクレオチド種を含む特定の方法又は組成物を説明する際に、１つの種のポリヌクレオチドを別の種と区別するために用語を使い分けてもよい。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「基材」という用語とは、本明細書に記載されている構成物のための支持体として使用される材料を指す。例となる基板材料は、ガラス、シリカ、プラスチック、石英、金属、金属酸化物、オルガノ－シリケート（例えば、多面体有機シルセスキオキサン（polyhedral organic silsesquioxanes、ＰＯＳＳ））、ポリアクリレート、酸化タンタル、相補型金属酸化膜半導体（complementary metal oxide semiconductor、ＣＭＯＳ）、又はそれらの組み合わせを含むことができる。ＰＯＳＳの一例は、Ｋｅｈａｇｉａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ８６（２００９），ｐｐ．７７６－７７８に記載されているものであり得、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの例では、本出願に使用される基板は、ガラス、溶融シリカ、又は他のシリカ含有材料などのシリカベースの基板を含む。いくつかの例では、シリカ系基材は、ケイ素、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、又は水素化シリコーンを含むことができる。いくつかの例では、本出願において使用される基板は、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ（塩化ビニル）、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、及びポリ（メタクリル酸メチル）などのプラスチック材料又は構成要素を含む。プラスチック材料の例は、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリスチレン、及び環式オレフィンポリマー基材を含む。いくつかの例では、基板は、シリカベースの材料若しくはプラスチック材料、又はそれらの組み合わせであるか、又はそれらを含む。特定の例では、基材は、ガラス又はケイ素系ポリマーを含む少なくとも１つの表面を有する。一部の例では、基材は、金属を含むことができる。一部のこのような例では、金属は金である。いくつかの例では、基材は、金属酸化物を含む少なくとも１つの表面を有する。一例では、表面は、酸化タンタル又は酸化スズを含む。アクリルアミド、エノン、又はアクリレートもまた、基板材料又は構成要素として利用することができる。他の基材材料は、限定するものではないが、ヒ化ガリウム、リン化インジウム、アルミニウム、セラミック、ポリイミド、石英、樹脂、ポリマー及びコポリマーを含むことができる。一部の例では、基材及び／又は基材表面は、石英であり得るか、又は石英を含むことができる。一部の他の例では、基材及び／又は基材表面は、ＧａＡｓ又はＩＴＯなど

の半導体であり得るか、又は当該半導体を含むことができる。上述のリストは、本出願を例示することが意図されているが、本出願を限定するものではない。基材は、単一の材料又は複数の異なる材料を含むことができる。基材は、複合体又は積層体とすることができる。いくつかの例では、基材は、有機シリケート材料を含む。

【００６３】

基材は、水平、円形、球形、ロッド形状、又は任意の他の好適な形状とすることができる。基板は、剛性であってもよく、又は可撓性であってもよい。いくつかの例では、基板は、ビーズ又はフローセルである。

【００６４】

基材は、基材の１つ以上の表面上にパターンを有していなくてもよく、テクスチャード加工を有していてもよく、又はパターンを有していてもよい。一部の例では、基材は、パターン形成されている。そのようなパターンは、ポスト、パッド、ウェル、隆起、チャネル、又は他の三次元凹状若しくは凸構造を含み得る。パターンは、基材の表面全体にわたって規則的であってもよく、又は不規則的であってもよい。パターンは、例えば、ナノインプリントリソグラフィーによって、又は例えば、非金属製表面に特徴部を形成する金属パッドの使用によって形成することができる。

【００６５】

いくつかの例では、本明細書に記載されている基板は、フローセルの少なくとも一部を形成するか、又はフローセル内に位置するか、又はフローセルに結合されている。フローセルは、複数のレーン又は複数のセクターに分割されているフローチャンバを含んでもよい。本明細書において説明されている方法及び組成物に使用することができるフローセルの例、並びにフローセルを製造するための基材例は、限定するものではないが、Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から市販されているものを含む。

【００６６】

本明細書で使用する場合、用語「電極」は、電気を通す固体構造を意味することが意図されている。電極は、金、パラジウム、銀、若しくは白金等の任意の好適な導電性材料、又はそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの例では、電極は、基板上に配置されてもよい。いくつかの例では、電極が、基板を画定してもよい。

【００６７】

本明細書で使用される場合、「ナノポア」という用語は、分子がナノポアの第１の側面からナノポアの第２の側面へ通過することを可能にする開口部を含む構造を意味することが意図され、ナノポアの開口部の一部分は、１００ｎｍ以下、例えば、１０ｎｍ以下、又は２ｎｍ以下の幅を有する。開口部は、ナノポアの第１及び第２の側面を通して延在する。ナノポアの開口部を通過することができる分子は、例えば、イオン、又はアミノ酸若しくはヌクレオチドなどの水溶性分子を含み得る。ナノポアは、バリア内に配置され得るか、又は基板を通して提供され得る。任意選択で、開口部の一部分は、ナノポアの第１及び第２の側面の一方又は両方より狭くてもよく、その場合、開口部のその部分は、「狭窄部」と称され得る。代替的に又は追加的に、ナノポアの開口部、又はナノポアの狭窄部（存在する場合）、又はその両方は、０．１ｎｍ、０．５ｎｍ、１ｎｍ、１０ｎｍ以上であってもよい。ナノポアは、複数の狭窄部、例えば、少なくとも２つ、又は３つ、又は４つ、又は５つ、又は５つ以上の狭窄部を含むことができ、ナノポアは、生物学的ナノポア、固体ナノポア、又は生物学的及び固体ハイブリッドナノポアを含む。

【００６８】

生物学的ナノポアとしては、例えば、ポリペプチドナノポア及びポリヌクレオチドナノポアが挙げられる。「ポリペプチドナノポア」は、１つ以上のポリペプチドから作製されるナノポアを意味することが意図される。１つ以上のポリペプチドは、モノマー、ホモポリマー、又はヘテロポリマーを含み得る。ポリペプチドナノポアの構造には、例えば、α－ヘリックスバンドルナノポア及びβ－バレルナノポア、並びに当該技術分野で周知の他の全てが含まれる。例示的なポリペプチドナノポアとしては、エロリジン、α－溶血素、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｍｅｇｍａｔｉｓポリンＡ、グラミシジンＡ、マルトポ

リン、ＯｍｐＦ、ＯｍｐＣ、ＰｈｏＥ、Ｔｓｘ、Ｆ－線毛、ＳＰ１、ミトコンドリアポリン（ＶＤＡＣ）、Ｔｏｍ４０、外膜ホスホリパーゼＡ、ＣｓｇＧ、及びＮｅｉｓｓｅｒｉａ自己輸送体リポタンパク質（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ａｕｔｏｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ ｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ、ＮａＩＰ）が挙げられる。Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｍｅｇｍａｔｉｓポリンＡ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｍｅｇｍａｔｉｓ ｐｏｒｉｎ Ａ、ＭｓｐＡ）は、親水性分子が細菌に入ることを可能にする、マイコバクテリアによって生成された膜ポリンである。ＭｓｐＡは、ゴブレットに似ており、中央狭窄部を含む、密に相互接続された八量体及び膜貫通ベータバレルを形成する。α－溶血素に関する更なる詳細については、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，０１５，７１４号を参照されたい。ＳＰ１に関する更なる詳細については、その全容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，４９：１７４１－１７４３（２０１３）を参照されたい。ＭｓｐＡに関する更なる詳細については、その全容が共に参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｕｔｌｅｒらの「Ｓｉｎｇｌｅ－ｍｏｌｅｃｕｌｅ ＤＮＡ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ａｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＭｓｐＡ ｐｒｏｔｅｉｎ ｎａｎｏｐｏｒｅ」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０５：２０６４７－２０６５２（２００８）及びＤｅｒｒｉｎｇｔｏｎらの「Ｎａｎｏｐｏｒｅ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｗｉｔｈ ＭｓｐＡ」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１０７：１６０６０－１６０６５（２０１０）を参照されたい。他のナノポアとしては、例えば、ノカルジア・ファルシニカ（Ｎｏｒｃａｄｉａ ｆａｒｃｉｎｉｃａ）由来のＭｓｐＡホモログ、及びライセニンが挙げられる。ライセニンに関する更なる詳細については、その全容が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１３／１５３３５９号を参照されたい。

【００６９】

「ポリヌクレオチドナノポア」は、１つ以上の核酸ポリマーから作製されるナノポアを意味することが意図される。ポリヌクレオチドナノポアは、例えば、ポリヌクレオチドオリガミを含み得る。

【００７０】

「固体ナノポア」は、生物学的起源ではない１つ以上の材料から作製されるナノポアを意味することが意図される。固体ナノポアは、無機又は有機材料で形成され得る。固体ナノポアは、例えば、窒化ケイ素（ｓｉｌｉｃｏｎ ｎｉｔｒｉｄｅ、ＳｉＮ）、二酸化ケイ素（SiO_2）、炭化ケイ素（ＳｉＣ）、酸化ハフニウム（HfO_2）、二硫化モリブデン（MoS_2）、六方晶窒化ホウ素（ｈ－ＢＮ）、又はグラフェンを含む。固体ナノポアは、固体膜、例えば、任意のそのような材料を含む膜内に形成された開口部を含んでもよい。

【００７１】

「生物学的及び固体ハイブリッドナノポア」は、生物学的起源及び非生物学的起源の両方の材料から作製されるハイブリッドナノポアを意味することが意図される。生物学的起源の材料は、上で定義されており、例えば、ポリペプチド及びポリヌクレオチドを含む。生物学的及び固体ハイブリッドナノポアは、例えば、ポリペプチド固体ハイブリッドナノポア及びポリヌクレオチド固体ナノポアを含む。

【００７２】

本明細書で使用される場合、「バリア」は、通常、バリアの一方の側面からバリアの他方の側面への分子の通過を阻害する構造を意味することが意図される。通過が阻害される分子としては、例えば、イオン、又はヌクレオチド及びアミノ酸などの水溶性分子が挙げられ得る。しかしながら、ナノポアがバリア内に配置される場合、ナノポアの開口部は、バリアの一方の側面からバリアの他方の側面への分子の通過を可能にし得る。１つの具体例として、ナノポアがバリア内に配置される場合、ナノポアの開口部は、バリアの一方の側面からバリアの他方の側面への分子の通過を可能にし得る。バリアには、脂質二重層などの生物学的起源の膜、及び固体膜又は基板などの非生物学的バリアが含まれる。

【００７３】

本明細書で使用される場合、「生物学的起源の」は、有機体若しくは細胞などの生物学的環境、又は合成的に製造されたバージョンの生物学的に利用可能な構造体に由来するか

、又はそれから単離された材料を指す。
【００７４】
本明細書で使用される場合、「固体」は、生物学的起源ではない材料を指す。
【００７５】
本明細書で使用される場合、「合成」とは、生物学的起源ではない膜材料（例えば、ポリマー材料、合成リン脂質、固体膜、又はそれらの組み合わせ）を指す。
【００７６】
本明細書で使用される場合、「溶液」は、２つ以上の物質を含む均質な混合物を指すことが意図される。このような混合物において、溶質は、溶媒と呼ばれる別の物質に溶解される物質である。溶液は、単一の溶質を含んでもよく、又は複数の溶質を含んでもよい。「水溶液」は、溶媒が水であるか、又は水を含む溶液を指す。
【００７７】
本明細書で使用される場合、「ポリマー膜（polymeric membrane）」又は「ポリマー膜（polymer membrane）」は、生物学的起源ではないポリマーから主に構成される合成バリアを指す。いくつかの例では、ポリマー膜は、生物学的起源ではないポリマーから本質的になる。ブロックコポリマーは、生物学的起源ではなく、本バリアに含まれ得るポリマーの例である。イオン性末端基を有する疎水性ポリマーは、生物学的起源ではなく、本バリアに含まれ得るポリマーの別の例である。本発明のバリアは、生物学的起源ではないポリマーに関連するので、「ポリマー膜」、「ポリマー膜」、「膜」、及び「バリア」という用語は、用語「バリア」及び「膜」が一般に他のタイプの材料も同様に包含し得るとしても、本発明のバリアに言及する場合、本明細書中で互換的に使用され得る。
【００７８】
本明細書で使用される場合、「ブロックコポリマー」という用語は、第１のタイプのモノマーを含む少なくとも第１の部分又は「ブロック」と、第１の部分に直接又は間接的に結合され、第２の異なるタイプのモノマーを含む少なくとも第２の部分又は「ブロック」とを有するポリマーを指すことが意図される。第１の部分は、第１のタイプのモノマーのポリマーを含み得、又は第２の部分は、第２のタイプのモノマーのポリマーを含み得、又は第１の部分は、第１のタイプのモノマーのポリマーを含み、かつ第２の部分は第２のタイプのモノマーのポリマーを含んでもよい。第１の部分は、任意選択で、第１のタイプのモノマーの親水性とは異なる親水性を有する末端基を含み得るか、又は第２の部分は、任意選択で、第２のタイプのモノマーの親水性とは異なる親水性を有する末端基を含み得るか、又は第１の部分は、任意選択で、第１のタイプのモノマーの親水性とは異なる親水性を有する末端基を含み得、そして第２の部分は、任意選択で、第２のタイプのモノマーの親水性とは異なる親水性を有する末端基を含み得る。任意の親水性ブロックの末端基は、そのような親水性ブロックを使用して形成されたバリアの外面に位置し得る。特定の構成に依存して、任意の疎水性ブロックの末端基は、バリアの内面に、又はそのような疎水性ブロックを用いて形成されたバリアの外面に位置し得る。
【００７９】
ブロックコポリマーとしては、ジブロックコポリマー及びトリブロックコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。
【００８０】
「ジブロックコポリマー」は、互いに直接的又は間接的に結合された第１のブロック及び第２のブロックを含むか、又は本質的にそれらからなるブロックコポリマーを指すことが意図される。第１のブロックは親水性であり得、第２のブロックは疎水性であり得、その場合、ジブロックコポリマーは「ＡＢ」コポリマーと呼ばれ得、「Ａ」は親水性ブロックを指し、「Ｂ」は疎水性ブロックを指す。
【００８１】
「トリブロックコポリマー」は、互いに直接又は間接的に結合された第１のブロック、第２のブロック、及び第３のブロックを含むか、又は本質的にそれらからなるブロックコポリマーを指すことが意図される。第１のブロック及び第３のブロックは、互いに同じタ

イプのモノマー（反復単位）を含み得るか、又は本質的にそれらからなり得、第２のブロックは、異なるタイプのモノマー（反復単位）を含み得る。いくつかの例では、第１のブロックは、疎水性であり得、第２のブロックは、親水性であり得、第３のブロックは、疎水性であり得、第１のブロックと同じタイプのモノマーを含み、この場合、トリブロックコポリマーは「ＢＡＢ」コポリマーと呼ばれてもよく、「Ａ」は親水性ブロックを指し、「Ｂ」は疎水性ブロックを指す。他の例では、第１のブロックは、親水性であり得、第２のブロックは、疎水性であり得、第３のブロックは、親水性であり得、第１のブロックと同じタイプのモノマーを含み、この場合、トリブロックコポリマーは「ＡＢＡ」コポリマーと呼ばれてもよく、「Ａ」は親水性ブロックを指し、「Ｂ」は疎水性ブロックを指す。

【００８２】

ポリマー膜内のポリマー鎖（例えば、ブロックコポリマー）の分子の特定の配置は、とりわけ、それぞれのブロック長、異なるブロックにおいて使用されるモノマーのタイプ、ブロックの相対的な親水性及び疎水性、膜が形成される流体の組成、及び／又は膜内のポリマー鎖の密度に依存し得る。膜の形成中、これらの因子及び他の因子は、膜の自由エネルギーを実質的に最小化するような様式で分子を横方向に位置付け、再配向するポリマー鎖の分子間に力を生成する。一旦ポリマー鎖がこれらの再配列を完了すると、分子が膜内でいくらかの運動の流動性を保持し得るとしても、膜は実質的に「安定」であると考えられ得る。

【００８３】

本明細書で使用される場合、「疎水性」という用語は、水分子を排除する傾向があることを意味することが意図される。疎水性は、それらの環境に対する分子の極性の違いに関する相対的な概念である。極性環境中の非極性（疎水性）分子は、極性（親水性）分子との接触を最小限に低減して系の自由エネルギーを全体として低下させるような様式で互いに会合する傾向がある。

【００８４】

本明細書で使用される場合、「親水性」という用語は、水分子に結合する傾向があることを意味することが意図される。極性環境における極性（親水性）分子は、非極性（疎水性）分子との接触を最小限に低減して系の自由エネルギーを全体として低下させるような様式で互いに会合する傾向がある。

【００８５】

本明細書中で使用される場合、「両親媒性」という用語は、親水性特性及び疎水性特性の両方を有することを意味することが意図される。例えば、疎水性ブロック及び親水性ブロックを含むブロックコポリマーは、「両親媒性」であると考えられ得る。例示的に、ＡＢコポリマー、ＡＢＡコポリマー、及びＢＡＢコポリマーは全て、両親媒性であると考えられ得る。

【００８６】

本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、１つの要素が別の要素に付着される部分、分子（単数又は複数）を意味することが意図される。リンカーは、共有結合であってもよく、又は非共有結合であってもよい。共有結合リンカーの非限定的な例としては、アルキル鎖、ポリエーテル、アミド、エステル、アリール基、ポリアリールなどの部分が挙げられる。非共有結合リンカーの非限定的な例としては、ホスト－ゲスト複合体化、シクロデキストリン／ノルボルネン、β－ＣＤとのアダマンタン包、複合体化、ＤＮＡハイブリダイゼーション相互作用、ストレプトアビジン／ビオチンなどが挙げられる。

【００８７】

本明細書中で使用される場合、「ＰＥＯ」、「ＰＥＧ」、「ポリ（エチレンオキシド）」、及び「ポリ（エチレングリコール）」という用語は、互換的に使用されることが意図され、－［CH_2-CH_2-O］$_n$－を含む。いくつかの例では、ｎは約２～約１００である。

【００８８】

本明細書で使用される場合、「バリア支持体」という用語は、バリアを懸架することが

できる構造体を指すことが意図される。バリア支持体は、バリアの第１の部分が開口部にわたって懸架され、バリアの第２の部分がバリア上に配置され、バリアによって支持されるように、開口部を画定し得る。バリア支持体は、開口部を画定し、バリアを開口部にわたって懸架するための要素の任意の好適な配置を含み得る。いくつかの例では、バリア支持体は、貫通して画定された開口部を有する基板を含み得、その開口部にわたってバリアが懸架され得る。追加的に又は代替的に、バリア支持体は、１つ以上の第２の特徴（ウェルの底面など）に対して隆起した１つ以上の第１の特徴（基板内のウェルの１つ以上のリップ又はレッジなど）を含み得、（ａ）１つ以上の第１の特徴と（ｂ）１つ以上の第２の特徴との間の高さの差は、バリアが懸架され得る開口部を画定する。開口部は、円形、楕円形、多角形、又は不規則な形状などの任意の適切な形状を有し得る。バリア支持体は、任意の好適な物質、又は物質の組み合わせを含み得る。例えば、バリア支持体は、生物由来であってもよく、又は固体状態であってもよい。いくつかの例では、バリア支持体は、有機材料、例えば、ＳＵ－８、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）、パリレンなどの硬化性樹脂を含み得るか、又は本質的にそれらからなり得る。追加的に又は代替的に、種々の実施例では、バリア支持体は、無機材料、例えば、窒化ケイ素、酸化ケイ素、又は二硫化モリブデンを含み得るか、又は本質的にそれらからなり得る。

【００８９】

本明細書で使用される場合、「環状部」という用語は、バリア支持体に付着し、バリア内に位置し、バリア支持体によって画定される開口部内に部分的に延在する液体を指すことが意図される。したがって、環状部は、バリアの開口部の形状に従い得る、例えば、円形、楕円形、多角形、又は不規則形状の形状を有し得ることが理解されるであろう。

【００９０】

ジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むナノポアデバイス及びその作製方法

ジブロックコポリマー又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含むいくつかの例示的なデバイス、及びその作製方法を、図１、図２Ａ～図２Ｃ、図３Ａ～図３Ｃ、図４、図５、図６、図７、図８、図１４Ａ～図１４Ｂ、図１５、図１６、及び図１７を用いて説明する。

【００９１】

図１は、ジブロックコポリマー又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを含む例示的なナノポア組成物及びデバイス１００の断面図を概略的に示す。デバイス１００は、第１の（トランス）側面１１１及び第２の（シス）側面１１２を有するバリア１０１を含む流体ウェル１００’と、流体ウェル１００’内にあり、バリアの第１の側面１１１と接触する第１の流体１２０と、流体ウェル内にあり、バリアの第２の側面１１２と接触する第２の流体１２０’とを含む。バリア１０１は、通常、バリアの一方の側面からバリアの他方の側面への分子の通過を阻止する、例えば、通常、流体１２０と流体１２０’との間の接触を阻止する、任意の好適な構造を有してもよい。例えば、図１に例解されるように、バリア１０１は、任意選択で、第１の層１０７及び第２の層１０８を含み得、その一方又は両方が、その層を横切る分子の流れを阻害する。例示的に、バリア１０１は、本明細書で提供されるＡＢジブロックコポリマー、又は本明細書で提供されるＢＡＢトリブロックコポリマー、又は本明細書で提供される特定のＡＢＡトリブロックコポリマーを使用してそれぞれ形成され得る層１０７及び１０８を含む二重層を含み得、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、又は１６を参照して以下により詳細に記載されるような構造を有し得る。あるいは、バリア１０１は、その層にわたる分子の流れを抑制する単一層のみを含み得る。例示的に、バリア１０１は、本明細書で提供される特定のＡＢＡトリブロックコポリマーを使用して形成され得る単一層を含み得、図２Ａ及び図１５を参照して以下により詳細に記載されるような構造を有し得る。他の例では、バリア１０１は、本明細書で提供される特定のＡＢＡトリブロックコポリマーを使用して形成される、部分的に単一層、及び部分的に二重層であり得、図２Ａ及び図１５を参照して以下でより詳細に説明されるよう

な構造を有し得る。

【００９２】

第１の流体１２０は、第１の濃度の塩１６０を含む第１の組成を有し得、この塩は簡略化のために陽イオンとして表されてもよいが、対イオンも存在してもよいことが理解されよう。第２の流体１２０’は、第１の濃度と同じであっても異なっていてもよい第２の濃度の塩１６０を含む第２の組成を有して得る。第１の流体１２０及び第２の流体１２０’には、例えば、一般的な塩から、イオン結晶、金属錯体、イオン液体、又は水溶性有機イオンまでの範囲の、任意の適切な塩１６０が使用され得る。例えば、塩は、カチオン（Ｈ、Ｌｉ、Ｎａ、Ｋ、NH_4、Ａｇ、Ｃａ、Ｂａ、及び／又はＭｇなどであるが、これらに限定されない）とアニオン（ＯＨ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、NO_3、ClO_4、Ｆ、SO_4、及び／又はCO_3^{2-}．．．などであるが、これらに限定されない）との任意の適切な組み合わせを含み得る。１つの非限定的な例では、塩は、塩化カリウム（ＫＣｌ）を含む。第１の流体及び第２の流体は、任意選択で、他の溶質の任意の好適な組み合わせを含んでもよいことも理解されるであろう。例示的に、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’は、水性緩衝液（例えば、Ｆｉｓｈｅｒ　ＢｉｏＲｅａｇｅｎｔｓから市販されているＮ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－２－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ））を含み得る。塩１６０の第１の濃度と第２の濃度との間、及び／又は第１の流体の他の成分と第２の流体の他の成分との間の任意の差は、バリア１０１をわたる浸透圧１９１を発生させ得る。本明細書において提供されるように、バリア１０１において使用されるジブロック又はトリブロックコポリマーは、所望の期間にわたる使用のために、例えば、図４～７又は１７を参照して記載されるような様式でポリヌクレオチドを配列決定する過程にわたる使用のために、十分な安定性を有するバリアを提供するように選択され得る。

【００９３】

引き続き図１を参照すると、本明細書に提供されるいくつかの例では、デバイス１００は、任意選択で、バリア１０１内に配置され、第１の側面１１１を第２の側面１１２に流体結合する開口部１１３を提供する、ナノポアを更に含み得る。したがって、ナノポア１１０の開口部１１３は、流体１２０及び／又は流体１２０’がバリア１０１を通って流れるための経路を提供し得る。例えば、塩１６０の一部は、バリア１０１の第２の側面１１２からバリアの第１の側面１１１へ開口部１１３を通って移動し得る。ナノポア１１０は、固体ナノポア、生物学的ナノポア（例えば、図１に例解されるようなＭｓｐＡ）、又は生物学的及び固体ハイブリッドナノポアを含み得る。バリア及びナノポアの非限定的な例及び特性は、本明細書の他の箇所、並びに米国特許第９，７０８，６５５号に記載されており、その全容が参照により本明細書に組み込まれる。図１に示されるような様式で、デバイス１００は、任意選択で、第１の流体１２０と接触する第１の電極１０２と、第２の流体１２０’と接触する第２の電極１０３と、第１及び第２の電極と動作可能に通信し、開口部の電気的特性の変化を検出するように構成された回路１８０とを含み得る。このような変化は、例えば、任意の適切な刺激に応答し得る。実際、本発明の方法、組成物、及びデバイスは、ポリヌクレオチド配列決定のための任意の適切な方法又はデバイスを含む、任意の適切な適用又は状況において使用され得ることが理解される。

【００９４】

いくつかの例では、第１の流体１２０と第２の流体１２０’との間のバリア１０１の第１の層１０７は、ジブロック又はトリブロックコポリマーの第１の複数の分子を含み、バリア１０１の第２の層１０８は、コポリマーの第２の複数の分子を含む。コポリマーがジブロックコポリマー（ＡＢと称され得る）である例では、各分子は、親水性ブロックに結合された疎水性ブロックを含み得る。コポリマーがトリブロックコポリマーであるいくつかの例では、各分子は、第１の疎水性ブロック及び第２の疎水性ブロックと、それらの間に配置された親水性ブロックとを含んでいてもよい（このポリマーはＢＡＢと称され得る）。コポリマーがジブロック（ＡＢ）であるかトリブロック（ＢＡＢ）であるかに関係なく、第１の複数の分子の親水性ブロックは、バリア１０１の第１の外面、例えば、第１の側面１１１で流体１２０に接触する層１０７の表面を形成し得る。第２の複数の分子の親

水性ブロックは、バリア１０１の第２の外面、例えば、第２の側面１１２上の流体１２０’に接触する層１０８の表面を形成し得る。第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性ブロックは、バリア内で互いに接触し得る。

【００９５】

他の例では、第１の流体１２０と第２の流体１２０’との間のバリア１０１は、第１及び第２の親水性ブロックと、それらの間に配置された疎水性ブロックとを含むトリブロックコポリマーの複数の分子を含む（このポリマーはＡＢＡと称され得る）。複数の分子の第１の親水性ブロックは、バリア１０１の第１の外面、例えば、第１の側面１１１上で流体１２０に接触するバリア１０１の表面を形成し得る。複数の分子の第２の親水性ブロックは、例えば、第２の側面１１２上の流体１２０’と接触する、バリア１０１の第２の外面を形成し得る。複数の分子の疎水性ブロックは、バリア内で互いに接触し得る。いくつかの例では、バリア１０１を形成するＡＢＡ分子は、図１に示される２つの層ではなく単一の層に存在し得る。他の例では、バリア１０１を形成するＡＢＡ分子は、分子のＢブロックの分子が、所与の分子の両方のＡブロックが互いに同じ流体に接触するように折り畳まれるので、図１に示されるものと同様の二重層中に存在し得る。更に他の例では、バリア１０１の一部は単一層であってもよく（その部分のＡＢＡ分子が一方の流体から他方の流体に延在するため）、バリア１０１の異なる部分は二重層であってもよい（その部分のＡＢＡ分子が折り畳まれ、その部分のＡブロックが互いに同じ流体に接触するため）。図２Ａは、この例を示す。

【００９６】

例えば、図２Ａ～２Ｃは、図１のナノポア組成物及びデバイスに含まれ得るジブロック又はトリブロックコポリマーを使用するバリアを概略的に示す。このようなバリアは、任意の他の組成物又はデバイスにおける使用のために適切に適合され得、ナノポアとの使用に限定されないことが理解される。

【００９７】

ここで図２Ａを参照すると、バリア２２１は、トリブロック「ＡＢＡ」コポリマーを使用する。バリア２２１は、流体１２０及び１２０’の両方に接触し得る層２２９を含む。層２２９は、トリブロックＡＢＡコポリマーの複数の分子２２２を含む。図２Ａに示すように、トリブロックコポリマーの各分子２２２は、それぞれが「Ａ」で示され、おおよそ長さ「Ａ」である第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックと、第１の親水性ブロックと第２の親水性ブロックとの間に配置され、「Ｂ」で示され、おおよそ長さ「Ｂ」である疎水性ブロックとを含む。分子２２２（層２２９を形成する分子）の第１の端部における親水性Ａブロックは、バリア２２１、例えば、接触流体１２０の第１の外面を形成する。分子２２２の第２の端部における親水性Ａブロックは、バリア２２１の第２の外面、例えば、接触流体１２０’を形成する。分子２２２の疎水性Ｂブロックは、図２Ｃに示すように、バリア２１１内にある。示されるように、層２２９内の分子２２２の大部分は、実質的に直線的に、かつ互いに同じ配向で延在し得る。任意選択で、図２Ａに示されるように、分子２２２’のいくつかは、そのような分子の親水性Ａブロックの両方が互いに同じ流体に接触し得るように、Ｂブロックにおいて折り畳まれ得る。したがって、図２Ａに示す例は、部分的に単一層であり、部分的に二重層であると考えられ得る。他の例（具体的に示さず）では、層２２９は、例えば、図１を参照して説明したように、完全に単一層であってもよく、又は完全に二重層であってもよい。図２Ａに示すように、膜が実質的に直線的に延在する分子２２２及び／又は折り畳まれた分子２２２’を含むかどうかにかかわらず、層２２９はおおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有し得る。いくつかの例では、長さＡは、約１ＲＵ～約１００ＲＵ、例えば、約２ＲＵ～約１００ＲＵ、又は約１０ＲＵ～約８０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約５０ＲＵ、又は約５０ＲＵ～約８０ＲＵである。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、長さＢは、約２ＲＵ～約１００ＲＵ、又は約５ＲＵ～約１００ＲＵ、例えば、約１０ＲＵ～約８０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約５０ＲＵ、又は約５０ＲＵ～約８０ＲＵである。親水性又は疎水性ブロックに結合される任意の末端基が、バリアの全体厚さに寄与することが理解されるであろう。任意選択で、図２Ａを参照して説明し

たバリア２２１は、図１５を参照して説明したように開口部にわたって懸架され得る。

【００９８】

ここで図２Ｂを参照すると、バリア２０１は、ジブロック「ＡＢ」コポリマーを使用する。バリア２０１は、図１を参照して説明した層１０７及び１０８と同様に、流体１２０と接触し得る第１の層２０７と、流体１２０’と接触し得る第２の層２０８とを含む。第１の層２０７は、ジブロックＡＢコポリマーの第１の複数の分子２０２を含み、第２の層２０８は、ジブロックＡＢコポリマーの第２の複数の分子２０２を含む。図２Ｂに示されるように、ジブロックコポリマーの各分子２０２は、「Ａ」で示され、おおよそ長さ「Ａ」である親水性ブロックに結合された、「Ｂ」で示され、おおよそ長さ「Ｂ」である疎水性ブロックを含む。第１の複数の分子２０２（層２０７を形成する分子）の親水性Ａブロックは、バリア２０１、例えば、接触流体１２０の第１の外面を形成する。第２の複数の分子２０２（層２０８を形成する分子）の親水性Ａブロックは、バリア２０２の第２の外面、例えば、接触流体１２０’を形成する。第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性Ｂブロックのそれぞれの末端は、図２Ｂに示されるようにバリア２０１内で互いに接触する。示されるように、層２０７内の実質的に全ての分子２０２は、実質的に直線的に、互いに同じ配向で延在し得、同様に、層２０７内の実質的に全ての分子２０２は、実質的に直線的に、互いに同じ配向で延在し得る（これは、層２０８内の分子の配向と反対である）。したがって、第１の層２０７及び第２の層２０８はそれぞれ、おおよそＡ＋Ｂの厚さを有し得、バリア２０１は、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有し得る。いくつかの例では、長さＡは、約２反復単位（ＲＵ）～約１００ＲＵ、又は約１反復単位（ＲＵ）～約５０ＲＵ、例えば、約５ＲＵ～約４０ＲＵ、又は約１０ＲＵ～約３０ＲＵ、又は約１０ＲＵ～約２０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約４０ＲＵである。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、長さＢは、約２ＲＵ～約１００ＲＵ、５ＲＵ～約１００ＲＵ、例えば、約１０ＲＵ～約８０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約５０ＲＵ、又は約５０ＲＵ～約８０ＲＵである。任意選択で、図２Ｂを参照して説明したバリア２０１は、図１４Ａ～図１４Ｂを参照して説明したように開口部にわたって懸架されてもよい。

【００９９】

ここで図２Ｃを参照すると、バリア２１１は、トリブロック「ＢＡＢ」コポリマーを使用する。バリア２１１は、図１を参照して説明した層１０７及び１０８と同様に、流体１２０と接触し得る第１の層２１７と、流体１２０’と接触し得る第２の層２１８とを含む。第１の層２１７は、トリブロックコポリマーの第１の複数の分子２１２を含み、第２の層２１８は、トリブロックコポリマーの第２の複数の分子２１２を含む。図２Ｃに示すように、トリブロックコポリマーの各分子２１２は、それぞれが「Ｂ」で示され、おおよそ長さ「Ｂ」である第１の疎水性ブロック及び第２の疎水性ブロックと、第１の疎水性ブロックと第２の疎水性ブロックとの間に配置され、「Ａ」で示され、おおよそ長さ「Ａ」である親水性ブロックとを含む。第１の複数の分子２１２（層２１７を形成する分子）の親水性Ａブロックは、バリア２１１、例えば、接触流体１２０の第１の外面を形成する。第２の複数の分子２１２（層２１８を形成する分子）の親水性Ａブロックは、バリア２１１の第２の外面、例えば、接触流体１２０’を形成する。第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性Ｂブロックのそれぞれの末端は、図２Ｃに示されるようにバリア２１１内で互いに接触する。示されるように、層２１７内の実質的に全ての分子２１２は、互いに同じ配向で延在し得、Ｂブロックがバリア２１１の内部にある一方でＡブロックが流体に接触することができるように、Ａブロックにおいて折り畳まれ得る。同様に、層２１７内の実質的に全ての分子２１２は、互いに同じ配向（層２１８内の分子の配向と反対である）で延在し得、Ａブロックが流体に接触する一方でＢブロックがバリア２１１の内部にあるように、Ａブロックにおいて折り畳まれ得る。したがって、第１の層２１７及び第２の層２１８はそれぞれ、おおよそＡ／２＋Ｂの厚さを有し得、バリア２１１は、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有し得る。いくつかの例では、長さＡは、約２ＲＵ～約１００ＲＵ、例えば、約１０ＲＵ～約８０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約５０ＲＵ、又は約５０ＲＵ～約８０ＲＵである。追加的に又は代替的に、いくつかの例では、長さＢは、約２ＲＵ～約１００Ｒ

Ｕ、又は約５ＲＵ～約１００ＲＵ、例えば、約１０ＲＵ～約８０ＲＵ、又は約２０ＲＵ～約５０ＲＵ、又は約５０ＲＵ～約８０ＲＵである。任意選択で、図２Ｃを参照して説明したバリア２１１は、図１６を参照して説明したような様式で開口部にわたって懸架され得る。

【０１００】

本明細書で提供される様々なバリアの層は、任意の好適な寸法を有するように構成され得ることが理解されるであろう。例示的には、互いに同様の寸法のバリアを形成するために、

Ａ－Ｂ－Ａトリブロックコポリマー（図２Ａ）は、それぞれ長さＡの２つの親水性ブロック（各ＡブロックはM_w＝ｘである）と、長さＢの１つの疎水性ブロック（M_w＝ｙ）とを有し得る。自己集合すると、それらのＡ－Ｂ－Ａトリブロックコポリマーは、長さＡの上部親水性層、長さＢのコア疎水性層、及び長さＡの底部親水性層を有する膜を形成する。

Ａ－Ｂジブロックコポリマー（図２Ｂ）は、長さＡの１つの親水性ブロック（M_w＝ｘ）と、長さＢの１つの疎水性ブロック（M_w＝ｙ／２）とを有し得る。自己集合すると、それらのＡ－Ｂジブロックコポリマーは、長さＡの上部親水性層、長さ２Ｂのコア疎水性層、及び長さＡの底部親水性層を有する膜を形成する。

Ｂ－Ａ－Ｂトリブロックコポリマー（図２Ｃ）は、長さＡの１つの親水性ブロック（M_w＝ｘ）と、それぞれが長さＢの２つの疎水性ブロック（各ＢブロックはM_w＝ｙ／２である）とを有し得る。自己集合すると、これらのＢ－Ａ－Ｂトリブロックコポリマーは、長さＡ／２の上部親水性層、長さ２Ｂのコア疎水性層、及び長さＡ／２の底部親水性層を有する膜を形成する。

【０１０１】

追加的に又は代替的に、膜の層へのポリマー充填は、バリアのそれぞれについての親水性比に影響を及ぼし得、親水性比は、親水性ブロックの分子量とブロックコポリマー（ＢＣＰ）の総分子量（ＭＷ又はM_w）との間の比として定義され得る（親水性比＝M_w親水性ブロック／M_wＢＣＰ）。例えば、

Ａ－Ｂ－Ａトリブロックコポリマー（図２Ａ）、親水性比＝２ｘ／（２ｘ＋ｙ）；

Ａ－Ｂジブロックコポリマー（図２Ｂ）、親水性比＝ｘ／（ｘ＋ｙ／２）；及び

Ｂ－Ａ－Ｂトリブロックコポリマー（図２Ｃ）、親水性比＝ｘ／（ｘ＋ｙ）。

【０１０２】

図１４Ａ～１４Ｂは、図１のナノポア組成物及びデバイスの１つの非限定的な例の更なる詳細の平面図及び断面図を概略的に示す。より具体的には、図１４Ａ～１４Ｂに示される例では、バリア１０１は、開口部１４３０を画定するバリア支持体１４００を使用して懸架され得る。例えば、バリア支持体１４００は、それを通して画定される開口部１４３０、例えば、実質的に円形の開口部、又は別の形状を有する開口部を有する基板を含み得る。追加的に又は代替的に、バリア支持体は、ウェルのいずれかの側面のリップ又はレッジなどの、ナノポアデバイスが形成されるウェルの１つ以上の特徴を含むことができる。バリア支持体に含まれ得る材料の非限定的な例は、更に上に提供される。疎水性（非極性）溶媒を含み、他の化合物も含み得る環状部１４１０は、バリア支持体１４００に付着し得、バリア１０１の一部を支持し得、例えば、バリア１０１内（ここでは、層１４０１と層１４０２との間）に位置し得る。追加的に、環状部１４１０は、図１４Ａに図示されるように内向きにテーパ状であり得る。バリア１０１の分子１４２１の外側部分は、支持体１４００上に配置され得る一方（例えば、開口部１４３０とバリア周辺部１４２０との間に延在する部分）、分子の内側部分は、バリア１０１の自立部分（例えば、一部が環状部１４１０によって支持される開口部１４１０内の部分）を形成し得る。本明細書の他の箇所に記載されるような動作を使用して、バリア１０１が調製され、ナノポア１１０がバリア１０１の自立部分に挿入され得る。図１４Ａ～図１４Ｂは、バリア１０１内のナノポア１１０を示すが、ナノポアは省略されてもよく、バリア１０１は任意の適切な目的のために使用され得ることを理解されたい。より一般的には、本明細書に記載されるバリアは、

ナノポアと共に使用するのに（例えば、図４～７及び１７を参照して記載されるようなナノポア配列決定のために）特に好適であるが、本バリアは、必ずしもその中に挿入されたナノポアを有する必要はないことを理解されたい。

【０１０３】

図１４Ａに示される非限定的な例では、バリア１０１は、第１の複数の両親媒性分子１４２１を含む第１の層１４０１と、第１の複数の両親媒性分子に接触する第２の複数の両親媒性分子を含む第２の層１４０２とを含み得る。図１４Ａに示す非限定的な例では、コポリマーは、図２Ｂを参照して説明したようなジブロックコポリマー（ＡＢ）である。ここで、各分子１４２１は、疎水性「Ｂ」ブロック１４３１（濃い塗りつぶしの円１４４１は疎水性モノマーを表す）と、それに直接的又は間接的に結合された親水性「Ａ」ブロック１４３２（薄い塗りつぶしの円１４４２は親水性モノマーを表す）とを含む。図１５及び図１６を参照して説明されるような他の例では、コポリマーは代わりにトリブロックコポリマー（例えば、それぞれＡＢＡ又はＢＡＢ）を含み得る。図１４Ａに示す例では、第１の複数の分子１４２１の親水性ブロック１４３２は、バリア１０１の第１の外面、例えば、第１の側面１１１で流体１２０に接触するバリア１０１の表面を形成し得る。第２の複数の分子１４２１の親水性ブロック１４３２は、バリア１０１の第２の外面、例えば、第２の側面１１２上の流体１２０’に接触するバリア１０１の表面を形成し得る。第１の複数の分子及び第２の複数の分子１４２１の疎水性ブロック１４３１は、バリア内で互いに接触し得る。

【０１０４】

図１４Ａ～図１４Ｂは、ジブロックコポリマーを含む懸架バリアを示すが、本明細書で提供される他のタイプのポリマーを含む懸架バリアも同様に企図されることが理解されよう。図１５は、図１４Ａ～１４Ｂを参照して説明される例で使用され得る代替的なバリアを概略的に示す。図１５は、図１４Ａ及び１４Ｂを参照して説明されるように、バリア支持体１４００及び環状部１４１０を使用して懸架されるバリア１５０１を示す。この例では、バリア１５０１は、図２Ａを参照して説明したようなＡＢＡトリブロックコポリマーの分子を含む。ここで、トリブロックコポリマーは、親水性「Ａ」セクション１５４２に結合され、その間にある疎水性「Ｂ」セクション１５４１を含む。図１５に示される例では、各個々のＡＢＡ分子は、２つの配置のうちの１つであり得る。例えば、ＡＢＡ分子１５２１は、バリアの各側面に「Ａ」部分を有し、バリアの中央に「Ｂ」部分を有し、直線状に層を通って延在し得る。あるいは、例えば、ＡＢＡ分子１５２２は、両方の「Ａ」セクションがバリアの同じ側面にあり、「Ｂ」セクションがバリアの中央にあるように、バリアの中央まで延在し、次いでそれら自体の上に折り返されてもよい。したがって、この例では、バリア１５０１は、部分的に単一層であり、部分的に二重層であると考えられ得る。バリア１５０１が、バリアを通って直線状に延在する分子１５２１を実質的に含む他の例（具体的には示さず）では、バリア１５０１は、実質的に単層であり得る。バリア１５０１が、バリアのおおよそ中央まで延在し、次いでそれ自体の上に折り返される分子１５２２を実質的に含む更に他の実施例（具体的に図示せず）では、バリア１５０１は、実質的に二重層であり得る。具体的には示されていないが、ナノポアは、任意選択で、本明細書の他の箇所で説明されるものと同様の様式で、例えば、図１４Ａ～１４Ｂに示されるように、バリア１５０１についてのそのような選択肢のいずれかに挿入され得る。

【０１０５】

図１６は、図１４Ａ及び１４Ｂを参照して説明される例で使用され得る代替的なバリアを概略的に示す。図１６は、図１４Ａ及び１４Ｂを参照して説明されるように、バリア支持体１４００及び環状部１４１０を使用して懸架されるバリア１６０１を示す。この例では、バリア１６０１は、図２Ｃを参照して説明したようなＢＡＢトリブロックコポリマーの分子を含む。ここで、トリブロックコポリマーは、疎水性「Ｂ」セクション１６４１に結合され、その間にある親水性「Ａ」セクション１６４２を含む。この例では、バリア１６０１は、「Ｂ」セクション１６４１が互いに向かって配向された二層構造を有することができる。ＢＡＢ分子の疎水性末端は、一般に、バリア１６０１のおおよそ中央に位置し

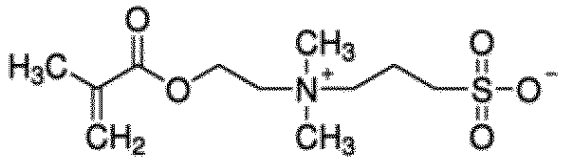
得、次いで、分子は、バリアのいずれかの外面に向かって延在し、次いで、それ自体の上に折り返される。したがって、両方の「Ｂ」セクションはバリアの中央に位置し、「Ａ」セクションはバリアの一方の側面又は他方の側面にある。具体的には示されていないナノポアは、任意選択で、例えば図１４Ａ及び図１４Ｂに示されるように、本明細書の他の箇所に記載されているものと同様の様式でバリア１６０１に挿入され得る。

【０１０６】

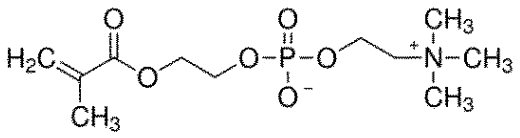
本発明のジブロック及びトリブロックコポリマーは、疎水性ブロックと親水性ブロックの任意の好適な組み合わせを含み得る。いくつかの例では、親水性Ａブロックは、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、親水性ポリペプチド、窒素含有単位、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含み得る。例示的に、ポリアクリルアミドは、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、及び荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択され得る。重合して双性イオンポリマーを形成することができる双性イオンモノマーの非限定的な例としては、以下が挙げられる。

【０１０７】

【化１】



及び

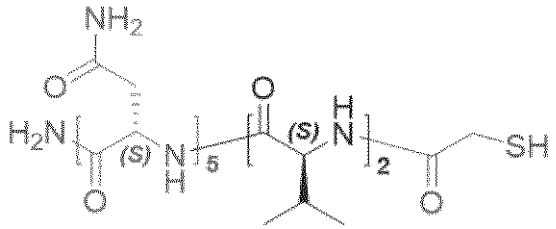


。

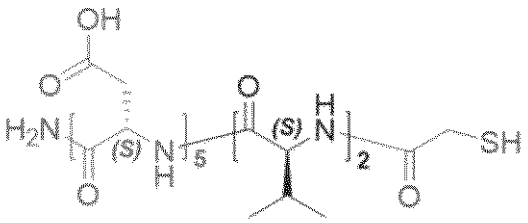
親水性ポリペプチドの非限定的な例としては、以下が挙げられる。

【０１０８】

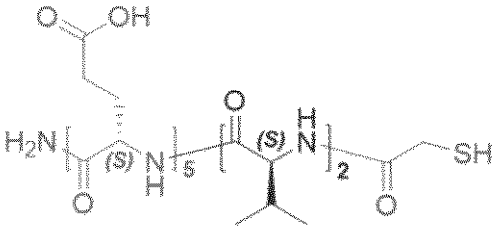
【化２】



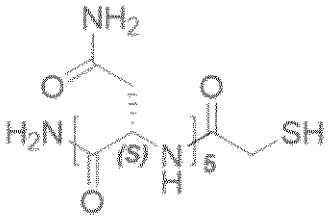
、



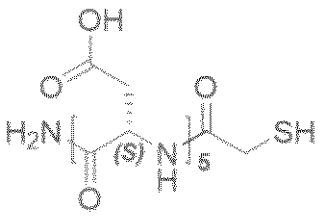
、



、



、及び

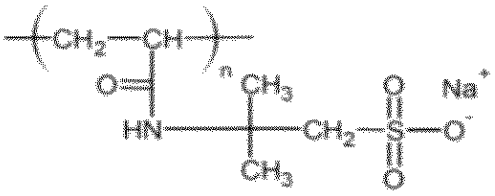


。

荷電ポリアクリルアミドの非限定的な例は、

【０１０９】

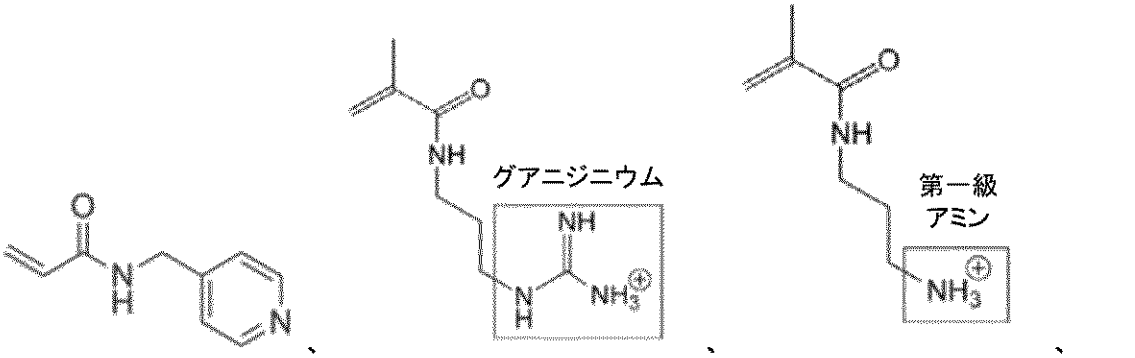
【化３】



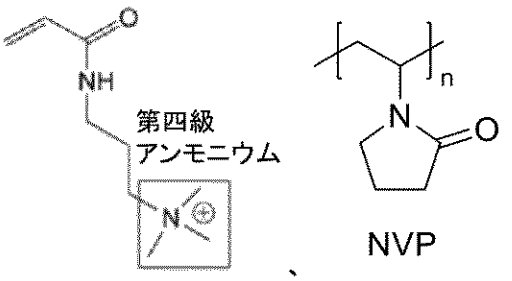
であり、式中、ｎは約２～約１００である。窒素含有単位の非限定的な例としては、

【０１１０】

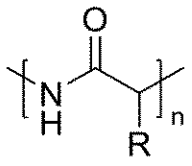
【化４】



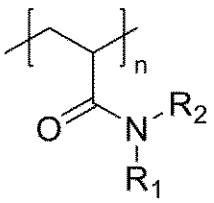
、



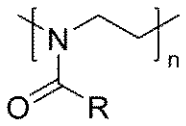
、



、



、及び



Oxa

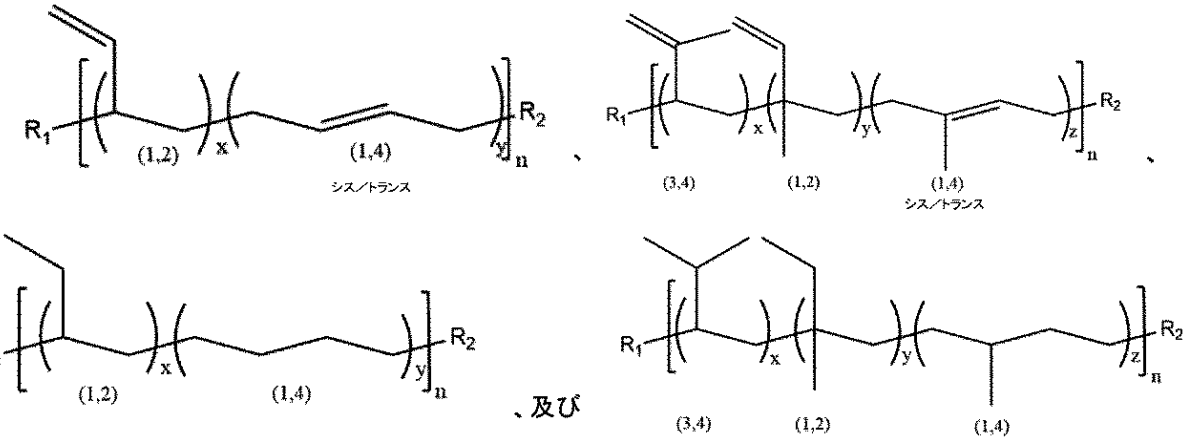
が挙げられる。

【０１１１】

いくつかの例では、疎水性Ｂブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含み得る。水素化ポリジエンの非限定的な例としては、飽和ポリブタジエン（ＰＢｕ）、飽和ポリイソプレン（ＰＩ）、飽和ポリ（ミルセン）が挙げられ、

【０１１２】

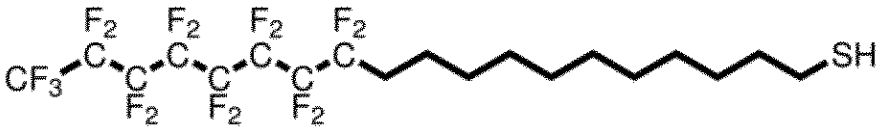
【化５】



式中、ｎは約２～約１００であり、ｘは約２～約１００であり、ｙは約２～約１００であり、ｚは約２～約１００であり、R_1は、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基であり、R_2は、マレイミド基、アリル基、プロパルギル基、ＢＣＮ基、カルボキシレート基、アミン基、チオール基、ＤＢＣＯ基、アジド基、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド基、ビオチン基、カルボキシル基、ＮＨＳ活性化エステル、及び他の活性化エステルからなる群から選択される反応性部分である。水素化ポリジエンの他の非限定的な例では、R_1は、マレイミド基、アリル基、プロパルギル基、ＢＣＮ基、カルボキシレート基、アミン基、チオール基、ＤＢＣＯ基、アジド基、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド基、ビオチン基、カルボキシル基、ＮＨＳ活性化エステル、及び他の活性化エステルからなる群から選択される反応性部分である。フッ素化ポリエチレンの非限定的な例は、

【０１１３】

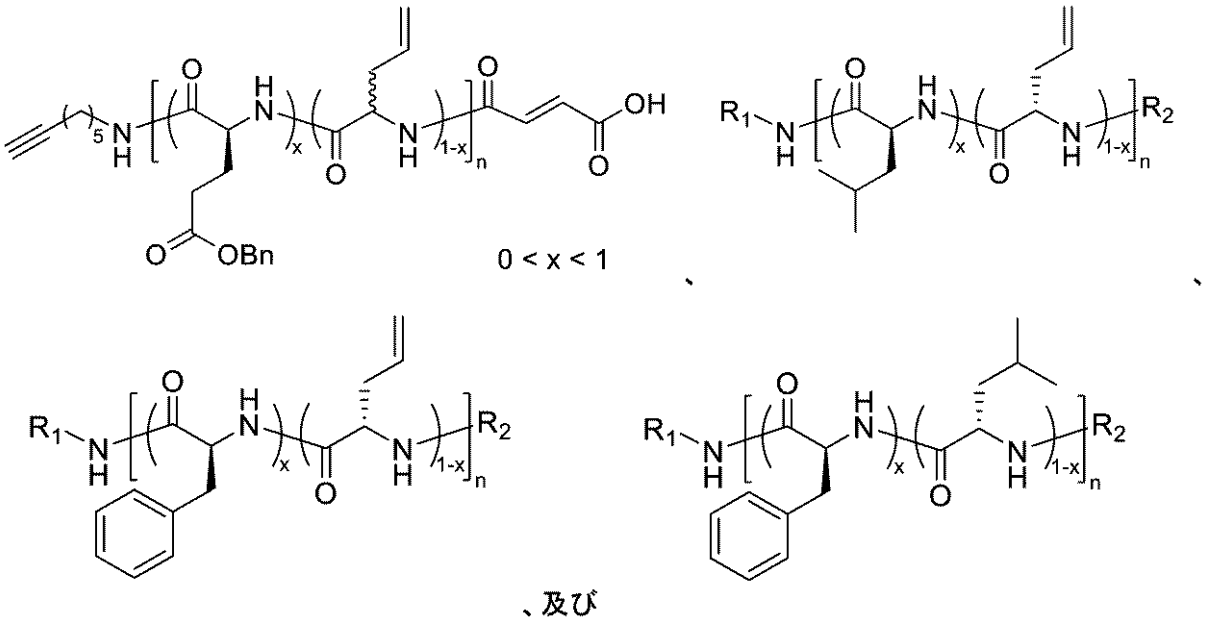
【化６】



である。疎水性ポリペプチドの非限定的な例としては、（０＜ｘ＜１）：

【０１１４】

【化７】



、及び

が挙げられ、式中、ｎは約２～約１００である。

【０１１５】

１つの非限定的な例では、ＡＢジブロックコポリマーは、ＰＤＭＳ－ｂ－ＰＥＯを含み、ここで「－ｂ－」は、ポリマーがブロックコポリマーであることを示す。別の非限定的な例では、ＡＢジブロックコポリマーは、ＰＢｄ－ｂ－ＰＥＯを含む。別の非限定的な例では、ＡＢジブロックコポリマーは、ＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯを含む。別の非限定的な例では、ＢＡＢトリブロックコポリマーは、ＰＤＭＳ－ｂ－ＰＥＯ－ｂ－ＰＤＭＳを含む。別の非限定的な例では、ＢＡＢトリブロックコポリマーは、ＰＢｄ－ｂ－ＰＥＯ－ｂ－ＰＢｄを含む。別の非限定的な例では、ＢＡＢトリブロックコポリマーは、ＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯ－ｂ－ＰＩＢを含む。別の非限定的な例では、ＡＢＡトリブロックコポリマーは、ＰＥＯ－ｂ－ＰＢｄ－ｂ－ＰＥＯを含む。別の非限定的な例では、ＡＢＡトリブロックコポリマーは、ＰＥＯ－ｂ－ＰＤＭＳ－ｂ－ＰＥＯを含む。別の非限定的な例では、ＡＢＡトリブロックコポリマーは、ＰＥＯ－ｂ－ＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯを含む。任意の好適な親水性ブロックが、任意の好適な疎水性ブロックと共に使用され得ることが理解されるであろう。追加的に、２つの親水性ブロックを含む例では、これらのブロックは、互いに同じポリマーを含み得るが、必ずしも含む必要はない。同様に、２つの疎水性ブロックを含む例では、これらのブロックは、互いに同じポリマーであってもよいが、必ずしも含む必要はない。

【０１１６】

疎水性ブロック及び親水性ブロックのそれぞれの分子量、ガラス転移温度、及び化学構造は、使用のための適切な安定性及びナノポアを挿入する能力を有するバリアを提供するように適切に選択され得る。例えば、疎水性ブロック及び親水性ブロックのそれぞれの分子量は、ブロック（したがって、バリアの層）のそれぞれの厚さに影響を及ぼし得、例えば、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、又は界面活性剤支援ポア挿入によって、安定性並びにナノポアを挿入する能力に影響を及ぼし得る。追加的に又は代替的に、親水性ブロック及び疎水性ブロックの分子量の比は、バリアの層へのこれらのブロックの自己集合に影響を及ぼし得る。追加的に又は代替的に、疎水性ブロック及び親水性ブロックのそれぞれのガラス転移温度（Ｔｇ）は、バリアの層の横方向流動性に影響を及ぼし得る。したがって、いくつかの例では、疎水性ブロック及び／又は親水性ブロックが、デバイスの動作温度未満、例えば、室温未満、いくつかの例では約０℃未満のＴｇを有することが有用であり得る。追加的に又は代替的に、疎水性ブロック及び親水性ブロックの化学構造は、鎖が層に詰め込まれる方法、及びそれらの層の安定性に影響を及ぼし得る。

【０１１７】

本発明のジブロック及びトリブロックコポリマーは、動作の任意の適切な組み合わせを使用して作製され得ることが理解されよう。図３Ａ～３Ｃは、図１のナノポア組成物及びデバイスにおいて使用するためのトリブロックコポリマーを調製するための例示的なスキームを概略的に示す。いくつかの例では、本発明のジブロック及びトリブロックコポリマーは、図３Ａに例示されるような「マクロ開始剤」アプローチを使用して作製され得、１つのポリマーブロックが最初に作製され、次いで、開始剤（図３Ａにおける Ｘ）として使用されて、モノマー（図３Ａにおける［Ｍ］）を使用して１つ以上の更なるブロックを成長させる。例示的に、ジブロックコポリマーを作製するための動作は、複数の親水性モノマーを重合して、親水性ポリマーを形成することと、親水性ポリマーの末端に開始剤を形成することと、開始剤を使用して複数の疎水性モノマーを重合させて、親水性ポリマーに結合された疎水性ポリマーを形成することと、を含み得る。代替的に、ジブロックコポリマーを作製するための動作は、複数の疎水性モノマーを重合して、疎水性ポリマーを形成することと、疎水性ポリマーの末端に開始剤を形成することと、開始剤を使用して複数の親水性モノマーを重合させて、疎水性ポリマーに結合された親水性ポリマーを形成することと、を含み得る。同様に、トリブロックＢＡＢコポリマーを作製するための動作は、複数の親水性モノマーを重合して、親水性ポリマーを形成することと、親水性ポリマーのそれぞれの末端に開始剤を形成することと、開始剤を使用して複数の疎水性モノマーを重合させて、親水性ポリマーの各末端に結合された疎水性ポリマーを形成することと、を含み得る。同様に、トリブロックＡＢＡコポリマーを作製するための動作は、複数の疎水性モノマーを重合して、疎水性ポリマーを形成することと、疎水性ポリマーのそれぞれの末端に開始剤を形成することと、開始剤を使用して複数の親水性モノマーを重合させて、疎水性ポリマーの各末端に結合された親水性ポリマーを形成することと、を含み得る。このような「マクロ開始剤」アプローチにおいて、開始剤（図３Ａにおける Ｘ）は、適切には、使用される特定のモノマー及び実施される特定のタイプの重合に基づいて選択され得る。例えば、原子移動フリーラジカル重合（ＡＴＲＰ）の場合、開始剤は臭素又は、塩素を含み得る。あるいは、例えば、可逆的付加開裂連鎖移動（ＲＡＦＴ）重合の場合、開始剤は、連鎖移動剤を含み得る。重合が完了した後、末端基（図３ＡのＸ）は、（例えば、図３Ａの末端基Ｙを提供するために）修飾又は除去され得る。

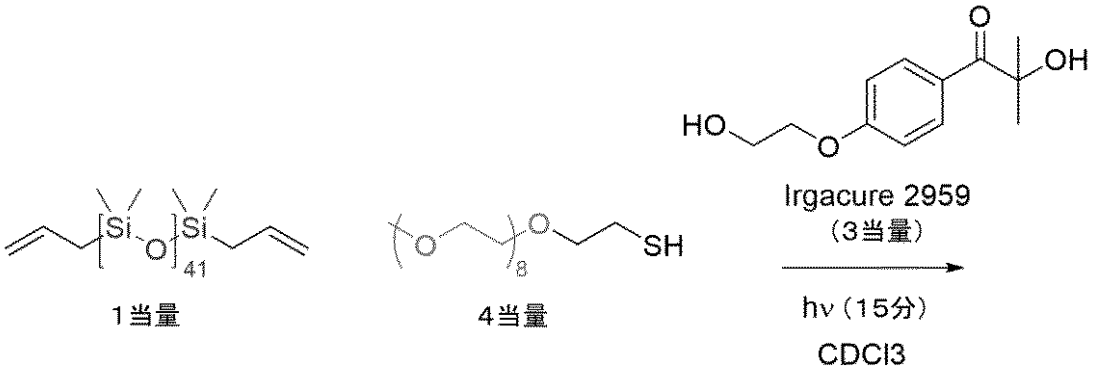
【０１１８】

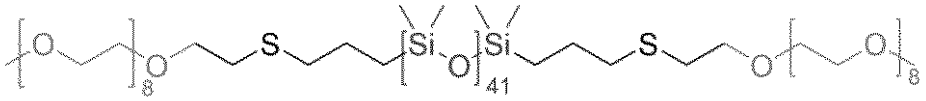
他の例では、本発明のジブロック及びトリブロックコポリマーは、ポリマーブロックが別々に作製され、次いで、反応性部分（図３Ｂ中のＸ及びＹ）を使用して一緒に結合される、図３Ｂに示されるような「結合」アプローチを使用して作製され得る。例示的に、ジブロックコポリマーを作製するための動作は、複数の親水性モノマーを重合して親水性ポリマーを形成することと、複数の疎水性モノマーを重合して疎水性ポリマーを形成することと、親水性ポリマーを疎水性ポリマーに結合することと、を含み得る。トリブロックコポリマーを作製するための動作は、複数の親水性モノマーを重合して、末端を有する親水性ポリマーを形成することと、複数の疎水性モノマーを重合して、第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーを形成することと、第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーを親水性ポリマーのそれぞれの末端に結合することと、を含み得る。代替的に、トリブロックコポリマーを作製するための動作は、複数の親水性モノマーを重合して、第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーを形成することと、複数の疎水性モノマーを重合して、末端を有する疎水性ポリマーを形成することと、第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーを疎水性ポリマーのそれぞれの末端に結合することとを含み得る。このような「結合」アプローチにおいて、疎水性ポリマーの末端は、第１の反応性部分（図３ＢにおけるＹ）を含み得、親水性ポリマーの末端は、第１の反応性部分と反応して、親水性ポリマーを疎水性ポリマーに結合する第２の反応性部分（図３ＢにおけるＸ）を含み得る。反応性部分（図３ＢにおけるＸ及びＹ）は、結合される特定のポリマー及び実施される結合のタイプに基づいて適切に選択され得る。例えば、「クリック」ケミストリー部分が使用され得る。例示的には、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方は、アジドを含み得、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方は、アルキンを含み得、又は

第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方は、チオールを含み得、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方は、アルケンを含み得、又は第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み得、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含み得る。又は、例えば、アミドリンカーが、形成され得る。例示的に、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方は、アミンを含み得、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方は、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を含み得る。図３Ｃは、非限定的な例を示し、ここで、疎水性ポリマーは、その末端の１つにアミン（NH_2）基を有するＰＤＭＳであり、親水性ポリマーは、その末端にＮＨＳを有するＰＥＯであり、アミン基及びＮＨＳ基は、トリイソプロピルアミンの存在下で互いに反応して、ＡＢＡトリブロックコポリマーを提供する。トリブロックコポリマーを形成する別の非限定的な例を以下に示す。この例では、ＰＤＭＳ－ビスアリルを、チオール－エンクリックケミストリーによってＰＥＧ－チオールと反応させる。反応を進行させるために、反応は、脱気溶媒（例えば、クロロホルム）を使用して不活性雰囲気下で、光開始剤（例えば、ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９）の存在下で、ＵＶ曝露下で５～３０分間行われる。

【０１１９】

【化８】





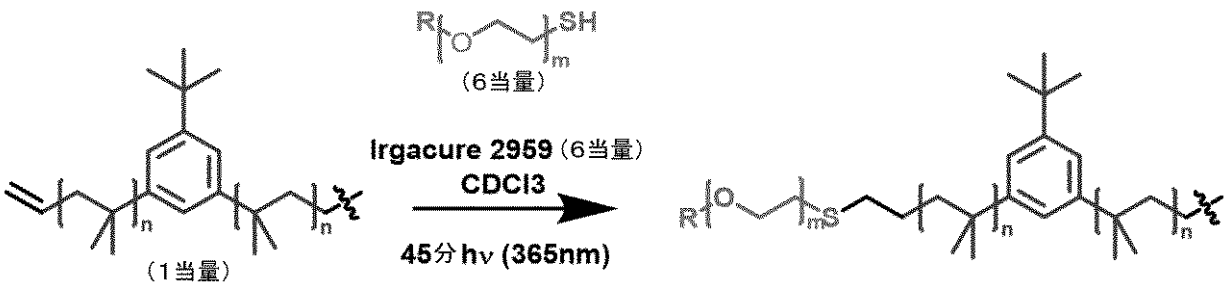
。

【０１２０】

トリブロックコポリマーを形成する別の非限定的な例を以下に示す。この例では、ＰＩＢ－ビスアリルをチオール－エンクリックケミストリーによってＰＥＧ－チオールと反応させる。反応を進行させるために、脱気溶媒（例えば、クロロホルム）を用い、光開始剤（例えば、ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９）の存在下、不活性雰囲気（乾燥アルゴン又は乾燥窒素）下で、５～６０分間ＵＶ曝露下で行われる。いくつかの例では、反応は、１ｍＷ／ｃｍ^2～１００ｍＷ／ｃｍ^{2}の範囲のＵＶ出力で２～１８０分間ＵＶ曝露下で行われる。いくつかの例では、使用されるＵＶ波長は、３６５ｎｍである。

【０１２１】

【化９】



【０１２２】

ナノポア配列決定用途では、膜流動性が有益であると考えることができる。いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、ブロックコポリマー膜の流動性は、疎水性「Ｂ」ブロックの物理的特性によって主に付与されると考えられる。より具体的には、「低Ｔｇ」疎水性ポリマー（例えば、約０℃未満のＴｇを有する）を含むＢブロックを使用して、「高Ｔｇ」ポリマー（例えば、室温より高いＴｇを有する）を含むＢブロックを有する膜よりも流動性の高い膜を生成し得る。例えば、特定の例では、コポリマーの疎水性Ｂブロックは、約２０℃未満、約０℃未満、又は約－２０℃未満のＴｇを有する。

【０１２３】

低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、例えば、図４、５、６、７、又は１７を参照して記載されるような様式で、ナノポア配列決定を実施するのに好適な条件下で膜柔軟性を維持するのを助けるために使用され得る。いくつかの例では、ナノポア配列決定における使用のために十分に低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、約－７５℃～約－２５℃の範囲のＴｇを有すると予想され得るＰＩＢを含み得るか、又は本質的にそれからなり得る。他の例では、ナノポア配列決定における使用のために十分に低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、約－１３５℃（又はそれより低い）～約－１１５℃の範囲のＴｇを有することが予想され得るＰＤＭＳを含み得るか、又は本質的にそれからなり得る。更に他の例では、ナノポア配列決定における使用のために十分に低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、ＰＢｄを含み得るか、又は本質的にＰＢｄからなり得る。異なる形態のＰＢｄが、本バリアにおけるＢブロックとして使用され得る。例えば、ＰＢｄのシス－１，４形態は、約－１０５℃～約－８５℃の範囲のＴｇを有することが予想され得る。あるいは、例えば、ＰＢｄのシス－１，２形態は、約－２５℃～約０℃の範囲のＴｇを有すると予想され得る。あるいは、例えば、ＰＢｄのトランス－１，４形態は、約－９５℃～約－５℃の範囲のＴｇを有すると予想され得る。更に他の例では、ナノポア配列決定における使用のために十分に低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、約－７５℃～約－４５℃の範囲のＴｇを有することが予想され得るポリミルセン（ＰＭｙｒ）を含み得るか、又は本質的にそれからなり得る。更に他の例では、ナノポア配列決定における使用のために十分に低いＴｇを有する疎水性Ｂブロックは、ポリイソプレン（ＰＩＰ）を含み得るか、又は本質的にそれからなり得る。異なる形態のＰＩＰが、本発明のバリアにおけるＢブロックとして使用され得る。例えば、ＰＩＰのシス－１，４形態は、約－８５℃～約－５５℃の範囲のＴｇを有することが予想され得る。あるいは、例えば、ＰＩＰのトランス－１，４形態は、約－７５℃～約－４５℃の範囲のＴｇを有すると予想され得る。

【０１２４】

完全に飽和した炭素骨格を有する疎水性Ｂブロック（例えば、ＰＩＢ）はまた、ブロックコポリマー膜の化学的安定性を高めることが予想され得る。追加的に又は代替的に、ＰＩＢなどの疎水性Ｂブロック内の分岐構造は、鎖の絡み合いを誘導することが予想され得、これは、ブロックコポリマー膜の安定性を高めることが予想され得る。これにより、より小さい疎水性ブロックの使用が可能になり、挿入されたナノポアに対する疎水性ミスマッチの不利益が改善される。追加的に又は代替的に、比較的低い極性を有する疎水性Ｂブロックは、より良好な電気絶縁体であり、したがって、ナノポア配列決定のためのデバイ

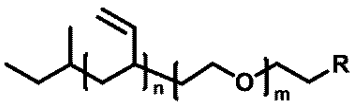
スの電気的性能を改善することが期待され得る（例えば、図４～７又は１７を参照して記載されるものなど）。

【０１２５】

ＢブロックとしてＰＢｄ及びＡブロックとしてＰＥＯを含む、以下に示されるＡＢコポリマーのいくつかの例では、Ｒは、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。ｍ＝約２～約１００であり、ｎ＝約２～約１００である。

【０１２６】

【化１０】



【０１２７】

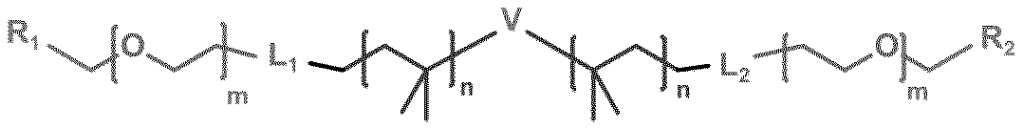
いくつかの非限定的な例では、Ｒ＝ＯＨであり、ｎ＝約８～約５０であり、ｍ＝約１～約２０である。いくつかの非限定的な例では、Ｒ＝ＯＨであり、ｎ＝約１０～約１５であり、ｍ＝約５～約１５である。

【０１２８】

Ｂブロックとして１つ以上のＰＩＢブロック及びＡブロックとしてＰＥＯを含む、以下に示されるＡＢＡコポリマーのいくつかの例では、R_1及びR_2は、独立して、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分である。Ｖは、イソブチレンがそこから伝播され得るビス官能性開始剤に対応する任意選択の基であり、ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、パラ位、メタ位、若しくはオルト位を介して疎水性ブロックに結合されたフェニル、ナフタレン、別の芳香族基、約２～約２０個の炭素を有するアルカン鎖、又は別の脂肪族基であり得、ｍ＝約２～約１００であり、ｎ＝約２～約１００である。Ｖは、任意選択で、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基によって隣接され得る。Ｖが存在しない場合、１つのＰＩＢブロックのみが存在し、ｎは約２～約１００である。L_1及びL_2は、独立して、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される少なくとも１つの部分を含み得るリンカーである。

【０１２９】

【化１１】



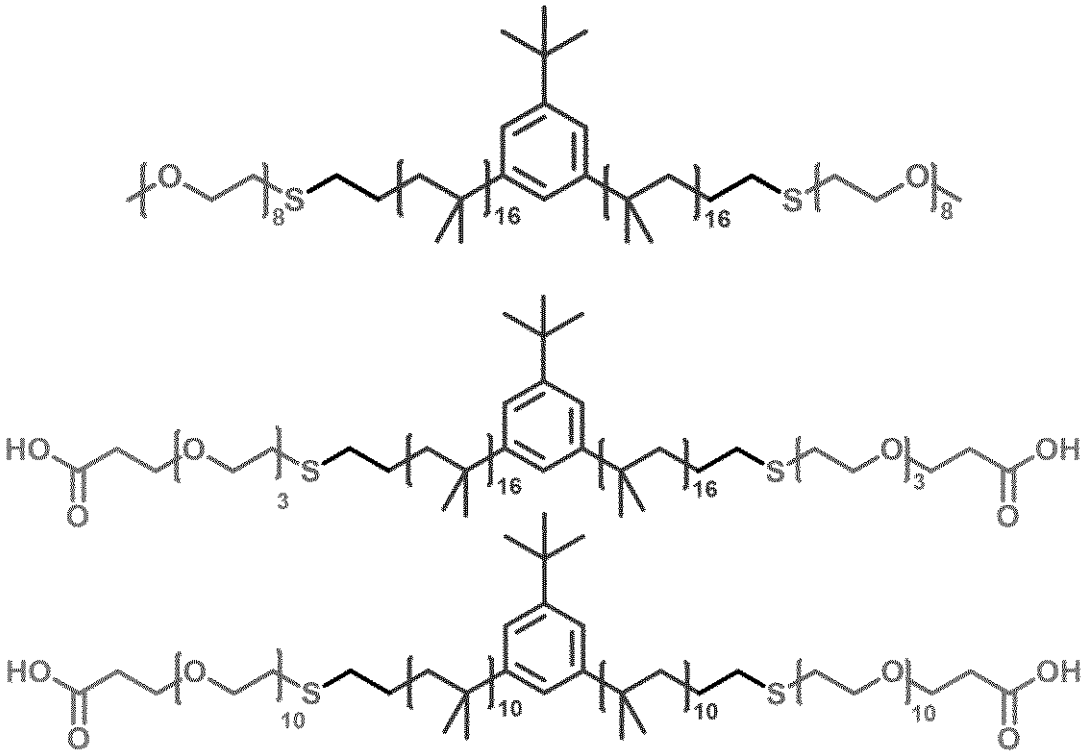
【０１３０】

上記構造のいくつかの非限定的な例では、ｎ＝約２～約５０、及びｍ＝約１～約５０、R_1＝R_2＝ＣＯＯＨ、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びL_1＝L_2＝エチルスルフィドである。他の非限定的な例では、ｎ＝約５～約２０、ｍ＝約２～約１５、R_1＝R_2＝ＣＯＯＨ、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びL_1＝L_2＝エチルスルフィドである。他の非限定的な例では、ｎ＝約１３～約１９、ｍ＝約２～約５、R_1＝R_2＝ＣＯＯＨ

、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びＬ$_1$＝Ｌ$_2$＝エチルスルフィドである。他の非限定的な例では、ｎ＝約７～約１３、ｍ＝約７～約１３、Ｒ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＯＯＨ、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びＬ$_1$＝Ｌ$_2$＝エチルスルフィドである。特に、１つの非限定的な例（その構造を以下に示す）では、ｎ＝１６、ｍ＝３、Ｒ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＯＯＨ、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びＬ$_1$＝Ｌ$_2$＝エチルスルフィドである。別の非限定的な例（その構造を以下に示す）では、ｎ＝１０、ｍ＝１０、及びＲ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＯＯＨ、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びＬ$_1$＝Ｌ$_2$＝エチルスルフィドである。別の非限定的な例（その構造を以下に示す）では、ｎ＝１６、ｍ＝８、Ｒ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＨ$_3$、Ｖ＝ｔｅｒｔ－ブチルベンゼン、及びＬ$_1$＝Ｌ$_2$＝エチルスルフィドである。

【０１３１】

【化１２】



【０１３２】

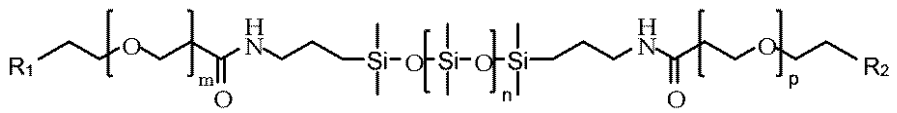
いくつかの例では、多官能性前駆体が供給され、更に上の例ではＶが対応する二官能性開始剤の合成への前駆体として使用され得る。例えば、多官能性前駆体は、５－ｔｅｒｔ－ブチルイソフタル酸（ＴＢＩＰＡ）であり得、これは、当技術分野で公知の反応を用いて１－（ｔｅｒｔ－ブチル）－３，５－ビス（２－メトキシプロパン－２－イル）ベンゼン（ＴＢＤＭＰＢ）に合成することができる。別の例では、ＴＢＩＰＡは、当該分野で公知の反応を使用して、１－ｔｅｒｔ－ブチル－３，５－ビス（２－クロロプロパン－２－イル）ベンゼンへと合成され得る。このような二官能性開始剤の使用は、開始剤の両側でのカチオン重合を可能にし、アリル－ＰＩＢ－アリルなどの二官能性ＰＩＢを生成し、次いでこれを親水性Ａブロックに結合させて、ＢブロックとしてＰＩＢを含むＡＢＡブロックコポリマーを生成することができる。ここで、二官能性開始剤は、第１のＰＩＢポリマー及び第２のＰＩＢポリマーの間に位置し得るが、第１のＰＩＢポリマー及び第２のＰＩＢポリマーと二官能性開始剤（Ｖ）とが一緒になって、例えば、ＡＢＡトリブロックコポリマーのＢブロックを形成すると考えられ得ることが理解されるべきである。

【０１３３】

別の非限定的な例では、ＡＢＡトリブロックコポリマーは

【０１３４】

【化１３】



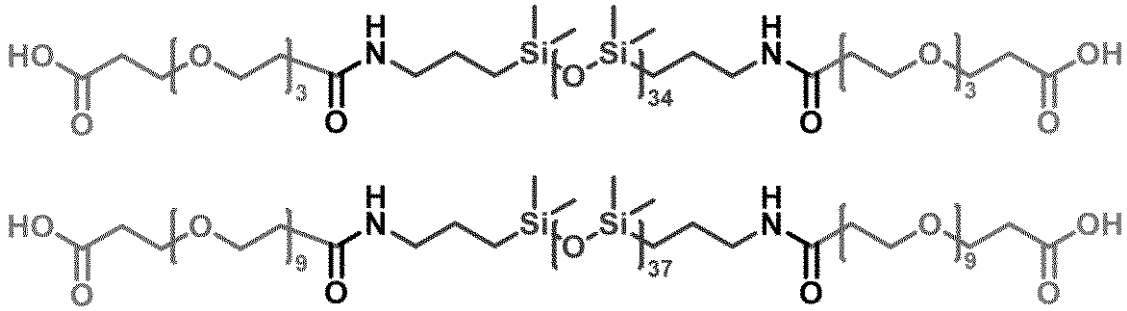
を含み、ｍ＝約２～約１００であり、ｎ＝約２～約１００であり、ｐ＝約２～約１００であり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、独立して、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。いくつかの非限定的な例では、ｍ＝約２～約３０であり、ｎ＝約２５～約４５であり、ｐ＝約２～約３０であり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、独立して、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。いくつかの非限定的な例では、ｍ＝約２～約１５であり、ｎ＝約３０～約４０であり、ｐ＝約２～約１５であり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、独立して、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。いくつかの非限定的な例では、ｍ＝約７～約１１であり、ｎ＝約３５～約４０であり、ｐ＝約７～約１１であり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、独立して、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。いくつかの非限定的な例では、ｍ＝約２～約５であり、ｎ＝約３０～約３７であり、ｐ＝約２～約５であり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$は、独立して、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される官能基である。

【０１３５】

特に、以下に示されるように、１つの非限定的な例では、ｍ＝３、ｎ＝３４、ｐ＝３、及びＲ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＯＯＨである。以下に示される別の非限定的な例では、ｍ＝９、ｎ＝３７、ｐ＝９、及びＲ$_1$＝Ｒ$_2$＝ＣＯＯＨである。

【０１３６】

【化１４】



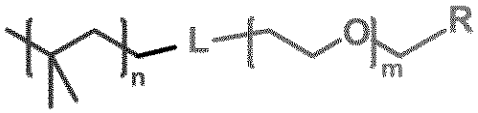
【０１３７】

ＢブロックとしてＰＩＢブロック及びＡブロックとしてＰＥＯを含む、以下に示されるＡＢコポリマーのいくつかの例では、Ｒは、カルボン酸、カルボキシル基、メチル基、ヒドロキシル基、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ビオチン、チオール、アジ

ド、プロパルギル基、アリル基、アクリレート基、双性イオン基、サルフェート、スルホネート、アルキル基、アリール基、直交官能基、及び水素からなる群から選択される部分であり、ｍ＝約２～約１００であり、ｎ＝約２～約１００であり、Ｌは、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、又はクリック反応の生成物からなる群から選択されるリンカーである。

【０１３８】

【化１５】

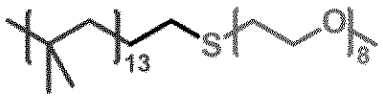


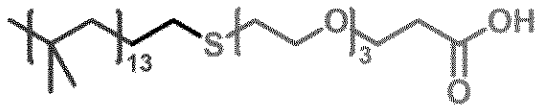
【０１３９】

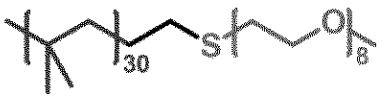
特に、以下に示すように、非限定的な一例では、ｎ＝１３、ｍ＝８であり、Ｒはメチルであり、Ｌは硫化エチルである。以下に示される別の非限定的な例では、ｎ＝１３、ｍ＝３、Ｒはカルボキシル基であり、Ｌは硫化エチルである。以下に示される別の非限定的な例では、ｎ＝３０、ｍ＝８、Ｒはメチルであり、Ｌは硫化エチルである。以下に示される別の非限定的な例では、ｎ＝３０、ｍ＝３、Ｒはカルボキシル基であり、Ｌは硫化エチルである。

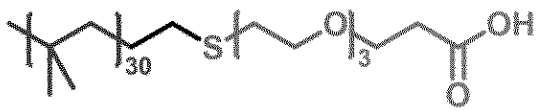
【０１４０】

【化１６】









【０１４１】

図１を参照して記載されるようなナノポアデバイスは、任意の適切なバリア（例えば、図２Ａ～２Ｃを参照して記載されるバリアが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して作製され得ることが理解されよう。追加的に、バリアは、限定されないが、図３Ａ～３Ｃを参照して記載されるものなどの任意の適切なコポリマーを使用して作製され得る。例えば、図１を参照して説明されるデバイス１００は、流体ウェル内にバリアを形成することと、バリア内にナノポアを挿入することと、を含む、動作を使用して作製され得る。バリアは、図１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び１６を参照して説明されるように、バリア支持体１４００を使用して懸架され得る。バリアを形成することは、当技術分野で知られている「塗装」を含み得る。バリア支持体によって懸架されたバリアを塗装するための既知の技術は、ブラシ塗装（手動）、機械塗装（例えば、撹拌棒を使用する）、及びバブル塗

装（例えば、デバイスを通る流れを使用する）を含む。ナノポアを懸架されたバリアに挿入するための公知の技術としては、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、及び界面活性剤支援ポア挿入が挙げられる。Ｎａｎｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．（Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）から入手可能なＯｒｂｉｔ　１６　ＴＣプラットフォームなどの、合成ポリマーを使用して懸架バリアを形成し、懸架バリアにナノポアを挿入するためのツールが市販されている。

【０１４２】

いくつかの例では、バリアは、バリアにわたって４５０ｍＶの電圧を受けたときに、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の残存率を有し得る。いくつかの例では、バリアは、１００ｍＶで９５ｐＡ以上、又は１００ｐＡ以上の開放ポア電流を有する。いくつかの例では、バリアは、５０ｍＶで３２ｐＡ以上、３４ｐＡ以上、又は３６ｐＡ以上の開放ポア電流を有する。いくつかの例では、バリアポアＲＭＳ雑音は、２．２ｐＡ以下、２．０ｐＡ以下、１．８ｐＡ以下、１．６ｐＡ以下、又は１．５ｐＡ以下である。いくつかの例では、バリアは、４０以上、５０以上、６０以上、又は７０以上の信号対雑音比を有する。いくつかの例では、バリアは、９０％以上又は９５％以上の膜塗装収率を有する。

【０１４３】

いくつかの例では、バリアは、約３００ｍＶ～約１１００ｍＶのポア挿入電圧を有する。いくつかの例では、バリアは、挿入後に８５％以上、９０％以上、又は９５％以上の単一ポアパーセンテージを有する。いくつかの例では、バリアは、９０％以上又は９５％以上の単一ポア残存率を有する。いくつかの例では、バリアは、２ｐＡ以下、１ｐＡ以下、又は０．５ｐＡ以下の単一ポア電流標準偏差を有する。

【０１４４】

いくつかの例では、－１００ｍＶで１００ｍｓの負電圧期間だけ間隔を空けた正電圧マイクロパルスの列からなる波形が、バリアに印加される。正電圧パルス列は、１０μｓの持続時間で合計２０個のパルスを有する。それらの間の間隔は、３０ｍｓの設定持続時間値及び＋５０ｍＶに保持された電圧を有する。第１のサイクル中、波形は５分間連続的に印加され得、パルスの大きさは＋７００ｍＶに維持される。更に適用されるサイクル（再びそれぞれ５分間適用される）において、パルス強度は、合計６サイクルにわたって、１００ｍＶ毎に＋７００ｍＶから＋１２００ｍＶに増加される。いくつかの例では、そのような波形下での膜残存率は、６０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上である。いくつかの例では、５０％の膜残存率における電圧は、１０００ｍＶ以上、又は１２００ｍＶ以上である。いくつかの例では、５０％膜及び単一ポア残存率での電圧は、９００ｍＶ以上、又は１０００ｍＶ以上である。

【０１４５】

本バリアは、任意の好適なデバイス又は用途において使用され得ることが更に理解されるであろう。例えば、図４は、図１の組成物及びデバイスの例示的使用の断面図を概略的に示す。図４に示されるデバイス１００は、流体ウェル１００’、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び／又は１６を参照して記載されるような構成を有し得るバリア１０１（すなわち、バリア１０１は、任意選択で、バリア支持体を使用して懸架され得、本明細書中に提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る）、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’、並びにナノポア１１０を、図１を参照して記載されるような様式で含むように構成され得る。図４に示される非限定的な例では、第２の流体１２０’は、任意選択で、複数の各々のヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４、例えば、それぞれ、Ｇ、Ｔ、Ａ、及びＣを含み得る。第２の流体１２０’中のヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４の各々は、任意選択で、伸長体（特に標識されていない伸長体）を介してヌクレオチドに結合されたそれぞれの標識１３１、１３２、１３３、１３４に結合され得る。任意選択で、デバイス１００は、ポリメラーゼ１０５を更に含み得る。図４に示すように、ポリメラーゼ１０５は、第２の流体１２０’の第２の組成物内にあり得る。任意選択で、ポリメラーゼ１０５は、例えば、好適な伸長体（具体的に図示せ

ず）を介して、ナノポア１１０又はバリア１０１に結合され得る。デバイス１００は、任意選択で、図４に示されるように、第１のポリヌクレオチド１４０及び第２のポリヌクレオチド１５０を更に含み得る。ポリメラーゼ１０５は、第２のポリヌクレオチド１５０の配列を使用して、第１のポリヌクレオチド１４０に複数のヌクレオチドを順次付加するためのものであってもよい。例えば、図４に示される特定の時点において、ポリメラーゼ１０５は、ヌクレオチド１２２（Ｔ）を第１のポリヌクレオチド１４０に組み込み、これは、第２のポリヌクレオチド１５０にハイブリダイズして二重鎖を形成する。他の時点では（具体的には示さず）、ポリメラーゼ１０５は、第２のポリヌクレオチド１５０の配列を使用して、ヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４のうちの他のものを第１のポリヌクレオチド１４０に順次組み込み得る。

【０１４６】

図４に示される回路１８０は、第２のポリヌクレオチド１５０の配列を使用して、ポリメラーゼが複数のヌクレオチドを第１のポリヌクレオチド１４０に順次追加することに応答して、開口部の電気的特性の変化を検出するように構成され得る。図４に示される非限定的な例では、ナノポア１１０は、ヘッド領域４１１と、テール領域４１２と、伸長体４１３と、レポーター領域４１４（例えば、脱塩基ヌクレオチド）と、部分４１５と、を含み得る永久テザー４１０に結合され得る。テザー４１０のヘッド領域４１１は、任意の好適な化学結合、タンパク質間相互作用、又は通常不可逆的である任意の他の好適な付着を介してナノポア１１０に結合される。ヘッド領域４１１は、開口部４１３内にレポーター領域４１４を配置し、ポリメラーゼ１０５によって作用されるヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４のそれぞれの標識１３１、１３２、１３３、１３４と相互作用するようにポリメラーゼ１０５に十分に近接して部分４１５を配置する、ナノポア１１０の任意の好適な部分に付着され得る。部分４１５は、それぞれ標識１３１、１３２、１３３、１３４と相互作用して、開口部１１３内でレポーター領域４１４を移動させ、それにより塩１６０が開口部１１３を通って移動する速度を変化させ得、それにより回路１８０によって検出されるように開口部１１３の導電率を検出可能に変化させ得る。ポリヌクレオチドを配列決定するためのナノポアに結合された永久テザーの使用に関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，７０８，６５５号を参照されたい。

【０１４７】

図５は、図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。図５に示されるように、デバイス１００は、流体ウェル１００’、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び／又は１６を参照して記載されるような構成を有し得るバリア１０１（すなわち、バリア１０１は、任意選択で、バリア支持体を使用して懸架され得、本明細書に提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る）、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’、ナノポア１１０、並びに第１のポリヌクレオチド１４０及び第２のポリヌクレオチド１５０を含み得、これらの全ては、図４を参照して記載されるように同様に構成され得る。しかし、図５に示される非限定的な例では、ヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４は、必ずしもそれぞれの標識に結合される必要はない。ポリメラーゼ１０５は、ナノポア１１０に結合され得、ヘッド領域５１１、テール領域５１２、伸長体５１３、及びレポーター領域５１４（例えば、脱塩基ヌクレオチド）を含み得る永久テザー５１０に結合され得る。テザー５１０のヘッド領域５１１は、任意の好適な化学結合、タンパク質間相互作用、又は通常不可逆的である任意の他の好適な付着を介してポリメラーゼ１０５に結合される。ヘッド領域５１１は、レポーター領域５１４を開口部１１３内に配置するポリメラーゼ１０５の任意の好適な部分に付着させることができる。ポリメラーゼ１０５がヌクレオチド１２１、１２２、１２３、１２４と相互作用すると、そのような相互作用は、ポリメラーゼ１０５に立体構造変化を受けさせ得る。このような立体構造変化は、開口部１１３内のレポーター領域５１４を移動させ得、それにより、塩１６０が開口部１１３を通って移動する速度を変化させ得、それにより、回路１８０によって検出されるような様式で開口部１１３の導電性を検出可能に変化させ得る。ポリヌクレ

オチドを配列決定するためのポリメラーゼに結合された永久テザーの使用に関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，７０８，６５５号を参照されたい。

【０１４８】

図６は、図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。図６に示されるように、デバイス１００は、流体ウェル１００’、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び／又は１６を参照して記載されるような構成を有し得るバリア１０１（すなわち、バリア１０１は、任意選択で、バリア支持体を使用して懸架され得、本明細書に提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る）、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’、並びにナノポア１１０を含み得、これらの全ては、図４を参照して記載されるように同様に構成され得る。しかしながら、図６に示される非限定的な例では、ポリヌクレオチド１５０は、印加された力、例えば、回路１８０が電極１０２と電極１０３との間に印加するバイアス電圧の下で、ナノポア１１０を通って移動する。ポリヌクレオチド１５０中の塩基がナノポア１１０を通過するとき、そのような塩基は、塩１６０が開口部１１３を通って移動する速度を変化させ得、それにより、回路１８０によって検出されるような様式で開口部１１３の導電性を検出可能に変化させ得る。ナノポアを通じて移動されるポリヌクレオチドを配列決定するためのナノポアの使用に関する更なる詳細については、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，７９５，７８２号を参照されたい。

【０１４９】

図７は、図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。図７に示されるように、デバイス１００は、流体ウェル１００’、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び／又は１６を参照して記載されるような構成を有し得るバリア１０１（すなわち、バリア１０１は、任意選択で、バリア支持体を使用して懸架され得、本明細書に提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る）、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’、並びにナノポア１１０を含み得、これらの全ては、図４を参照して記載されるように同様に構成され得る。図７に示される非限定的な例では、代替ポリマー７５０は、印加された力、例えば、回路１８０が電極１０２と電極１０３との間に印加するバイアス電圧の下で、ナノポア１１０を通って移動する。本明細書で使用される場合、「代替ポリマー」は、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの配列に対応する配列を有する標識の細長い鎖を意味することを意図したものである。図７に示す例では、代替ポリマー７５０は、リンカー７５２を介して互いに結合された標識７５１を含む。ＸＰＡＮＤＯＭＥＲ（商標）は、Ｒｏｃｈｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ，Ｉｎｃ．（Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ，ＣＡ）によって開発された特定のタイプの代替ポリマーである。ＸＰＡＮＤＯＭＥＲＳ（商標）は、Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｂｙ　ｅＸｐａｎｓｉｏｎ（商標）（ＳＢＸ（商標）、Ｒｏｃｈｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ　ＣＡ）を使用して調製され得る。ｅＸｐａｎｓｉｏｎ（商標）による配列決定において、操作されたポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチドの配列を使用して、リンカーを介して標識に結合された核酸塩基を含むｘＮＴＰを重合する。次に、重合したヌクレオチドが処理されて、標識の伸長鎖が生成され、これは、標識間に結合されたリンカーによって互いに分離され、標的ポリヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。例えば、ＸＰＡＮＤＯＭＥＲＳ（商標）、リンカー（テザー）、標識、操作されたポリメラーゼ、及びＳＢＸ（商標）のための方法の説明については、その各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９３９，２４９号、同第８，３２４，３６０号、同第８，３４９，５６５号、同第８，５８６，３０１号、同第８，５９２，１８２号、同第９，６７０，５２６号、同第９，７７１，６１４号、同第９，９２０，３８６号、同第１０，３０１，３４５号、同第１０，４５７，９７９号、同第１０，６７６，７８２号、同第１０，７４５，６８５号、同第１０，７７４，１０５号、及び同第１０，８５１，４０５号を参照されたい。

【０１５０】

図１７は、図１の組成物及びデバイスの別の例示的使用の断面図を概略的に示す。図１

７に示されるように、デバイス１００は、流体ウェル１００’、図２Ａ～２Ｃ、１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び／又は１６を参照して記載されるような構成を有し得るバリア１０１（すなわち、バリア１０１は、任意選択で、バリア支持体を使用して懸架され得、本明細書に提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る）、第１の流体１２０及び第２の流体１２０’、並びにナノポア１１０を含み得、これらの全ては、図４を参照して記載されるように同様に構成され得る。図１７に示される非限定的な例では、ポリヌクレオチド１４０とポリヌクレオチド１５０との間の二本鎖は、印加された力（例えば、回路１８０が電極１０２と電極１０３との間に印加するバイアス電圧）の下でナノポア１１０内に位置する。二本鎖部分における塩基（ここでは、二本鎖の末端における塩基対ＧＣ１２１、１２４）とポリヌクレオチド１５０の一本鎖部分における塩基（ここでは、塩基Ａ及びＴ１２３、１２２）との組み合わせは、塩１６０が開口部１１３を通って移動する速度を変化させ得、したがって、回路１８０によって検出されるように開口部１１３の導電性を検出可能に変化させ得る。ナノポアを通じて移動されるポリヌクレオチドを配列決定するためのナノポアの使用に関する更なる詳細については、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるＭａｎｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．の米国特許出願公開第２０２３／００９０８６７号を参照されたい。

【０１５１】

図１～７、１４Ａ～１４Ｂ、１５、１６、及び１７を参照して記載されるような組成物及びデバイスは、任意の適切な様式で調製され得ることが理解される。図８は、図１に示されているようなデバイスを形成するための動作のフローを示す。図８に示す方法８００は、第１の流体と第２の流体との間にバリアを形成することを含み、バリアは、開口部を画定するバリア支持体によって懸架され、バリアは、開口部にわたって懸架され、ブロックコポリマーの分子を含む１つ以上の層を含む（動作８１０）。バリアは、本明細書で提供される、又はそうでなければ当技術分野で知られている動作の任意の適切な組み合わせを使用して形成され得る。例えば、バリアを形成することは、当技術分野で知られている「塗装」を含み得る。バリア支持体によって懸架されたバリアを塗装するための既知の技術は、ブラシ塗装（手動）、機械塗装（例えば、撹拌棒を使用する）、及びバブル塗装（例えば、デバイスを通る流れを使用する）を含む。

【０１５２】

ブロックコポリマーの各分子は、おおよそ長さＡを有する１つ以上の親水性ブロックと、おおよそ長さＢを有する１つ以上の疎水性ブロックとを含み得る。１つ以上の親水性ブロックは、バリアの外面を形成し、疎水性ブロックは、バリア内に位置し得る。例えば、バリアは、本明細書で提供される任意のＡＢ、ＡＢＡ、又はＢＡＢコポリマーを含み得る。いくつかの例では、１つ以上の疎水性ブロックは、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含み得る。本明細書の他の場所で説明されるような理由で、そのようなポリマーは、例えば、図４～７及び１７を参照して説明されるようなナノポア配列決定動作における使用にとって特に有用な品質の懸架膜を生成することが予想され得る。

【０１５３】

方法８００はまた、任意選択で、ナノポアをバリアに挿入すること（動作８２０）を含む。ナノポアは、第１の流体と第２の流体との間の接触を提供し得る。ナノポアは、本明細書の他の箇所に記載されているような、又はさもなければ当技術分野で公知の動作を使用してバリアに挿入され得る。ナノポアを懸架されたバリアに挿入するための公知の技術としては、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、及び界面活性剤支援ポア挿入が挙げられる。Ｎａｎｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．（Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）から入手可能なＯｒｂｉｔ　１６　ＴＣプラットフォームなどの、合成ポリマーを使用して懸架バリアを形成し、懸架バリアにナノポアを挿入するためのツールが市販されている。ナノポアなしでバリアを使用することが望ましい場合、動作８２０

は、必ずしも動作８１０の後に実行される必要がないことが理解されよう。

【０１５４】

例示的に、ブロックコポリマーは、図２Ｂ及び１４Ａ～１４Ｂを参照して記載されるようなＡＢジブロックコポリマーである。したがって、バリアは、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有し得る。このようなジブロックコポリマーの非限定的な一例では、疎水性ブロックはポリブタジエン（ＰＢｄ）であり得る。代替的に、ブロックコポリマーは、２つの親水性ブロック及び１つの疎水性ブロックを有するＡＢＡトリブロックコポリマーであり得る。したがって、バリアは、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有し得る。このようなトリブロックコポリマーの１つの非限定的な例では、疎水性ブロックは、ポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）又はＰＤＭＳである。更に別の代替では、ブロックコポリマーは、２つの疎水性ブロック及び１つの親水性ブロックを有するＢＡＢトリブロックコポリマーである。したがって、バリアは、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有し得る。

【実施例】

【０１５５】

以下の実施例は、純粋に例示することを意図したものであり、特許請求の範囲に具体的に記載されていない限り、本発明を限定するものではない。

【０１５６】

実施例１．

ＰＤＭＳ－ｂ－ＰＥＯ－ｂ－ＰＤＭＳ及びＰＢｄ－ｂ－ＰＥＯの性能を、膜調製の容易さ、制御された単一対複数のナノポア挿入、及び浸透圧に対する安定性に関して評価した。

【０１５７】

全ての材料を、ＮａｎＩＯＮ製のＯｒｂｉｔ－１６機器で試験した。このツールは、チップキャビティの上部でのテフロン（登録商標）撹拌棒の回転による機械塗装、並びに膜／ポア構築物の電気的試験（膜容量測定、ナノポアＩ／Ｖ曲線）を可能にする。

【０１５８】

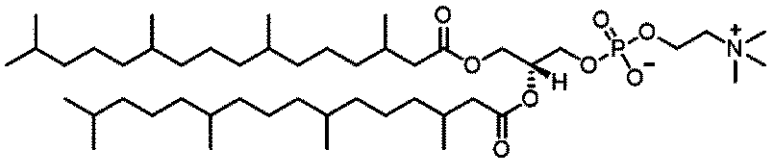
膜塗装及びナノポア挿入

脂質二重層を形成するために広く使用されるリン脂質１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈＰＣ）、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}（「Ｐ５」、Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｓｏｕｒｃｅ，Ｉｎｃ．（Ｑｕｅｂｅｃ，Ｃａｎａｄａ）から市販されている、Ｐ４１７１６ａ－ＢｄＥＯ）、及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$（「Ｐ２」、Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｓｏｕｒｃｅ，Ｉｎｃから市販されている、Ｐ９０９１－ＤＭＳＥＯＤＭＳ）をそれぞれ、図１４Ａ～１４Ｂ、１５、及び１６を参照して記載されるような円形開口部を含む支持体を使用する懸架膜形成（膜塗装とも呼ばれる）による試験の前に、オクタン（５ｍｇ／ｍＬ）で希釈した。これらの３つの材料は、類似の親水性比、並びにポア挿入を促進するための疎水性ブロックの比較的低いT_g、及び十分に低いM_wを有するので、比較のために選択した。より具体的には、ＰＤＭＳのT_gは、－１３０℃～－１２０℃の範囲である。ＰＢｄのT_gは約－９５℃であるが、異性体に応じて－１２℃まで上昇することがある。したがって、いくつかの例では、低いT_gは負の温度とみなされ得る。

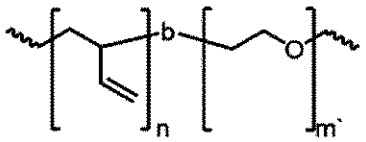
【０１５９】

【化１７】

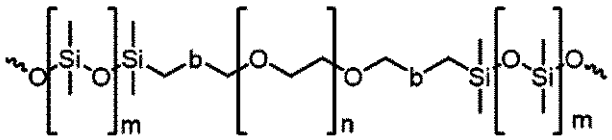
DPhPC



PBd-b-PEO



PDMS-b-PEO-PDMS



【０１６０】

塗装品質に関して、ＡＢ及びＢＡＢポリマーの両方は、安定な膜を形成するために、ＤＰｈＰＣよりも少ない材料しか必要とせず、キャビティの上部での撹拌棒の回転が少なかった。

【０１６１】

更に、３つの異なる化合物を使用して作製された膜の静電容量値及び雑音レベルを測定した。例えば、図９は、ＤＰｈＰＣ、PEO_{420}－ｂ－PBd_{700}（Ｐ５）及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{500}－ｂ－$PDMS_{500}$（Ｐ２）から形成された膜について測定された静電容量（プロット９１０）及び雑音（プロット９２０）を記載するプロット及び表を示す。プロット９１０から理解され得るように、ＤＰｈＰＣは、最も高い静電容量値（約２．５ｐＦ）を示し、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$は、より低い静電容量：それぞれ約２±０．７ｐＦ及び１．５を示す。プロット９２０から理解され得るように、膜雑音は、３つの材料について同様である。

【０１６２】

図１０は、ＤＰｈＰＣ、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}（Ｐ５）、及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$（Ｐ２）膜について、測定された電圧の関数として、残りの膜の正規化された数のプロットを示す。膜の初期数（１６）を使用して、異なる電圧で残っている膜の数を正規化した。平均膜数±ＳＴＤ（ｎ＝３）。所与の電圧で残っている膜の正規化された数は、破壊電圧に対する膜抵抗に対応する。この試験では、膜にかかる電圧を徐々に増加させて、膜が破壊し始める電圧を特定する。図１０から理解され得るように、ＡＢ及びＢＡＢポリマー材料の両方から作製された膜は、ＤＰｈＰＣ膜と比較してはるかに高い電圧で破壊し、それらの安定性がより高いことを強調する。

【０１６３】

ＤＰｈＰＣ並びにＡＢ及びＢＡＢポリマー材料を使用して形成された膜の間の別の差異は、単一のナノポアをその膜に挿入することがいかに困難であったかである。図４～７を

参照して記載されるようなナノポア配列決定のために、各膜に単一のナノポアを挿入することが有用である。しかしながら、単一ナノポア挿入は、ＤＰｈＰＣを用いて達成することが比較的困難であることが判明し、これは、単一ナノポアを有する膜と複数のナノポアを有する膜との混合をもたらした。一方、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$は、単一ナノポア挿入に対して有意に改善された制御を提供することが見出された。

【０１６４】

ナノポア特性に関して、ＭｓｐＡナノポアは、ＤＰｈＰＣ膜よりもＡＢ又はＢＡＢポリマー膜において捕捉された場合に、わずかに低い電流レベルを有することが観察された。これは、ポリマー膜のより高い抵抗によって推進されると考えられる。例えば、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$膜中のＭｓｐＡナノポアは、ＤＰｈＰＣ膜中のＭｓｐＡナノポアよりも約２５％高い抵抗（低いコンダクタンス）を有することが観察された。ＭｓｐＡナノポア雑音レベルは、ＤＰｈＰＣと$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$との間で同等であるが、PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}膜に挿入された場合にわずかに高いことが観察された。

【０１６５】

ＡＢポリマー膜の安定性を評価するために、ＡＣ下の１ＭのＫＣｌ＋５０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液中のＭｓｐＡナノポア／PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}膜構築物の安定性を評価した。図１１は、１ＭのＫＣｌ＋５０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液中でのＭｓｐＡナノポア／PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}膜構築物安定性のプロットを示す。図１１に示されるように、このナノポア／膜アセンブリは、１６時間にわたって安定なままであり得る。比較すると、同様の条件下でＤＰｈＰＣ膜に挿入されたＭｓｐＡは、約１時間残存することが観察された。経時的に記録された電流の増加は、システムが開放セルであるため、緩衝液の蒸発に起因した。

【０１６６】

浸透圧下での膜及び膜／ポア構築物の安定性

いくつかの構成では、塩不平衡設定は、図４及び５を参照して説明されるように、ナノポア配列決定中の性能を改善し得る。例えば、流体１２０’（シス側とも呼ばれる）中のより低い塩濃度は、ポリメラーゼ活性を維持するのに役立ち得、流体１２０（トランス側とも呼ばれる）中のより高い塩濃度は、電流レベルを増加させるのに役立ち得る。平衡塩条件の非限定的な例では、流体１２０’及び１２０は両方とも、１５０ｍＭのＫＣｌ及び５０ｍＭのＨＥＰＥＳを含む。不平衡塩条件の非限定的な例では、流体１２０’（シス）は、５０ｍＭのＫＣｌ、５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、及び０．１ｍＭのトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を含む。流体１２０（トランス）は、３００ｍＭのＫＣｌ及び５０ｍＭのＨＥＰＥＳを含む。図１を参照して記載されるような様式で、塩濃度のこのような不均衡は、浸透圧１９１を生成し得る。PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}（Ｐ５）及び$PDMS_{500}$－ｂ－PEO_{420}－ｂ－$PDMS_{500}$（Ｐ２）膜の両方が、５００ｍＭ／１０００ｍＭの塩条件に耐えることが観察された。PEO_{500}－ｂ－PBd_{700}（Ｐ５）もまた、２５０ｍＭ／１０００ｍＭの不平衡塩条件で残存することが観察された。このことから、本発明のジブロック膜及びトリブロック膜は、浸透圧下で使用され得ることが理解され得る。

【０１６７】

実施例２．

異なるコポリマーの性能を、膜調製の容易さ、制御された単一対複数のナノポア挿入、及び浸透圧に対する安定性に関して評価した。

【０１６８】

全ての材料を、ＮａｎＩＯＮ製のＯｒｂｉｔ－１６機器で試験した。このツールは、チップキャビティの上部でのテフロン（登録商標）撹拌棒の回転による機械塗装、並びに膜／ポア構築物の電気的試験（膜容量測定、ナノポアＩ／Ｖ曲線）を可能にする。

【０１６９】

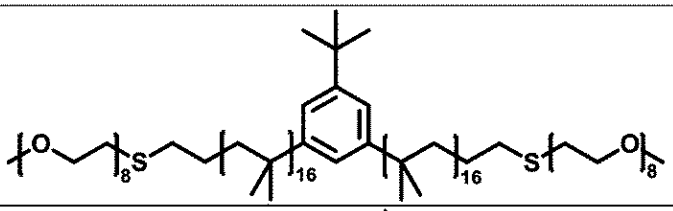
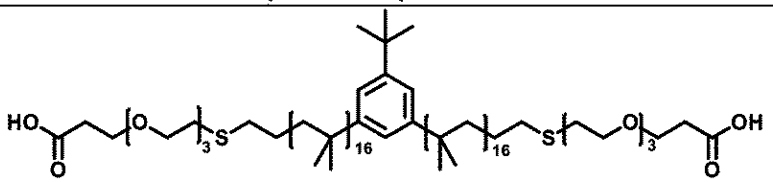
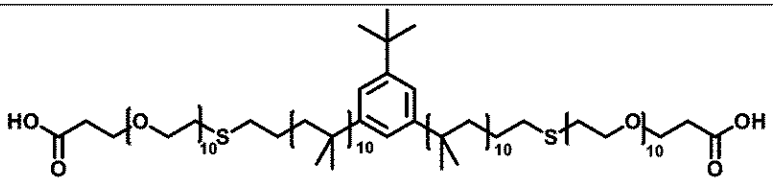
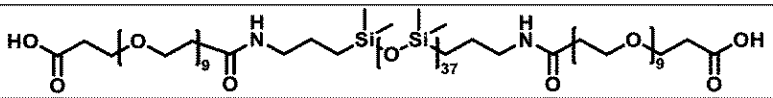
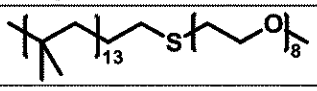
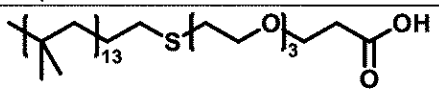
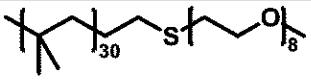
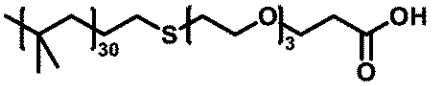
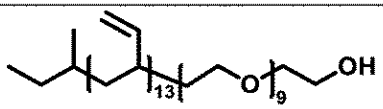
膜塗装及びナノポア挿入

下記表１にそれぞれ列挙されるコポリマーを、図１４Ａ、１４Ｂ、１５、及び１６を参照して説明されるものなどの円形開口部を含む支持体を使用して、懸架膜形成（膜塗装とも称される）による試験前に、５ｍｇ／ｍＬの濃度でオクタン：ブタノール（９５：５体積）溶媒混合物に溶解した。

【０１７０】

【表１】

表１

ポリマー	末端基	標識	構造
PEO－b－PIB－b－PEO	－CH_3	ABA1	
PEO－b－PIB－b－PEO	－COOH	ABA2	
PEO－b－PIB－b－PEO	－COOH	ABA3	
PEO－b－PDMS－b－PEO	－COOH	ABA4	
PEO－b－PIB	－CH_3	AB1	
PEO－b－PIB	－CH_3（PIB上）及び－COOH（PEO上）	AB2	
PEO－b－PIB	－CH_3（PIB及びPEOの両方上）	AB3	
PEO－b－PIB	－CH_3（PIB上）及び－COOH（PEO上）	AB4	
PEO－b－PBD	－CH_3（PBD上）及び－OH（PEO上）	P5	

【０１７１】

特徴付け試験を使用して、そのような膜のナノポア感知用途に関連すると考えられる測定基準を抽出した。これらの測定基準は、安定性（例えば、加速試験、配列決定条件を含むストレス試験に対する膜／膜－ポア系の弾性）、スループット（例えば、膜塗装収率、ポア挿入及び保持収率）及び品質（例えば、膜－ポア電流及び雑音レベル及び一貫性、ＳＮＲ、膜の電気絶縁性／漏出性）などのカテゴリに分類される。

【０１７２】

実施された第１の特徴付け試験は、膜形成における成功率（膜塗装収率）、破壊電圧に

対する膜抵抗、生物学的ポア挿入（ＭｓｐＡポア）、ブロックコポリマー膜内部のポアの結果として生じる電流及び雑音に焦点を当てた。これらは、ＰＩＢ－ＰＥＯ系膜の性能を互いに、及び他のポリマーを用いて形成された膜に対して評価するのに役立った。

【０１７３】

塗装品質に関して、全てのＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯブロックコポリマー（ＡＢ１、ＡＢ２、ＡＢ３、ＡＢ４）及びＰＥＯ－ｂ－ＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯブロックコポリマー（ＡＢＡ１、ＡＢＡ２、ＡＢＡ３）を塗装して、懸濁膜を形成することができた。特に満足のいく性能は、ＡＢＡ構造を有するＰＥＯ－ｂ－ＰＩＢ－ｂ－ＰＥＯブロックコポリマーによって達成された。例えば、図１２は、Ｐ５、ＡＢＡ１、ＡＢ１、ＡＢ２、ＡＢ３、ＡＢ４、及びＡＢＡ２を使用して形成された膜について測定された破壊電圧を記載するプロットを示す。Ｐ５を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から３００ｍＶの約０．９５までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．９から５００ｍＶでの約０．２２まで減少したことが分かり得る。ＡＢＡ１を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から５００ｍＶでの約０．９５までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．９から３００ｍＶでの約０．５まで減少したことが分かり得る。ＡＢＡ２を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から５００ｍＶでの約０．９５までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．９から３００ｍＶでの約０．５まで減少したことが分かり得る。

【０１７４】

ＡＢ１を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から３００ｍＶでの約０．１６までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．１６から５００ｍＶでの約０．０４まで減少したことが分かり得る。ＡＢ２を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から３００ｍＶでの約０．７５までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．４５から５００ｍＶでの約０．０１まで減少したことが分かり得る。ＡＢ３を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままである膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から３００ｍＶでの約０．９までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．８５から５００ｍＶでの約０．０３５まで減少したことが分かり得る。ＡＢ４を用いて形成された膜については、図１２において、約３００ｍＶ以下の電圧では、実質的に無傷のままであった膜の正規化数は、０Ｖでの約１．０から３００ｍＶでの約０．９７までの範囲であり、約３５０ｍＶ以上の電圧では、膜の正規化数は、３５０ｍＶでの約０．９から５００ｍＶでの約０．６５まで減少したことが分かり得る。

【０１７５】

図１２に示すプロットから理解し得るように、ＡＢＡ型ブロックコポリマーＡＢＡ１及びＡＢＡ２、並びにＡＢ４型ブロックコポリマーは、破壊電圧ストレス試験に対して特に高い耐性を示した。

【０１７６】

膜間の別の違いは、単一のナノポアをその膜に挿入することがいかに困難であったかである。図４～７及び１７を参照して記載されるようなナノポア配列決定のために、各膜に単一のナノポアを挿入することが有用である。

【０１７７】

図１３は、１Ｍ　ＫＣｌ＋５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液中でのＭｓｐＡナノポア／膜構築物安定性のプロットを示す。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＰ５を使用して形成された

膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約９２ｐＡ～約９７ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢＡ１を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約８９ｐＡ～約１０４ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢＡ２を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約８７ｐＡ～約１１０ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢ１を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約１０４ｐＡ～約１３５ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢ２を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約１００ｐＡ～約１０５ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢ３を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約９４ｐＡ～約１０７ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。ＭｓｐＡナノポアが挿入されたＡＢ４を使用して形成された膜については、図１３において、１００ｍＶの電圧で、膜－ポア構築物が約９６ｐＡ～約１１０ｐＡの範囲の電流を有したことが分かり得る。

【０１７８】

ＡＢＡ２及びＡＢＡ３膜は、特に良好な性能を有するものとして同定された。ＡＢＡ２において示される顕著な改善は、膜弾性の増強である。ＡＢＡ３において示される顕著な改善は、より低い変動性での、膜への単一ＭｓｐＡナノポアの挿入及び保持の増強である。膜の様々な特性を以下の表２に示す。

【０１７９】

【表２】

表２

カテゴリ	特性	ABA4	ABA2	ABA3
膜品質	450mVでの膜残存率（%）	95%	100%	100%
MspAナノポア電流	開放ポア電流（50umウェル、100mV）（pA）	104pA	103pA	104pA
	膜ポア（MP）RMS雑音（pA）	－2．13pA	－1．46pA	－1．62pA
	ポア＋膜SNR	49	71	64
収率	膜塗装収率（形成された膜の数を、膜を形成する試みの数で割ったもの）（%）	＞95%	＞95%	＞95%
	ポア挿入電圧（mV）	500～850mV	800～1000mV	350～450mV
	単一ポア（SP）パーセンテージ（挿入工程後）（%）	＞95%	～90%	＞95%
	洗浄（3×250uL）下でのSP残存率（%）	＞95%	＞95%	＞95%
MspAナノポア電流＋一貫性	開放ポア電流（400mM KCl、50mV、50umウェル）（pA）	36．18pA	35．02pA	36．04pA
	SP電流標準偏差（1exp以内）（±pA）	－1．93pA	0．8pA	0．4pA
生化学に対する復元力	1200mVでの700～1200mV／10μs膜残存率（%）	約65%	約95%	約95%
	700～1200mV／10μs－50%膜生存率（mV）での電圧	＞1200mV	＞1200mV	＞1200mV
	700～1200mV／10μs－50%膜及び単一ポア残存率（mV）	1000mV	1000mV	900mV

【０１８０】

膜品質は、バリアをわたる４５０ｍＶの電流での膜残存率によって測定した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３は共に１００％の残存率を有し、ＡＢＡ４はおおよそ９５％の残存率を有した。

【０１８１】
ＭｓｐＡナノポアが挿入されたときの膜を通る電流も測定した。開放ポア電流は、１００ｍＶのバリアをわたる電圧で測定された。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３は、それぞれ１０３ｐＡ及び１０４ｐＡの同様の電流を有し、ＡＢＡ４は１０４ｐＡの電流を有した。ＭｓｐＡナノポアを膜に挿入した後、バリアを通る電流雑音の二乗平均平方根（ＲＭＳ）平均も同様に測定した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３は、それぞれ１．４６ｐＡ及び１．６２ｐＡの同様のＲＭＳ電流雑音平均を有し、ＡＢＡ４は２．１３ｐＡのＲＮＳ電流雑音を有した。バリアを通る電流の信号対雑音比（ＳＮＲ）も同様に測定した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３はそれぞれ７１及び６４のＳＮＲを有し、ＡＢＡ４は４９のＳＮＲを有した。

【０１８２】
様々な収率パーセンテージも測定した。ＡＢＡ２、ＡＢＡ３、及びＡＢＡ４は全て、９５％を超える膜塗装収率を有した。ＭｓｐＡナノポアを膜に挿入するのに必要な電圧も同様に測定した。ＡＢＡ２は約８００ｍＶ～約１０００ｍＶの電圧を必要とする一方、ＡＢＡ３は約３５０ｍＶ～４５０ｍＶの電圧を必要とし、ＡＢＡ４は約５００ｍＶ～約８５０ｍＶの電圧を必要とした。ナノポア挿入工程を実施した後、ＭｓｐＡナノポアを含有する膜のパーセンテージは、ＡＢＡ２について約９０％、ＡＢＡ３について９５％超、及びＡＢＡ４について９５％超であった。洗浄に耐えた単一孔膜のパーセンテージも同様に測定した。具体的には、膜を２５０μＬの流体で３回洗浄した後、残存率を判定した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３の両方は、ＡＢＡ４と同様に、９５％を超える残存率を有した。

【０１８３】
膜内のＭｓｐＡナノポアの開放ポア電流拡散の緊密さも測定した。具体的には、電流を４００ｍＭのＫＣｌで測定し、５０ｍＶの電流を膜に印加した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３は、それぞれ３５．０２ｐＡ及び３６．０４ｐＡの開放ポア電流を有し、ＡＢＡ４は、３６．１８ｐＡの開放ポア電流を有した。電流の標準偏差を、同様に測定した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３の標準偏差はそれぞれ、０．８ｐＡ及び０．４ｐＡであり、ＡＢＡ４の標準偏差は、１．９３ｐＡであった。バリアの弾性も測定した。膜残存率は、－１００ｍＶで１００ｍｓ間の負電圧期間によって間隔を置かれた正電圧マイクロパルスの列からなる波形にバリアを供した後に測定した。正電圧パルス列は、１０μｓの持続時間で合計２０パルスを有していた。それらの間の間隔は、３０ｍｓの設定持続時間値及び＋５０ｍＶに保持された電圧を有した。第１のサイクル中、波形は５分間連続的に印加され、パルスの大きさは＋７００ｍＶに維持された。更に適用されるサイクル（再びそれぞれ５分間適用される）において、パルス強度は、合計６サイクルにわたって、１００ｍＶ毎に＋７００ｍＶから＋１２００ｍＶに増加された。ＡＢＡ２及びＡＢＡ３の両方は、記載された波形の適用後、約９５％の残存率を有したが、ＡＢＡ４は約６５％の残存率を有した。同じ実験／試験において、波形にさらされた後に膜の５０％が残存した電圧が判定された。ＡＢＡ２、ＡＢＡ３、及びＡＢ４について、電圧は１２００ｍＶより大きいと判定された。別の試験／実験では、同じ波形サイクル／試験を繰り返したが、単一のＭｓｐＡポアを挿入した後の膜を使用した。ＡＢＡ２及びＡＢＡ４については、電圧は約１０００ｍＶであると判定されたが、ＡＢＡ３については、電圧は約９００ｍＶであると判定された。

【０１８４】
ナノポア配列決定用途のためのポリマー膜における使用のための適合性を評価するために選択された異なる測定基準に基づいて、これらの結果は、疎水性Ｂブロックとしてポリイソブチレンを含む膜の性能が、そのような用途における使用に特に適していることを実証する。例えば、異なる測定基準は、疎水性Ｂブロックとしてポリイソブチレンを使用するＡＢＡ及びＡＢコポリマー、特に末端基として－ＣＯＯＨを含むものが、比較的高い膜形成収率、比較的高いポア挿入及び保持収率、配列決定条件下での比較的高い安定性、並びに高い読み取り品質のための比較的良好な電気的特性を含む、ナノポア配列決定用途に有用な特性を有する膜を形成することができることを示す。本発明者らは、そのような特性は、フローセル製造の容易さ、機器全体、機器／チップ信頼性、及び高い読み取り精度と相関する可能性があり、これは、例えば、図４～７及び１７を参照して記載されるようなナノポア配列決定デ

バイスの商業的製造及び使用にとって重要であり得ると考える。

【０１８５】

本主題の特定の態様は、以下の条項で表現される。本発明は、特許請求の範囲に明示的に記載されていない限り、そのような条項に限定されるものではない。

条項１．第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、

ジブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層であって、

ジブロックコポリマーの各分子が、親水性ブロックに結合された疎水性ブロックを含む、第１の層と、

ジブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層と、を含み、

第１の複数の分子の親水性ブロックが、バリアの第１の外面を形成し、

第２の複数の分子の親水性ブロックが、バリアの第２の外面を形成し、

第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性ブロックが、バリア内で互いに接触している、バリア。

条項２．親水性ブロックが、おおよそ長さＡであり、疎水性ブロックが、おおよそ長さＢであり、第１の層及び第２の層がそれぞれ、おおよそＡ＋Ｂの厚さを有し、バリアが、おおよそ２Ａ＋２Ｂの厚さを有する、条項１に記載のバリア。

条項３．長さＡが、約２反復単位～約１００反復単位である、条項２に記載のバリア。

条項４．長さＡが、約５反復単位～約１５反復単位である、条項２又は条項３に記載のバリア。

条項５．長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、条項２～４のいずれか１つに記載のバリア。

条項６．長さＢが、約２反復単位～約５０反復単位である、条項２～５のいずれか１つに記載のバリア。

条項７．長さＢが、約１０反復単位～約１５反復単位である、条項２～６のいずれか１つに記載のバリア。

条項８．親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１～７のいずれか一項に記載のバリア。

条項９．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項８に記載のバリア。

条項１０．疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１～９のいずれか１つに記載のバリア。

条項１１．分子のそれぞれが、疎水性ブロックを親水性ブロックに結合するリンカーを更に含む、条項１～１０のいずれか一項に記載のバリア。

条項１２．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される少なくとも１つの部分を含む、条項１１に記載のバリア。

条項１３．デバイスであって、

第１の流体及び第２の流体を保持する流体ウェルと、

流体ウェル内の第１の流体と第２の流体との間に配置された、条項１～１２のいずれか１つに記載のバリアと、

バリア内に配置され、第１の流体を第２の流体に流体結合する開口部を提供するナノポアと、を備える、デバイス。

条項１４．第１の流体が、第１の組成を有し、第２の流体が、第１の組成とは異なる第２の組成を有する、条項１３に記載のデバイス。

条項１５．第１の流体が、第１の濃度の塩を有し、第２の流体が、第１の濃度とは異なる第２の濃度の塩を有する、条項１４に記載のデバイス。

条項１６．条項１３～１５のいずれか一項に記載のデバイスを作製する方法であって、
流体ウェル内にバリアを形成することと、
ナノポアをバリア内に挿入することと、を含む、方法。
条項１７．バリアを形成することが、塗装を含む、条項１６に記載の方法。
条項１８．塗装が、ブラシ塗装、機械塗装、及びバブル塗装からなる群から選択される技法を含む、条項１７に記載の方法。
条項１９．ナノポアを挿入することが、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、及び界面活性剤支援ポア挿入からなる群から選択される技法を含む、条項１６～１８のいずれか１つに記載の方法。
条項２０．ジブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の親水性モノマーを重合して、親水性ポリマーを形成することと、
親水性ポリマーの末端に開始剤を形成することと、
開始剤を使用して複数の疎水性モノマーを重合させて、親水性ポリマーに結合された疎水性ポリマーを形成することと、を含む、方法。
条項２１．ジブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の疎水性モノマーを重合して、疎水性ポリマーを形成することと、
疎水性ポリマーの末端に開始剤を形成することと、
開始剤を使用して複数の親水性モノマーを重合させて、疎水性ポリマーに結合された親水性ポリマーを形成することと、を含む、方法。
条項２２．開始剤が、臭素、ヨウ素、又は塩素を含む、条項２０又は条項２１に記載の方法。
条項２３．開始剤が、連鎖移動剤を含む、条項２０又は条項２１に記載の方法。
条項２４．連鎖移動剤が、Ｓ－１－ドデシル－Ｓ’－（α，α’－ジメチル－α’’－酢酸）トリチオカーボネート（ＤＤＭＡＴ）を含む、条項２３に記載の方法。
条項２５．親水性ポリマーが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、項２０～２４のいずれか１つに記載の方法。
条項２６．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項２５に記載の方法。
条項２７．疎水性ポリマーが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項２０～２６のいずれか１つに記載の方法。
条項２８．疎水性ポリマーが、リンカーを介して親水性ポリマーに結合されている、条項２０～２７のいずれか１つに記載の方法。
条項２９．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項２８に記載の方法。
条項３０．ジブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の親水性モノマーを重合して、親水性ポリマーを形成することと、
複数の疎水性モノマーを重合して、疎水性ポリマーを形成することと、
親水性ポリマーを疎水性ポリマーに結合することと、を含む、方法。
条項３１．親水性ポリマーの末端が、第１の反応性部分を含み、疎水性ポリマーの末端が、第１の反応性部分と反応して、親水性ポリマーを疎水性ポリマーに結合する、第２の反応性部分を含む、条項３０に記載の方法。
条項３２．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アジドを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項３１に記載の方法。
条項３３．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルケンを含む、条項３１に記載の方法。

条項３４．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項３１に記載の方法。
条項３５．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アミンを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを含む、条項３１に記載の方法。
条項３６．親水性ポリマーが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項３０～３５のいずれか１つに記載の方法。
条項３７．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項３６に記載の方法。
条項３８．疎水性ポリマーが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、項３０～３７のいずれか１つに記載の方法。
条項３９．疎水性ポリマーが、リンカーを介して親水性ポリマーに結合されている、条項３０～３８のいずれか１項に記載の方法。
条項４０．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項３９に記載の方法。
条項４１．第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、
トリブロックコポリマーの第１の複数の分子を含む第１の層であって、
トリブロックコポリマーの各分子が、第１の疎水性ブロック及び第２の疎水性ブロックと、第１の疎水性ブロックと第２の疎水性ブロックとの間に配置された親水性ブロックと、を含む、第１の層と、
トリブロックコポリマーの第２の複数の分子を含む第２の層と、を備え、
第１の複数の分子の親水性ブロックが、バリアの第１の外面を形成し、
第２の複数の分子の親水性ブロックが、バリアの第２の外面を形成し、
第１の複数の分子及び第２の複数の分子の疎水性ブロックが、バリア内で互いに接触している、バリア。
条項４２．親水性ブロックが、おおよそ長さＡであり、各疎水性ブロックが、おおよそ長さＢであり、第１の層及び第２の層がそれぞれ、おおよそＡ／２＋Ｂの厚さを有し、バリアが、おおよそＡ＋２Ｂの厚さを有する、条項４１に記載のバリア。
条項４３．長さＡが約２反復単位～約１００反復単位である、条項４２に記載のバリア。
条項４４．長さＡが、約２反復単位～約５０反復単位である、条項４２又は条項４３に記載のバリア。
条項４５．長さＡが、約５反復単位～約２０反復単位である、条項４２～４４のいずれか１つに記載のバリア。
条項４６．長さＡが、約１３反復単位～約１９反復単位である、条項４２～４５のいずれか１つに記載のバリア。
条項４７．長さＡが、約７反復単位～約１３反復単位である、条項４２～４５のいずれか１つに記載のバリア。
条項４８．長さＡが約２反復単位～約３０反復単位である、条項４２又は条項４３に記載のバリア。
条項４９．長さＡが、約２反復単位～約１５反復単位である、条項４２～４３又は条項４８のいずれか１つに記載のバリア。
条項５０．長さＡが、約７反復単位～約１１反復単位である、条項４２～４３又は条項４８～４９のいずれか一項に記載のバリア。
条項５１．長さＡが、約２反復単位～約５反復単位である、条項４２～４３又は条項４

８～４９のいずれか１つに記載のバリア。
条項５２．長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、条項４２～５１のいずれか１つに記載のバリア。
条項５３．長さＢが、約２反復単位～約５０反復単位である、条項４２～５２のいずれか１つに記載のバリア。
条項５４．長さＢが、約２反復単位～約１５反復単位である、条項４２～５３のいずれか１つに記載のバリア。
条項５５．長さＢが、約２反復単位～約５反復単位である、条項４２～５４のいずれか１つに記載のバリア。
条項５６．長さＢが、約７反復単位～約１３反復単位である、条項４２～５４のいずれか１つに記載のバリア。
条項５７．長さＢが、約２５反復単位～約４５反復単位である、条項４２～５２のいずれか１つに記載のバリア。
条項５８．長さＢが、約３０反復単位～約４０反復単位である、条項４２～５２又は条項５７のいずれか１つに記載のバリア。
条項５９．長さＢが、約３５反復単位～約４０反復単位である、条項４２～５２又は条項５７～５８のいずれか１つに記載のバリア。
条項６０．長さＢが、約３０反復単位～約３７反復単位である、条項４２～５２又は条項５７～５８のいずれか１つに記載のバリア。
条項６１．親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項４１～６０のいずれか１つに記載のバリア。
条項６２．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項６１に記載のバリア。
条項６３．疎水性ブロックがそれぞれ、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項４１～６２のいずれか１つに記載のバリア。
条項６４．第１の複数の分子及び第２の複数の分子の各分子が、各疎水性ブロックを親水性ブロックに結合するリンカーを更に含む、条項４１～６３のいずれか１つに記載のバリア。
条項６５．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項６４に記載のバリア。
条項６６．デバイスであって、
第１の流体及び第２の流体を保持する流体ウェルと、
流体ウェル内の第１の流体と第２の流体との間に配置された、条項４１～６５のいずれか１つに記載のバリアと、
バリア内に配置され、第１の流体を第２の流体に流体結合する開口部を提供するナノポアと、を備える、デバイス。
条項６７．第１の流体が、第１の組成を有し、第２の流体が、第１の組成とは異なる第２の組成を有する、条項６６に記載のデバイス。
条項６８．第１の流体が、第１の濃度の塩を有し、第２の流体が、第１の濃度とは異なる第２の濃度の塩を有する、条項６７に記載のデバイス。
条項６９．条項６６～６８のいずれか１つに記載のデバイスを作製する方法であって、
流体ウェル内にバリアを形成することと、
ナノポアをバリア内に挿入することと、を含む、方法。
条項７０．バリアが、塗装を含む、条項６９に記載の方法。

条項７１．塗装が、ブラシ塗装、機械塗装、及びバブル塗装からなる群から選択される技法を含む、条項７０に記載の方法。
条項７２．ナノポアを挿入することが、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、及び界面活性剤支援ポア選択からなる群から選択される技法を含む、条項６９～７１のいずれか１つに記載の方法。
条項７３．トリブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の親水性モノマーを重合して、親水性ポリマーを形成することと、
親水性ポリマーのそれぞれの末端に開始剤を形成することと、
開始剤を使用して複数の疎水性モノマーを重合させて、親水性ポリマーの各末端に結合された疎水性ポリマーを形成することと、を含む、方法。
条項７４．開始剤がそれぞれ、臭素、ヨウ素、又は塩素を含む、条項７３に記載の方法。
条項７５．開始剤がそれぞれ、連鎖移動剤を含む、条項７３又は条項７４に記載の方法。
条項７６．連鎖移動剤が、Ｓ－１－ドデシル－Ｓ’－（α，α’－ジメチル－α’’－酢酸）トリチオカーボネート（ＤＤＭＡＴ）を含む、条項７５に記載の方法。
条項７７．親水性ポリマーが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項７３～７６のいずれか１つに記載の方法。
条項７８．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項７７に記載の方法。
条項７９．疎水性ポリマーがそれぞれ、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項７３～７８のいずれか１つに記載の方法。
条項８０．疎水性ポリマーがそれぞれ、リンカーを介して親水性ポリマーに結合されている、条項７３～７９のいずれか１つに記載の方法。
条項８１．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項８０に記載の方法。
条項８２．トリブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の親水性モノマーを重合して、末端を有する親水性ポリマーを形成することと、
複数の疎水性モノマーを重合して、第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーを形成することと、
第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーを親水性ポリマーのそれぞれの末端に結合することと、を含む、方法。
条項８３．第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーのそれぞれの末端が、第１の反応性部分を含み、親水性ポリマーの各末端が、第１の反応性部分と反応して、第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーを親水性ポリマーに結合させる第２の反応性部分を含む、条項８２に記載の方法。
条項８４．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アジドを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項８３に記載の方法。
条項８５．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルケンを含む、条項８３に記載の方法。
条項８６．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項８３に記載の方法。
条項８７．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アミンを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを含む、条項８

３に記載の方法。
条項８８．親水性ポリマーが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項８２～８７のいずれか１項に記載の方法。
条項８９．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項８８に記載の方法。
条項９０．第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーがそれぞれ、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項８２～８９のいずれか１つに記載の方法。
条項９１．第１の疎水性ポリマー及び第２の疎水性ポリマーがそれぞれ、リンカーを介して親水性ポリマーに結合されている、条項８２～９０のいずれか１つに記載の方法。
条項９２．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項９１に記載の方法。
条項９３．第１の流体と第２の流体との間のバリアであって、
トリブロックコポリマーの複数の分子を含む層を備え、
トリブロックコポリマーの各分子は、第１の親水性ブロック及び第２の親水性ブロックと、第１の親水性ブロックと第２の親水性ブロックとの間に配置された疎水性ブロックと、を含み、
第１の複数の分子の第１の親水性ブロックが、バリアの第１の外面を形成し、
第２の複数の分子の第２の親水性ブロックが、バリアの第２の外面を形成し、
複数の分子の疎水性ブロックが、バリア内で互いに接触している、バリア。
条項９４．各親水性ブロックが、おおよそ長さＡであり、疎水性ブロックが、おおよそ長さＢであり、層が、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有し、バリアが、おおよそ２Ａ＋Ｂの厚さを有する、条項９３に記載のバリア。
条項９５．長さＡが、約２反復単位～約１００反復単位である、条項９４に記載のバリア。
条項９６．長さＡが、約２反復単位～約５０反復単位である、条項９４又は条項９５に記載のバリア。
条項９７．長さＡが、約５反復単位～約２０反復単位である、条項９４～９６のいずれか１つに記載のバリア。
条項９８．長さＡが、約１３反復単位～約１９反復単位である、条項９４～９７のいずれか１つに記載のバリア。
条項９９．長さＡが、約７反復単位～約１３反復単位である、条項９４～９７のいずれか１つに記載のバリア。
条項１００．長さＡが、約２反復単位～約３０反復単位である、第９４項又は第９５項に記載のバリア。
条項１０１．長さＡが、約２反復単位～約１５反復単位である、条項９４～９５又は条項１００のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０２．長さＡが、約７反復単位～約１１反復単位である、条項９４～９５又は条項１００～１０１のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０３．長さＡが、約２反復単位～約５反復単位である、条項９４～９５又は条項１００～１０１のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０４．長さＢが、約２反復単位～約１００反復単位である、条項９４～１０３のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０５．長さＢが、約２反復単位～約５０反復単位である、条項９４～１０４のいずれか１つに記載のバリア。

条項１０６．長さＢが、約２反復単位～約１５反復単位である、条項９４～１０５のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０７．長さＢが、約２反復単位～約５反復単位である、条項９４～１０６のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０８．長さＢが、約７反復単位～約１３反復単位である、条項９４～１０６のいずれか１つに記載のバリア。
条項１０９．長さＢが、約２５反復単位～約４５反復単位である、条項９４～１０４のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１０．長さＢが、約３０反復単位～約４０反復単位である、条項９４～１０４又は条項１０９のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１１．長さＢが、約３５反復単位～約４０反復単位である、条項９４～１０４又は条項１０９～１１０のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１２．長さＢが、約３０反復単位～約３７反復単位である、条項９４～１０４又は条項１０９～１１０のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１３．各親水性ブロックが、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項９３～１１２のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１４．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項１１３に記載のバリア。
条項１１５．疎水性ブロックが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項９３～１１４のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１６．複数の分子の各分子が、疎水性ブロックを親水性ブロックのそれぞれに結合させるリンカーを更に含む、条項９３～１１５のいずれか１つに記載のバリア。
条項１１７．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項１１６に記載のバリア。
条項１１８．デバイスであって、
第１の流体及び第２の流体を保持する流体ウェルと、
流体ウェル内の第１の流体と第２の流体との間に配置された、条項９３～１１７のいずれか１つに記載のバリアと、
バリア内に配置され、第１の流体を第２の流体に流体結合する開口部を提供するナノポアと、を備える、デバイス。
条項１１９．第１の流体が、第１の組成を有し、第２の流体が、第１の組成とは異なる第２の組成を有する、条項１１８に記載のデバイス。
条項１２０．第１の流体が、第１の濃度の塩を有し、第２の流体が、第１の濃度とは異なる第２の濃度の塩を有する、条項１１９に記載のデバイス。
条項１２１．条項１１８に記載のデバイスを作製する方法であって、
流体ウェル内にバリアを形成することと、
ナノポアをバリア内に挿入することと、を含む、方法。
条項１２２．バリアを形成することが、塗装を含む、条項１２１に記載の方法。
条項１２３．塗装が、ブラシ塗装、機械塗装、及びバブル塗装からなる群から選択される技法を含む、条項１２２に記載の方法。
条項１２４．ナノポアを挿入することが、エレクトロポレーション、ピペットポンプサイクル、及び界面活性剤支援ポア選択からなる群から選択される技法を含む、条項１２１～１２３のいずれか１つに記載の方法。
条項１２５．トリブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の疎水性モノマーを重合して、疎水性ポリマーを形成することと、

疎水性ポリマーのそれぞれの末端に開始剤を形成することと、
開始剤を使用して複数の疎水性モノマーを重合させて、親水性ポリマーの各末端に結合された疎水性ポリマーを形成することと、を含む、方法。
条項１２６．開始剤がそれぞれ、臭素、ヨウ素、又は塩素を含む、条項１２５に記載の方法。
条項１２７．開始剤がそれぞれ、連鎖移動剤を含む、条項１２５又は条項１２６に記載の方法。
条項１２８．連鎖移動剤が、Ｓ－１－ドデシル－Ｓ’－（α，α’－ジメチル－α’’－酢酸）トリチオカーボネート（ＤＤＭＡＴ）を含む、条項１２７に記載の方法。
条項１２９．親水性ポリマーがそれぞれ、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１２５～１２８のいずれか１つに記載の方法。
条項１３０．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項１２９に記載の方法。
条項１３１．疎水性ポリマーが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）（ＰＩＢ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１２５～１３０のいずれか１つに記載の方法。
条項１３２．疎水性ポリマーが、リンカーを介して親水性ポリマーに結合されている、条項１２５～１３１のいずれか１つに記載の方法。
条項１３３．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、条項１３２に記載の方法。
条項１３４．トリブロックコポリマーを作製する方法であって、
複数の疎水性モノマーを重合して、末端を有する疎水性ポリマーを形成することと、
複数の親水性モノマーを重合して、第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーを形成することと、
第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーを疎水性ポリマーのそれぞれの末端に結合することと、を含む、方法。
条項１３５．第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーのそれぞれの末端が、第１の反応性部分を含み、疎水性ポリマーの各末端が、第１の反応性部分と反応して、第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーを疎水性ポリマーに結合する第２の反応性部分を含む、条項１３４に記載の方法。
条項１３６．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アジドを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項１３５に記載の方法。
条項１３７．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルケンを含む、条項１３５に記載の方法。
条項１３８．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、チオールを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、アルキンを含む、条項１３５に記載の方法。
条項１３９．第１の反応性部分及び第２の反応性部分の一方が、アミンを含み、第１の反応性部分及び第２の反応性部分の他方が、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを含む、条項１３５に記載の方法。
条項１４０．第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーがそれぞれ、Ｎ－ビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、双性イオンポリマー、ポリペプチド、及びポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１３４～１３９のいずれか１つに記載の方法。
条項１４１．ポリアクリルアミドが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮ

ＩＰＡＭ）、荷電ポリアクリルアミド、及びリン酸官能化ポリアクリルアミドからなる群から選択される、条項１４０に記載の方法。

条項１４２．疎水性ポリマーが、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、ポリブタジエン（ＰＢｄ）、ポリイソプレン、ポリミルセン、ポリクロロプレン、水素化ポリジエン、フッ素化ポリエチレン、ポリペプチド、及びポリ（イソブチレン）からなる群から選択されるポリマーを含む、条項１３４～１４１のいずれか１つに記載の方法。

条項１４３．第１の親水性ポリマー及び第２の親水性ポリマーが、リンカーを介して疎水性ポリマーに結合されている、条項１３４～項１４２のいずれか１つに記載の方法。

条項１４４．リンカーが、アミド、チオエーテル（スルフィド）、コハク酸基、マレイン酸基、メチレン、エーテル、及びクリック反応の生成物からなる群から選択される、項１４３に記載の方法。

【０１８６】

更なるコメント

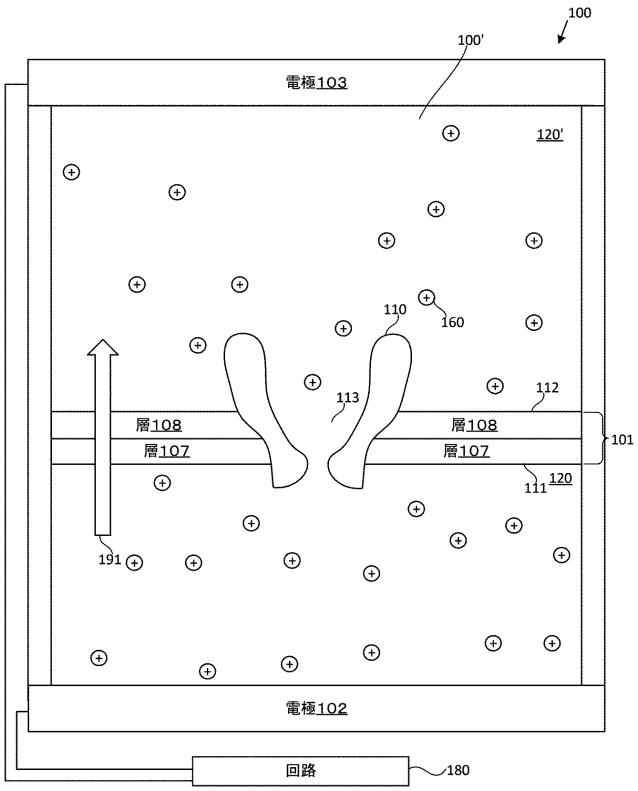
様々な例示的な例が上に記載されているが、様々な変更及び改変が、本発明から逸脱することなく、本明細書において行われ得ることは、当業者に明白であろう。添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲内に収まる、このような変更及び改変の全てを包含することが意図される。

【０１８７】

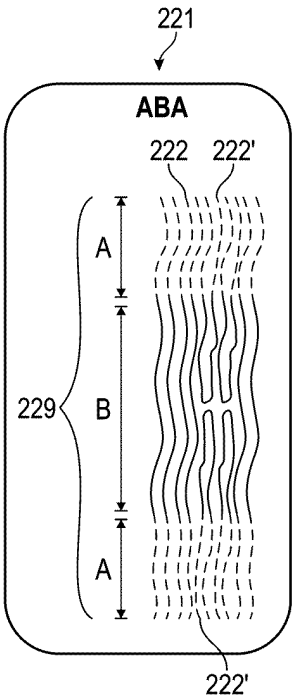
本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意のそれぞれの特徴／例は、任意の適切な組み合わせで一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか１つ以上からの任意の特徴／例は、任意の適切な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。

【図面】

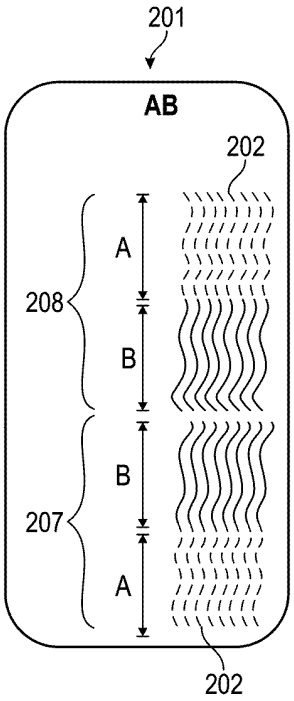
【図１】



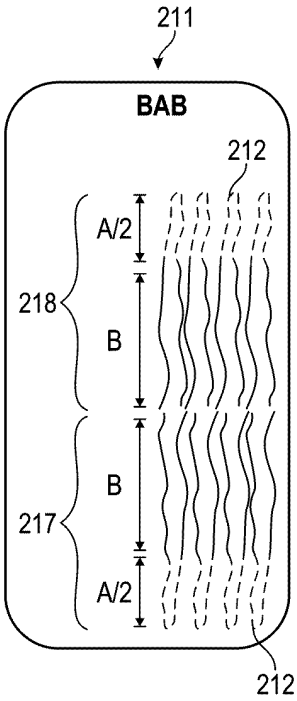
【図２Ａ】



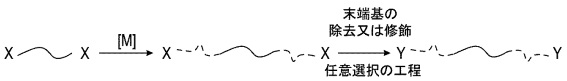
【図２Ｂ】



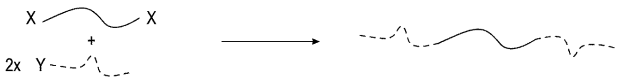
【図２Ｃ】



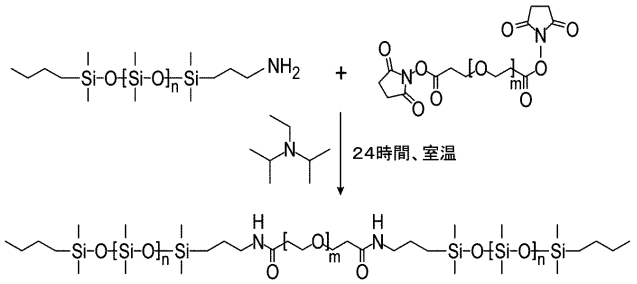
【図３Ａ】



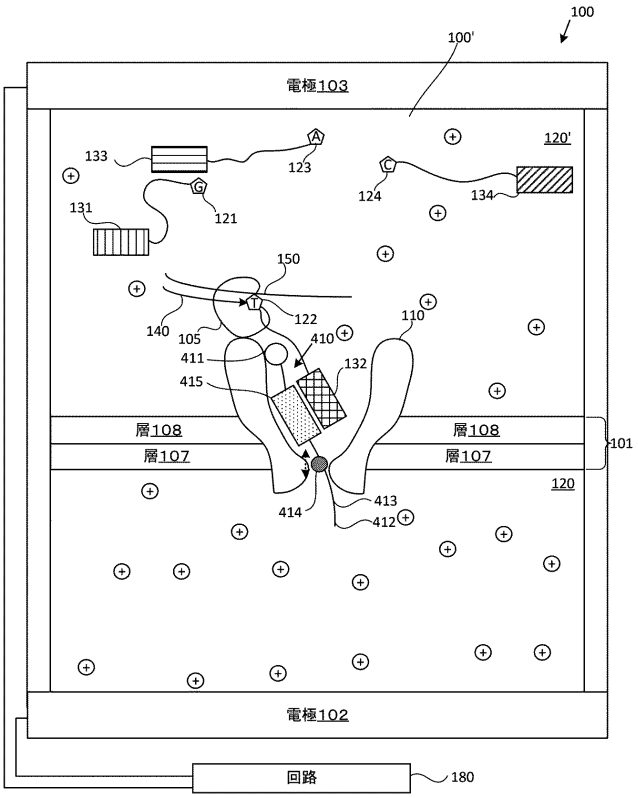
【図３Ｂ】



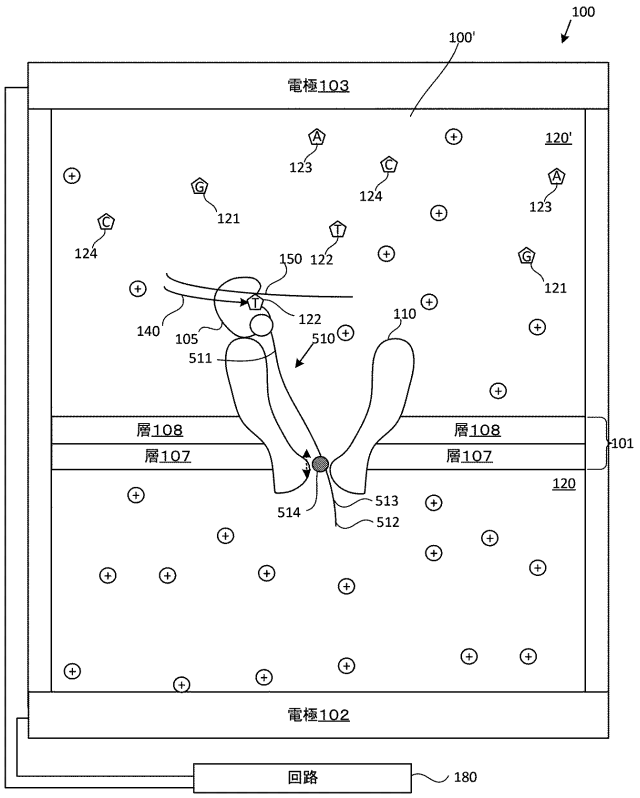
【図３Ｃ】


24時間、室温

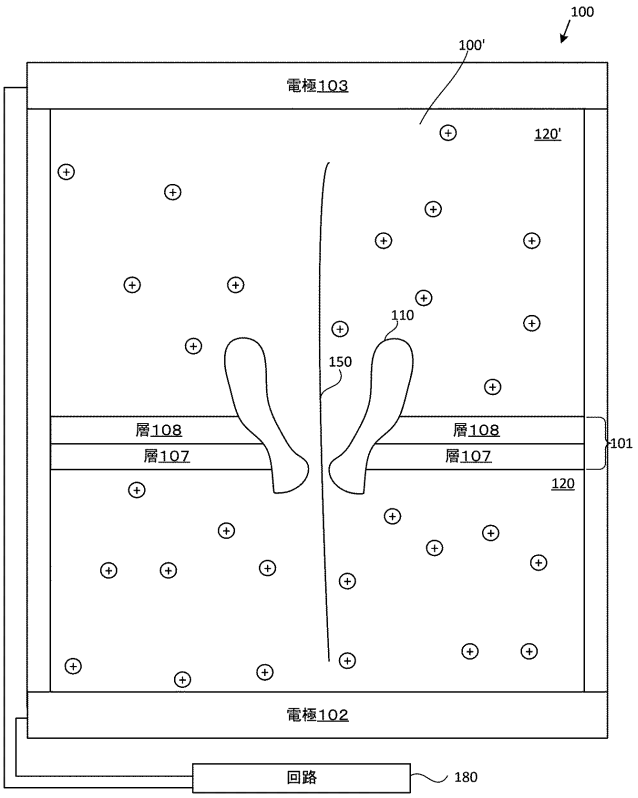
【図４】


100
100'
電極103
120'
133
123
131
121
124
134
150
122
140
105
410
110
411
132
415
層108
層107
101
120
413
414
412
電極102
回路
180

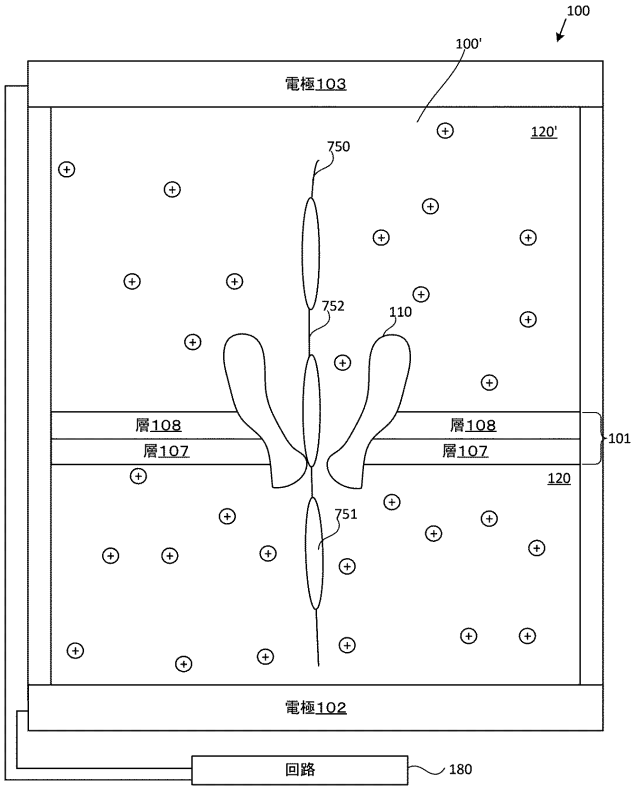
【図５】


100
100'
電極103
120'
123
124
121
150
122
140
105
510
110
511
層108
層107
101
120
513
514
512
電極102
回路
180

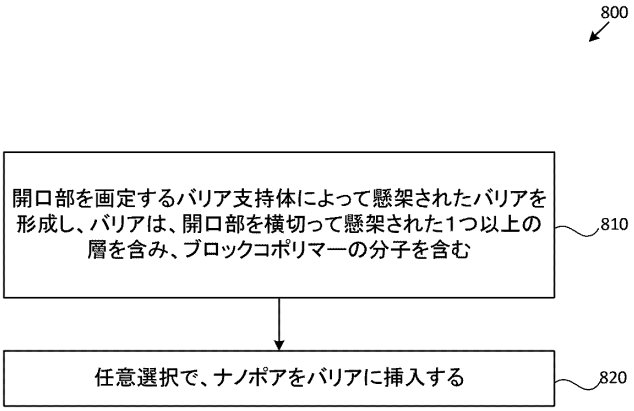
【図６】


100
100'
電極103
120'
110
150
層108
層107
101
120
電極102
回路
180

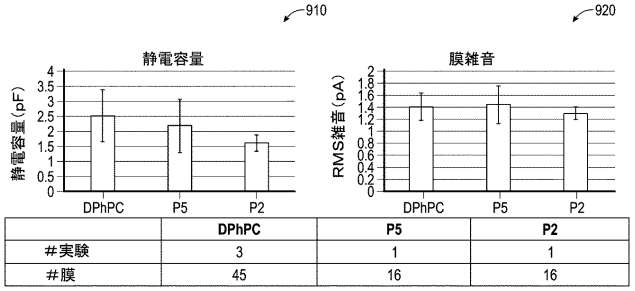
【図７】



【図８】

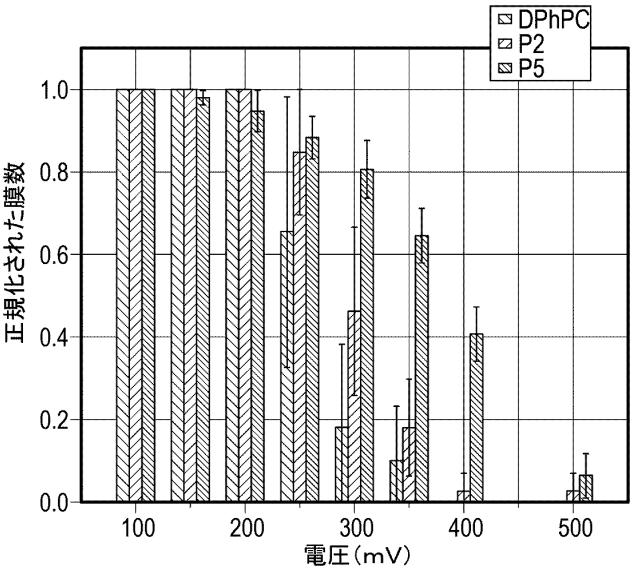


【図９】

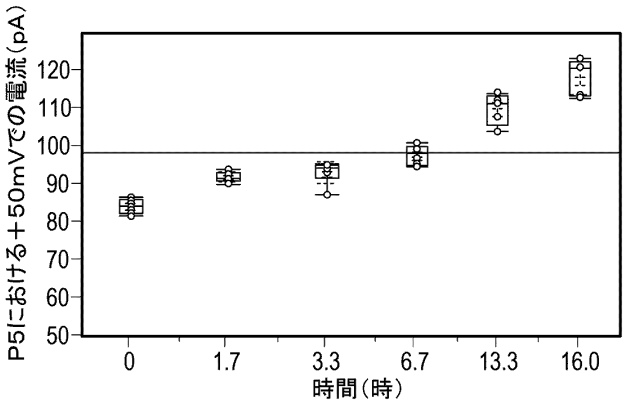


	DPhPC	P5	P2
＃実験	3	1	1
＃膜	45	16	16

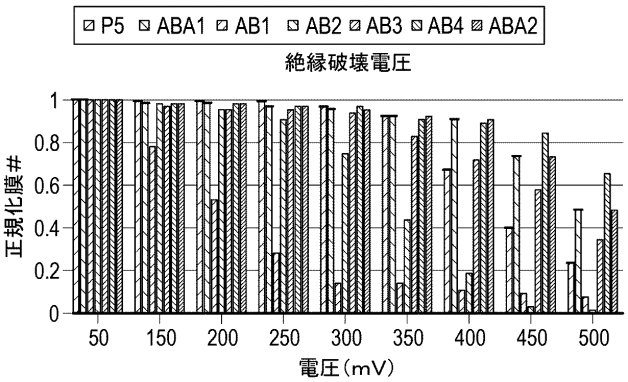
【図１０】



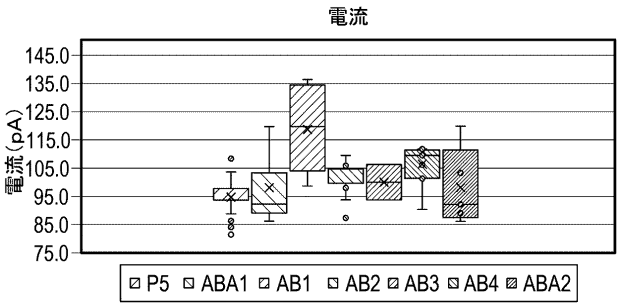
【図１１】



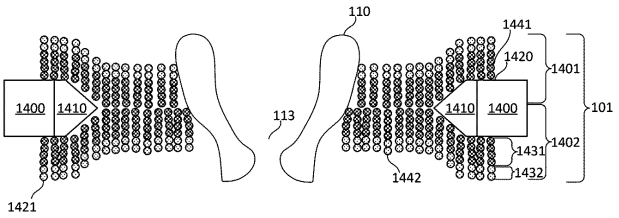
【図１２】



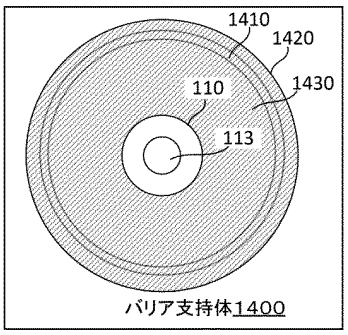
【図１３】



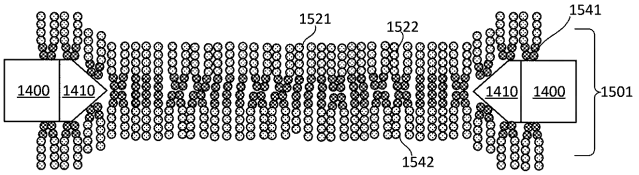
【図１４Ａ】



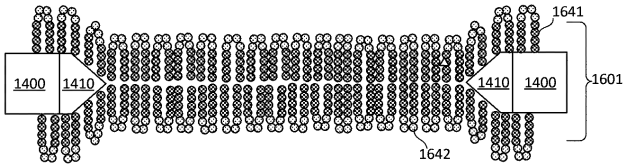
【図１４Ｂ】



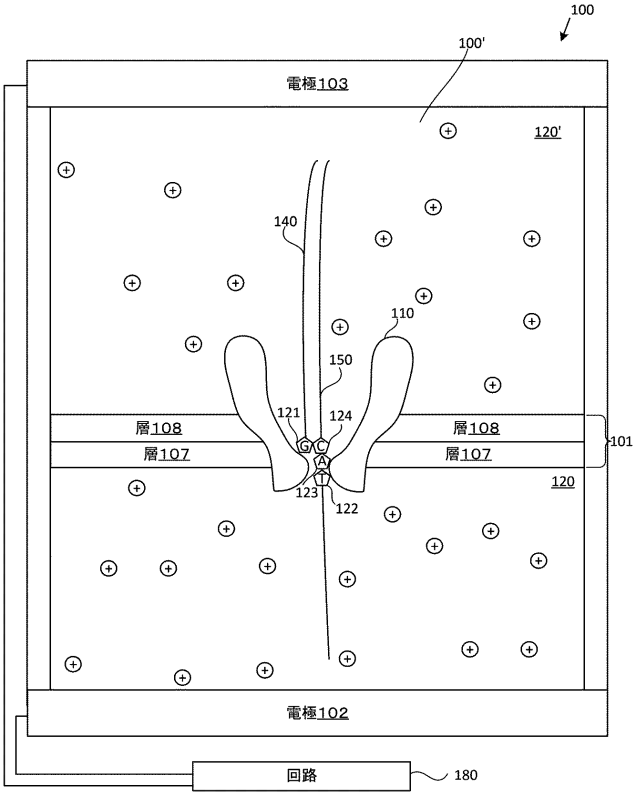
【図１５】



【図１６】


1641
1400
1410
1410
1400
1601
1642

【図１７】


100
100'
電極103
120'
140
110
150
121
124
層108
層108
層107
層107
101
G
C
A
T
123
122
120
電極102
回路
180

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01D69/14 C12Q1/6869
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B01D C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112 831 395 A (SHENZHEN BGI LIFE SCIENCE RES INSTITUTE) 25 May 2021 (2021-05-25) Background techniuqe example 1 the whole document	1-50
X	US 2020/246791 A1 (BARRALL GEOFFREY [US] ET AL) 6 August 2020 (2020-08-06) paragraphs [0053], [0053], [0146]; claims 1,11; figure 2	1-5,7-40

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 June 2023	04/07/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hennebrüder, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058383

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARNI MARTINA ET AL: "Biopores/membrane proteins in synthetic polymer membranes", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1859, no. 4, 29 October 2016 (2016-10-29), pages 619-638, XP029914706, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2016.10.015 Experimental Section -----	1,5,7, 10-15, 17-20, 41-50
A	YUE-XIAO SHEN ET AL: "Biomimetic membranes: A review", JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE, vol. 454, 1 March 2014 (2014-03-01), pages 359-381, XP055360785, NL ISSN: 0376-7388, DOI: 10.1016/j.memsci.2013.12.019 figure 9 -----	1-50
A	GONZÁLEZ-PÉREZ ALFREDO ET AL: "Biomimetic Triblock Copolymer Membrane Arrays: A Stable Template for Functional Membrane Proteins", LANGMUIR, vol. 25, no. 18, 12 August 2009 (2009-08-12), pages 10447-10450, XP093057257, US ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la902417m Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la902417m> Section 5.3; figure 10; table 2 -----	1-50

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/058383

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 112831395 A	25-05-2021	NONE	
US 2020246791 A1	06-08-2020	CN 111225744 A	02-06-2020
		EP 3700670 A1	02-09-2020
		JP 7012841 B2	28-01-2022
		JP 2021500034 A	07-01-2021
		US 2020246791 A1	06-08-2020
		WO 2019081442 A1	02-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　アトリー，オリバー
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　ヴァコーニュ，シャルロット
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　ガロルディーニ，ダヴィデ
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　アレマン ガルシア，ミゲル アンヘル
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　ヴィーボルナー，ユリア
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

(72)発明者　コチシュ，イシュトヴァン
英国シービー２１・６ディーエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９

Ｆターム（参考）　4B029　AA07 BB20 CC01 FA12 FA15 GB09
4B063　QA13 QQ42 QQ52 QR81 QS39 QX04