

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成 28 年 3 月 31 日 (2016.3.31)

【公表番号】特表 2015-508893 (P2015-508893A)

【公表日】平成 27 年 3 月 23 日 (2015.3.23)

【年通号数】公開・登録公報 2015-019

【出願番号】特願 2014-557118 (P2014-557118)

【国際特許分類】

G 0 1 N 27/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/84 (2006.01)

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 (2010.01)

【 F I 】

G 0 1 N 27/00 Z

G 0 1 N 33/84 Z

G 0 1 N 33/68

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/00 H

【手続補正書】

【提出日】平成 28 年 2 月 10 日 (2016.2.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の 2 つ以上の分析物の群の 1 つまたは複数の分析物メンバーの存在または非存在を決定する方法であって、

( a ) 試料を、膜貫通孔および 2 つ以上のプローブのパネルと接触させるステップであって、

パネル中のプローブは、孔にカップリングされておらず、

各プローブが、分析物メンバーの 1 つまたは複数の認識し、( i ) 分析物メンバーの 1 つまたは複数の結合するアダプターと、( i i ) 孔に侵入でき、プローブ中のアダプターが分析物メンバーの 1 つと結合しているか否かに応じて孔を流れる電流に異なる影響を与える尾部とを含み、

各プローブが、孔を流れる電流に示差的な様式で影響し、

2 つ以上の分析物の群中の各分析物メンバーが、パネル中の少なくとも 1 つのプローブにより認識されるステップと、

( b ) 孔を流れる電流を測定して、存在するならばパネル中のどのプローブが分析物メンバーと結合したかを決定し、そのことにより試料中の 1 つまたは複数の分析物メンバーの存在または非存在を決定するステップと

を含む方法。

【請求項 2】

( a ) 各プローブが、そのアダプターが分析物メンバーと結合していない場合に孔を流

れる電流に示差的な様式で影響する；および／または

(b) パネル中の少なくとも1つのプローブが、2つ以上の分析物の群内の分析物メンバーのあるクラスを認識し、前記クラス中の分析物メンバーと結合するアダプターを含む；および／または

(c) パネル中の少なくとも1つのプローブが、分析物メンバーの1つを特異的に認識し、前記分析物メンバーと特異的に結合するアダプターを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

パネル中の各プローブが、分析物メンバーの1つを特異的に認識し、前記分析物メンバーと特異的に結合するアダプターを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

尾部が、

(a) 孔を流れる電流に異なる方式で影響する少なくとも2つの領域を含み、ある領域が、アダプターが分析物メンバーの1つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アダプターが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある；および／または

(b) 重合体を含み、場合によって、重合体が、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはポリエチレングリコール(PEG)である；および／または

(c) 少なくとも1つの1本鎖ポリヌクレオチドを含み、場合によって、孔を流れる電流に異なる方式で影響する異なるヌクレオチド配列を有する1本鎖ポリヌクレオチドの少なくとも2つの領域を含み、ある領域が、アダプターが分析物メンバーの1つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アダプターが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にあり、および、場合によって、少なくとも2つの領域が、異なるヌクレオチドまたは異なるポリヌクレオチドバーコードの少なくとも2つのひと続きに相当する；および／または

(d) 孔を流れる電流に異なる方式で影響する異なる重合体の少なくとも2つの領域を含み、ある領域が、アダプターが分析物メンバーの1つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アダプターが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある；および／または

(e) 配列番号7から23の残基1から30を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

尾部が、少なくとも1つの2本鎖ポリヌクレオチドを含む、および／または、尾部が、約7から約70までのヌクレオチドの長さのポリヌクレオチドを含む、請求項4(b)～(e)のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

(a) パネル中の2つ以上のプローブが、同じアダプターと異なる1本鎖ポリヌクレオチド尾部とを含む；または

(b) パネル中の各プローブが、異なるアダプターを含む；および／または

(c) パネル中の各プローブが、異なる1本鎖ポリヌクレオチド尾部を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

パネル中の2つ以上のプローブが、異なるアダプターと同じ1本鎖ポリヌクレオチド尾部とを含む、請求項1から5および6(b)のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

パネル中のプローブの数が、2つ以上の分析物の群の分析物メンバーの数と同じである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

パネル中の2つ以上のプローブが、同じ分析物メンバーと特異的に結合する異なるアダプターを含む、請求項1から5、6(b)、6(c)、および7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

(a) パネル中の各プローブが、場合によってコレステロールを用いて、膜にカップリングされている；および/または

(b) 群が、約 4 から約 100 までの分析物メンバーを有する；および/または

(c) 分析物メンバーが、金属イオン、無機塩、重合体、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、色素、漂白剤、医薬品、診断剤、レクリエーションドラッグ、爆発物および環境汚染物質から独立して選択される；および/または

(d) 2 つ以上の分析物の群が、疾患または状態を診断または予後予測するために用いることができる 2 つ以上のバイオマーカーの群であり、場合によって、疾患または状態が、がん、冠動脈心疾患、循環器疾患または敗血症である；および/または

(e) アプタマーが、ペプチドアプタマーまたはオリゴヌクレオチドアプタマーである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

孔が、前庭またはパレルを含み、場合によって、

(a) パレルが、2 本鎖ポリヌクレオチドが孔を通過できないように十分に狭い；および/または

(b) 前庭およびパレルが、それぞれ少なくとも 2 ヌクレオチドを含有するように十分に長い；および/または

(c) 孔が、膜貫通タンパク質孔または固体状態の孔であり、場合によって、膜貫通タンパク質孔が、溶血素、ロイコシジン、スメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) ポリン A (M s p A)、外膜ホスホリパーゼ A、ナイセリア (*Neisseria*) オートトランスポートリポタンパク質 (N a l P) および W Z A に由来し、さらに場合によって、膜貫通タンパク質が、(i) 配列番号 2 に示す 7 つの同一のサブユニットで形成されている；(i i) そのバリエーションであって、7 つのサブユニットの 1 つまたは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 2 と少なくとも 80 % の相同性を有する前記バリエーションであって、孔活性を維持する前記バリエーションである；(i i i) 配列番号 4 に示す 4 つの同一のサブユニットと配列番号 6 に示す 4 つの同一のサブユニットとで形成される - 溶血素である；あるいは (i v) そのバリエーションであって、サブユニットの 1 もしくは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 4 と少なくとも 80 % の相同性を有し、かつ/またはサブユニットの 1 つもしくは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 6 と少なくとも 80 % の相同性を有し、かつ孔が孔活性を維持する前記バリエーションである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

ステップ (b) が、分析物メンバーの 1 つと結合するプローブについて、各プローブが結合しているときおよび未結合のときに孔を流れる異なる電流を比較することをさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

試料中の 2 以上の分析物の群の 1 つまたは複数の分析物メンバーの濃度を決定する方法であって、

(i) 請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法を行うステップと、

(i i) 試料中に存在することが示された 1 または複数の分析物メンバーについて、ステップ (b) における孔を流れる電流を、各分析物メンバーについての対照または参照データと比較し、そのことにより試料中の 1 つまたは複数の分析物メンバーの濃度を決定するステップとを含む方法。

## 【請求項 14】

試料中の 2 つ以上の分析物の群の 1 つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または非存在を決定するためのプローブのパネルであって、パネルが、2 つ以上のプローブを含み、

各プローブが、分析物メンバーの1つまたは複数を認識し、(i)分析物メンバーの1つまたは複数と結合するアダプターと、(ii)膜貫通孔に侵入でき、プローブ中のアダプターが分析物メンバーの1つと結合しているか否かに応じて孔を流れる電流に異なる影響を与える尾部とを含み、

パネル中のプローブは、孔にカップリングされておらず、

各プローブが、孔を流れる電流に示差的な様式で影響し、

2つ以上の分析物の群中の各分析物メンバーが、パネル中の少なくとも1つのプローブにより認識される、プローブのパネル。

【請求項15】

パネルが、請求項2から9のいずれか一項で定義するとおりである、および/または、各プローブが、プローブと膜とのカップリングを可能にする化学基をさらに含む、請求項14に記載のプローブのパネル。

【請求項16】

試料中の2つ以上の分析物の群の1つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または非存在を決定するためのキットであって、(a)請求項14または請求項15に記載のプローブのパネルと、(b)膜貫通孔とを含むキット。

【請求項17】

試料中の2つ以上の分析物の群の1つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または非存在を決定するための分析装置であって、複数の膜貫通孔と、請求項14または請求項15に記載のプローブのパネルとを含む分析装置。

【請求項18】

分析装置が、

複数の孔を支持でき、孔を用いて分析物メンバーの特徴決定を行うために作動可能なセンサデバイスと

特徴決定を行うための材料を保持するための少なくとも1の貯蔵器と、

少なくとも1つの貯蔵器からセンサデバイスに材料を制御可能に供給するように構成された流体システムと、

それぞれの試料を受容するための複数の容器と

を含み、流体システムが、容器からセンサデバイスに選択的に試料を供給するように構成されている、請求項17に記載の分析装置。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0211

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0211】

考察

上記の方法を用いて、K2 EDTA (Harlan Scientific、コード - S . B - 0009) 80%緩衝液中の20%ウサギ全血中に存在する場合に、3つ全ての分析物についての特徴的なステップレベル変化を検出することが可能である。

本発明は、以下の態様を包含する。

[1]

試料中の2つ以上の分析物の群の1つまたは複数の分析物メンバーの存在または非存在を決定する方法であって、

(a)試料を、膜貫通孔および2つ以上のプローブのパネルと接触させるステップであって、

各プローブが、分析物メンバーの1つまたは複数を認識し、(i)分析物メンバーの1つ

または複数と結合するアプタマーと、( i i ) 孔に侵入でき、プローブ中のアプタマーが分析物メンバーの 1 つと結合しているか否かに応じて孔を流れる電流に異なる影響を与える尾部とを含み、

各プローブが、孔を流れる電流に示差的な様式で影響し、

2 つ以上の分析物の群中の各分析物メンバーが、パネル中の少なくとも 1 つのプローブにより認識されるステップと、

( b ) 孔を流れる電流を測定して、存在するならばパネル中のどのプローブが分析物メンバーと結合したかを決定し、そのことにより試料中の 1 つまたは複数の分析物メンバーの存在または非存在を決定するステップと

を含む方法。

[ 2 ]

各プローブが、そのアプタマーが分析物メンバーと結合していない場合に孔を流れる電流に示差的な様式で影響する、上記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 3 ]

パネル中の少なくとも 1 つのプローブが、2 つ以上の分析物の群内の分析物メンバーのあるクラスを認識し、前記クラス中の分析物メンバーと結合するアプタマーを含む、上記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ]

パネル中の少なくとも 1 つのプローブが、分析物メンバーの 1 つを特異的に認識し、前記分析物メンバーと特異的に結合するアプタマーを含む、上記 [ 1 ] から [ 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 ]

パネル中の各プローブが、分析物メンバーの 1 つを特異的に認識し、前記分析物メンバーと特異的に結合するアプタマーを含む、上記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 6 ]

尾部が、孔を流れる電流に異なる方式で影響する少なくとも 2 つの領域を含み、ある領域が、アプタマーが分析物メンバーの 1 つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アプタマーが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 7 ]

尾部が、重合体を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 8 ]

重合体が、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはポリエチレングリコール ( P E G ) である、上記 [ 7 ] に記載の方法。

[ 9 ]

尾部が、少なくとも 1 つの 1 本鎖ポリヌクレオチドを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 0 ]

尾部が、孔を流れる電流に異なる方式で影響する異なるヌクレオチド配列を有する 1 本鎖ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つの領域を含み、ある領域が、アプタマーが分析物メンバーの 1 つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アプタマーが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある、上記 [ 9 ] に記載の方法。

[ 1 1 ]

少なくとも 2 つの領域が、異なるヌクレオチドまたは異なるポリヌクレオチドバーコードの少なくとも 2 つのひと続きに相当する、上記 [ 1 0 ] に記載の方法。

[ 1 2 ]

尾部が、孔を流れる電流に異なる方式で影響する異なる重合体の少なくとも 2 つの領域を含み、ある領域が、アプタマーが分析物メンバーの 1 つと結合していないときに孔の中にあり、異なる領域が、アプタマーが前記分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 3 ]

尾部が、少なくとも1つの2本鎖ポリヌクレオチドを含む、上記 [ 8 ] から [ 1 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 4 ]

尾部が、約7から約70までのヌクレオチドの長さのポリヌクレオチドを含む、上記 [ 8 ] から [ 1 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 5 ]

尾部が、配列番号7から23の残基1から30を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 6 ]

パネル中の各プローブが、異なるアプタマーを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 7 ]

パネル中の各プローブが、異なる1本鎖ポリヌクレオチド尾部を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 8 ]

パネル中の2つ以上のプローブが、異なるアプタマーと同じ1本鎖ポリヌクレオチド尾部とを含む、上記 [ 1 ] から [ 1 6 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 9 ]

パネル中のプローブの数が、2つ以上の分析物の群の分析物メンバーの数と同じである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 0 ]

パネル中の2つ以上のプローブが、同じアプタマーと異なる1本鎖ポリヌクレオチド尾部とを含む、上記 [ 1 ] から [ 1 5 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 1 ]

パネル中の2つ以上のプローブが、同じ分析物メンバーと特異的に結合する異なるアプタマーを含む、上記 [ 1 ] から [ 1 8 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 2 ]

パネル中の各プローブが、膜にカップリングされている、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 3 ]

各プローブが、コレステロールを用いて膜にカップリングされている、上記 [ 2 2 ] に記載の方法。

[ 2 4 ]

群が、約4から約100までの分析物メンバーを有する、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 5 ]

分析物メンバーが、金属イオン、無機塩、重合体、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、色素、漂白剤、医薬品、診断剤、レクリエーションドラッグ、爆発物および環境汚染物質から独立して選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 6 ]

2つ以上の分析物の群が、疾患または状態を診断または予後予測するために用いることができる2つ以上のバイオマーカーの群である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 7 ]

疾患または状態が、がん、冠動脈心疾患、循環器疾患または敗血症である、上記 [ 2 6 ] に記載の方法。

[ 2 8 ]

アプタマーが、ペプチドアプタマーまたはオリゴヌクレオチドアプタマーである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 9 ]

孔が、前庭またはバレルを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 0 ]

バレルが、2本鎖ポリヌクレオチドが孔を通過できないように十分に狭い、上記 [ 2 9 ] に記載の方法。

[ 3 1 ]

前庭およびバレルが、それぞれ少なくとも2ヌクレオチドを含有するように十分に長い、上記 [ 2 9 ] または [ 3 0 ] に記載の方法。

[ 3 2 ]

孔が、膜貫通タンパク質孔または固体状態の孔である、上記 [ 2 9 ] から [ 3 1 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 3 ]

膜貫通タンパク質孔が、溶血素、ロイコシジン、スメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) ポリン A ( M s p A )、外膜ホスホリパーゼ A、ナイセリア (*Neisseria*) オートトランスポートリポタンパク質 ( N a l P ) および W Z A に由来する、上記 [ 3 2 ] に記載の方法。

[ 3 4 ]

膜貫通タンパク質が、( a ) 配列番号 2 に示す 7 つの同一のサブユニット、あるいは ( b ) そのバリエーションであって、7 つのサブユニットの 1 つまたは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 2 と少なくとも 5 0 % の相同性を有する前記バリエーションであって、孔活性を維持する前記バリエーションで形成されている、上記 [ 3 3 ] に記載の方法。

[ 3 5 ]

膜貫通タンパク質が、( a ) 配列番号 4 に示す 4 つの同一のサブユニットと配列番号 6 に示す 4 つの同一のサブユニットとで形成される - 溶血素、あるいは ( b ) そのバリエーションであって、サブユニットの 1 もしくは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 4 と少なくとも 5 0 % の相同性を有し、かつ / またはサブユニットの 1 もしくは複数が、配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号 6 と少なくとも 5 0 % の相同性を有し、かつ孔が孔活性を維持する前記バリエーションである、上記 [ 3 3 ] に記載の方法。

[ 3 6 ]

ステップ ( b ) が、分析物メンバーの 1 つと結合するプローブについて、各プローブが結合しているときおよび未結合のときに孔を流れる異なる電流を比較することをさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 7 ]

試料中の 2 以上の分析物の群の 1 つまたは複数の分析物メンバーの濃度を決定する方法であって、

( i ) 上記 [ 1 ] から [ 3 6 ] のいずれか一項に記載の方法を行うステップと、

( i i ) 試料中に存在することが示された 1 または複数の分析物メンバーについて、ステップ ( b ) における孔を流れる電流を、各分析物メンバーについての対照または参照データと比較し、そのことにより試料中の 1 つまたは複数の分析物メンバーの濃度を決定するステップとを含む方法。

[ 3 8 ]

試料中の 2 つ以上の分析物の群の 1 つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または非存在を決定するためのプローブのパネルであって、パネルが、2 つ以上のプローブを含み、

各プローブが、分析物メンバーの 1 つまたは複数と認識し、( i ) 分析物メンバーの 1 つまたは複数と結合するアダプターと、( i i ) 膜貫通孔に侵入でき、プローブ中のアダプターが分析物メンバーの 1 つと結合しているか否かに応じて孔を流れる電流に異なる影響

を与える尾部とを含み、  
各プローブが、孔を流れる電流に示差的な様式で影響し、  
2つ以上の分析物の群中の各分析物メンバーが、パネル中の少なくとも1つのプローブに  
より認識される、プローブのパネル。

[ 3 9 ]

上記 [ 2 ] から [ 2 1 ] のいずれか一項で定義するとおりである、上記 [ 3 8 ] に記載  
のプローブのパネル。

[ 4 0 ]

各プローブが、プローブと膜とのカップリングを可能にする化学基をさらに含む、上記  
[ 3 8 ] または [ 3 9 ] に記載のプローブのパネル。

[ 4 1 ]

試料中の2つ以上の分析物の群の1つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または  
非存在を決定するためのキットであって、( a ) 上記 [ 3 8 ] から [ 4 0 ] のいずれか一  
項に記載のプローブのパネルと、( b ) 膜貫通孔とを含むキット。

[ 4 2 ]

試料中の2つ以上の分析物の群の1つまたは複数の分析物メンバーの存在、濃度または  
非存在を決定するための分析装置であって、複数の膜貫通孔と、上記 [ 3 8 ] から [ 4 0 ]  
のいずれか一項に記載のプローブのパネルとを含む分析装置。

[ 4 3 ]

複数の孔を支持でき、孔を用いて分析物メンバーの特徴決定を行うために作動可能なセ  
ンサデバイスと

特徴決定を行うための材料を保持するための少なくとも1の貯蔵器と、

少なくとも1つの貯蔵器からセンサデバイスに材料を制御可能に供給するように構成され  
た流体システムと、

それぞれの試料を受容するための複数の容器と

を含み、流体システムが、容器からセンサデバイスに選択的に試料を供給するように構成  
されている、上記 [ 4 2 ] に記載の分析装置。