

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6541114号  
(P6541114)

(45) 発行日 令和1年7月10日(2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日(2019.6.21)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 27/00 (2006.01)	GO 1 N 27/00 Z
GO 1 N 33/544 (2006.01)	GO 1 N 33/544 Z
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z

請求項の数 23 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2017-511140 (P2017-511140)
(86) (22) 出願日	平成26年7月11日 (2014.7.11)
(65) 公表番号	特表2017-515131 (P2017-515131A)
(43) 公表日	平成29年6月8日 (2017.6.8)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/046397
(87) 国際公開番号	W02015/171169
(87) 国際公開日	平成27年11月12日 (2015.11.12)
審査請求日	平成29年7月10日 (2017.7.10)
(31) 優先権主張番号	PCT/US2014/036861
(32) 優先日	平成26年5月5日 (2014.5.5)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	516331111 ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2161 #ビー
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノポアによる標的検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、試料中に存在すると推測される標的分子または標的粒子を検出する方法：

(a) 標的分子または標的粒子がリガンドに結合し、結合ドメインが結合モチーフに結合することを可能にする条件の下で、(i) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドと結合ドメインとを含む融合分子および(ii) 該結合ドメインが結合することができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場と、試料を接触させる工程；

(b) 装置の内部空間を二つのポリウムへ分離する孔を含み、孔を通過する物体を同定するよう構成されたセンサーを含む装置へ、ポリマー足場を負荷し、融合分子に結合したポリマー足場を孔を通して一方のポリウムから他方のポリウムへ通過させるよう装置を構成する工程；ならびに

(c) センサーによって、結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを決定し、それによって、試料中の標的分子または標的粒子の存在を検出する工程。

【請求項2】

標的分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、化学化合物、イオン、および元素からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

標的粒子が、タンパク質複合体または凝集物、タンパク質/核酸複合体、断片化された

または完全に集合したウイルス、細菌、細胞、および細胞凝集物からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

工程(a)が工程(b)の前に実施される、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

工程(b)が工程(a)の前に実施される、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

標的分子または標的粒子とリガンドとの間の結合を改変すると推測される条件を適用し、決定を再び実施する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記条件が、試料からの標的分子または標的粒子の除去、標的分子もしくは標的粒子またはリガンドと結合について競合する薬剤の添加、およびpH、塩、または温度の変化からなる群より選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

結合モチーフが結合ドメインとの結合のための化学的修飾を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

化学的修飾が、アセチル化、メチル化、SUMO化(summolation)、グリコシル化、リン酸化、および酸化からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ポリマー足場が、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチド核酸(PNA)、DNA/RNAハイブリッド、およびポリペプチドのうちの少なくとも一つである、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

結合ドメインが、ヘリックスターンヘリックス、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ウイングドヘリックス、ウイングドヘリックスターンヘリックス、ヘリックスループヘリックス、およびHMG(high mobility group)ボックスからなる群より選択される、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

結合ドメインが、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、TALエフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)、 dendrogram、ペプチド、およびアプタマーからなる群より選択される、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

リガンドが、抗体、抗体断片、エピトープ、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子、細胞認識分子、核酸、ペプチド、アプタマー、および受容体からなる群より選択される、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

結合ドメインおよびリガンドが、融合分子を形成するため、共有結合、水素結合、イオン結合、金属結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、および平面スタッキング相互作用からなる群より選択される相互作用を介して連結されているか、または連続的なポリペプチドとして翻訳されている、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

標的分子もしくは標的粒子または標的分子もしくは標的粒子/リガンド複合体に結合することができる検出可能標識と試料を接触させる工程をさらに含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記ポリマー足場が少なくとも2単位の結合モチーフを含む、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

10

20

30

40

50

前記ポリマー足場が少なくとも2種の異なる結合モチーフを含み；少なくとも2種の異なる結合モチーフのうちの異なる1種に結合することができる異なる結合ドメインと、異なる標的分子または標的粒子に結合することができる異なるリガンドとを各々が含む少なくとも2種の融合分子に、試料が接触し；各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを同定するよう、センサーが構成される、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

二つのポリウム間に電位差を印加し、孔を通る電流を測定するよう、さらに構成された電極を、センサーが含む、請求項1~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

装置が、上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーを含み、  
上チャンバーが第1の孔を通して中央チャンバーと連絡しており、中央チャンバーが第2の孔を通して下チャンバーと連絡しており；  
第1の孔および第2の孔が、直径約1nm~約100nmであり、相互に約10nm~約1000nm離れており；  
チャンバーの各々が電源との接続のための電極を含む、  
請求項1~18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを再び同定するよう、結合モチーフが孔を通過した後、ポリマー足場を逆方向に移動させる工程をさらに含む、請求項1~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

以下のものを含む、標的分子または標的粒子の存在を検出するためのキット、パッケージ、または混合物：

- (a) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドと結合ドメインとを含む融合分子；
- (b) 結合ドメインが結合することができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場；および
- (c) 装置の内部空間を二つのポリウムへ分離する孔を含み、融合分子に結合したポリマー足場を孔を通して一方のポリウムから他方のポリウムへ通過させるよう構成されており、(i) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合しているか、(ii) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合していないか、または(iii) 結合モチーフが融合分子に結合していないかを同定するよう構成された、孔に隣接したセンサーをさらに含む装置。

【請求項22】

標的分子または標的粒子を含有していると推測される試料をさらに含む、請求項21に記載のキット、パッケージ、または混合物。

【請求項23】

試料が、標的分子もしくは標的粒子または標的分子もしくは標的粒子/リガンド複合体に結合することができる検出可能標識をさらに含む、請求項22に記載のキット、パッケージ、または混合物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

循環腫瘍細胞、細菌、およびウイルスのようなナノスケールおよびマイクロスケールの粒子の検出は、無限の臨床的利用可能性を有する。現在利用可能な方法には、免疫組織学および核酸に基づく検出が含まれ、典型的には、高感度検出を実施する前に、細胞増殖が必要とされる。

【0002】

10

20

30

40

50

分子の検出および定量化も重要であって、分子の型に依って、様々な方法によって実施され得る。例えば、ヌクレオチド配列は、プローブもしくはプライマーとの配列相補性によって、ハイブリダイゼーションおよび/もしくは増幅を通して、またはより少ない事例においては、その配列を認識するタンパク質によって検出され得る。他方、タンパク質は、一般的に、そのタンパク質を特異的に認識し、それに結合する抗体によって検出される。酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は、これに関して、高度に商品化され一般的に使用されている。

#### 【0003】

炭水化物、化学化合物、イオン、および元素のような、その他の様々な高分子または低分子を検出または定量化する方法も、存在する。

10

#### 【0004】

腫瘍細胞および病原生物のような分子および粒子の高度に高感度の検出のための方法および系は、特に、臨床的に、例えば、病原体検出および疾患分析のため、広い適用を有する。さらに、そのような検出は、医学的処置および健康プログラムの個別化を可能にし；有効な薬学的薬物化合物およびバイオ治療薬の探索を容易にし；臨床医が、患者の身体によって産生された異常なホルモン、イオン、タンパク質、もしくはその他の分子を同定し、かつ/または患者へ摂取されたもしくは注射された毒物、不法薬物、もしくはその他の有害化学物質の存在を同定することを可能にする。

#### 【0005】

分子および粒子の検出のための現在利用可能な技術は、一般に、高価であり、多量の労働、技術、および/または時間を必要とする。迅速に、安価に、かつ容易に、正確な結果を生ずる改善された検出技術の必要性が存在する。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

概要

本明細書に開示された様々な局面は、前述の必要性のうちの一つ以上を満たすことができる。本明細書に記載された系および方法は、各々、いくつかの局面を有し、そのうちの一つが単独で望ましい属性を担うのではない。下記の特許請求の範囲によって表される本開示の範囲を限定することなく、より顕著な特色を以下に簡単に記述する。この記述を考慮した後、具体的には、「詳細な説明」という表題のセクションを参照した後、本明細書

30

#### 【0007】

一つの態様において、本開示は、以下の工程を含む、標的分子または標的粒子が試料中に存在するか否かをアッセイする方法を提供する：

(a) 標的分子または標的粒子がリガンドに結合し、結合ドメインが結合モチーフに結合することを可能にする条件の下で、(i) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドと結合ドメインとを含む融合分子および(ii) 融合分子の結合ドメインが結合することができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場と、試料を接触させる工程；(b) 装置の内部空間を二つのポリウムへ分離する孔を含み、孔を通過する物体を同定するよう構成されたセンサーを含む装置へ、ポリマーを負荷し、ポリマーを孔を通して一方のポリウムから他方のポリウムへ通過させるよう装置を構成する工程；ならびに(c) センサーによって、結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを決定し、それによって、試料中の標的分子または標的粒子の存在または欠如を検出する工程。

40

#### 【0008】

いくつかの局面において、標的分子は、タンパク質、ペプチド、核酸、化学化合物、脂質、受容体、イオン、および元素からなる群より選択される。

#### 【0009】

いくつかの局面において、標的粒子は、タンパク質複合体およびタンパク質凝集物、ペ

50

プチド凝集物、タンパク質/核酸複合体、断片化されたまたは完全に集合したウイルス、細菌、細胞、ならびに細胞凝集物からなる群より選択される。

【0010】

いくつかの局面において、標的分子または標的粒子が試料中に存在するか否かをアッセイする方法の工程(a)は、工程(b)の前に実施される。いくつかの局面において、工程(b)は、工程(a)の前に実施される。

【0011】

いくつかの局面において、方法は、標的分子または標的粒子とリガンドとの間の結合を改変すると推測される条件を適用し、決定を再び実施する工程をさらに含む。いくつかの局面において、条件は、試料からの標的分子または標的粒子の除去、標的分子もしくは標的粒子またはリガンドと結合について競合する薬剤の添加、およびpH、塩濃度、または温度の変化からなる群より選択される。

10

【0012】

いくつかの局面において、結合モチーフは、結合ドメインとの結合のための化学的修飾を含む。いくつかの局面において、化学的修飾は、アセチル化、メチル化、SUMO化(summolation)、グリコシル化、リン酸化、および酸化からなる群より選択される。

【0013】

いくつかの局面において、ポリマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチド核酸(PNA)、DNA/RNAハイブリッド、またはポリペプチドを含む。いくつかの局面において、ポリマーは、合成足場である。

20

【0014】

いくつかの局面において、結合ドメインは、ヘリックスターンヘリックス、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ウイングドヘリックス、ウイングドヘリックスターンヘリックス、ヘリックスループヘリックス、およびHMG(high mobility group)ボックスからなる群より選択される。

【0015】

いくつかの局面において、結合ドメインは、ロックド核酸(LNA)、PNA、TALエフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)、ペプチド、 dendriマー、ならびに aptamer (DNAおよび/またはタンパク質) からなる群より選択される。

30

【0016】

いくつかの局面において、リガンドはタンパク質である。いくつかの局面において、リガンドは、抗体、抗体断片、エピトープ、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子、細胞認識分子、核酸、ペプチド、および受容体からなる群より選択される。いくつかの局面において、リガンドは、 aptamer (例えば、DNA、タンパク質、またはDNA/タンパク質) である。いくつかの局面において、リガンドは低分子化合物である。

【0017】

いくつかの局面において、結合ドメインおよびリガンドは、融合分子を形成するため、共有結合、水素結合、イオン結合、金属結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、もしくは平面スタッキング相互作用を介して連結されているか、または連続的なポリペプチドとして翻訳されている。

40

【0018】

いくつかの局面において、方法は、標的分子、標的粒子、または標的/リガンド複合体に結合することができる検出可能標識と試料を接触させる工程をさらに含む。

【0019】

いくつかの局面において、ポリマーは少なくとも2単位の結合モチーフを含む。

【0020】

いくつかの局面において、ポリマーは、少なくとも2種の異なる結合モチーフを含む。そのような局面においては、少なくとも2種の異なる結合モチーフのうちの異なる1種に結合することができる異なる結合ドメインと、異なる標的分子または標的粒子に結合するこ

50

とができる異なるリガンドとを各々含む少なくとも2種の融合分子と、試料が接触させられ；各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを同定するよう、センサーが構成される。

【0021】

いくつかの局面において、センサーは、二つのポリュームの間に電圧を印加するようさらに構成された電極を含む。

【0022】

いくつかの局面において、装置は、上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーを含み、上チャンバーは、第1の孔を通して中央チャンバーと連絡しており、中央チャンバーは、第2の孔を通して下チャンバーと連絡している。

10

【0023】

一つの局面において、第1の孔および第2の孔は、直径約1nm～約100nmである。そのような孔は、タンパク質および核酸のような分子を検出するために適当であり得る。一つの局面において、第1の孔および第2の孔は、腫瘍細胞および細菌細胞のような比較的大きい粒子を検出するために適当であり得る、直径約50,000nmの大きさである。

【0024】

いくつかの局面において、孔は、相互に約10nm～約1000nm離れている。いくつかのそのような局面において、孔の間の距離は、ポリマーが第1および第2の孔の両方に同時に及ぶことができるようなサイズである。他の局面において、孔は、相互に1000nm超離れている。

20

【0025】

いくつかの局面において、チャンバーの各々は、電源との接続のための電極を含む。

【0026】

いくつかの局面において、方法は、各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを再び同定するよう、結合モチーフが少なくとも一つの孔を通過した後、ポリマーを逆方向に移動させる工程をさらに含む。

【0027】

標的分子または標的粒子の存在を検出するキット、パッケージ、または混合物も、提供される。いくつかの局面において、キット、パッケージ、または混合物は、(a) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドおよび結合ドメインである融合分子；(b) 結合ドメインが結合することができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場；(c) 装置の内部空間を二つのポリュームへ分離する孔を含み、ポリマーが孔を通して一方のポリュームから他方のポリュームへ通過することを可能にするよう構成されており、(i) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合しているか、(ii) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合していないか、または(iii) 結合モチーフが融合分子に結合していないかを同定するよう構成されたセンサーをさらに含む装置を含む。いくつかの局面において、装置は、三つのポリューム：上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーが存在するよう、装置の内部空間をさらに分離する第2の孔をさらに含む。

30

【0028】

いくつかの局面において、キット、パッケージ、または混合物は、標的分子または標的粒子を含有していると推測される試料をさらに含む。いくつかの局面において、試料は、標的分子、標的粒子、リガンド/標的複合体、またはリガンド/粒子複合体に結合することができる検出可能標識をさらに含む。

40

[本発明1001]

以下の工程を含む、試料中に存在すると推測される標的分子または標的粒子を検出する方法：

(a) 標的分子または標的粒子がリガンドに結合し、結合ドメインが結合モチーフに結合することを可能にする条件の下で、(i) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドと結合ドメインとを含む融合分子および(ii) 該結合ドメインが結合すること

50

ができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場と、試料を接触させる工程；  
(b) 装置の内部空間を二つのポリウムへ分離する孔を含み、孔を通過する物体を同定  
するよう構成されたセンサーを含む装置へ、ポリマーを負荷し、ポリマーを孔を通して一  
方のポリウムから他方のポリウムへ通過させるよう装置を構成する工程；ならびに  
(c) センサーによって、結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に  
結合しているか否かを決定し、それによって、試料中の標的分子または標的粒子の存在を  
検出する工程。

[本発明1002]

標的分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、化学化合物、イオン、および元素からなる  
群より選択される、本発明1001の方法。

10

[本発明1003]

標的粒子が、タンパク質複合体または凝集物、タンパク質/核酸複合体、断片化された  
または完全に集合したウイルス、細菌、細胞、および細胞凝集物からなる群より選択され  
る、本発明1001の方法。

[本発明1004]

工程(a)が工程(b)の前に実施される、本発明1001~1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

工程(b)が工程(a)の前に実施される、本発明1001~1003のいずれかの方法。

[本発明1006]

標的分子または標的粒子とリガンドとの間の結合を改変すると推測される条件を適用し  
、決定を再び実施する工程をさらに含む、本発明1001~1005のいずれかの方法。

20

[本発明1007]

前記条件が、試料からの標的分子または標的粒子の除去、標的分子もしくは標的粒子ま  
たはリガンドと結合について競合する薬剤の添加、およびpH、塩、または温度の変化から  
なる群より選択される、本発明1006の方法。

[本発明1008]

結合モチーフが結合ドメインとの結合のための化学的修飾を含む、本発明1001~1007の  
いずれかの方法。

[本発明1009]

化学的修飾が、アセチル化、メチル化、SUMO化(summolation)、グリコシル化、リン  
酸化、および酸化からなる群より選択される、本発明1008の方法。

30

[本発明1010]

ポリマーが、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチド核酸(PNA)、DNA  
/RNAハイブリッド、およびポリペプチドのうちの少なくとも一つである、本発明1001~10  
09のいずれかの方法。

[本発明1011]

結合ドメインが、ヘリクスターンヘリックス、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー  
、ウイングドヘリックス、ウイングドヘリクスターンヘリックス、ヘリックスループヘ  
リックス、およびHMG(high mobility group)ボックスからなる群より選択される、本発  
明1001~1010のいずれかの方法。

40

[本発明1012]

結合ドメインが、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、TALエフェクターヌク  
レアーゼ(TALEN)、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic rep  
eat)、 dendrogram、ペプチド、およびアプタマーからなる群より選択される、本発明1  
001~1010のいずれかの方法。

[本発明1013]

リガンドが、抗体、抗体断片、エピトープ、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、  
増殖因子、細胞認識分子、核酸、ペプチド、アプタマー、および受容体からなる群より選  
択される、本発明1001~1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

50

結合ドメインおよびリガンドが、融合分子を形成するため、共有結合、水素結合、イオン結合、金属結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、および平面スタッキング相互作用からなる群より選択される相互作用を介して連結されているか、または連続的なポリペプチドとして翻訳されている、本発明1001～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

標的分子もしくは標的粒子または標的分子もしくは標的粒子/リガンド複合体に結合することができる検出可能標識と試料を接触させる工程をさらに含む、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記ポリマーが少なくとも2単位の結合モチーフを含む、本発明1001～1015のいずれかの方法。

10

[本発明1017]

前記ポリマーが少なくとも2種の異なる結合モチーフを含み；少なくとも2種の異なる結合モチーフのうちの異なる1種に結合することができる異なる結合ドメインと、異なる標的分子または標的粒子に結合することができる異なるリガンドとを各々が含む少なくとも2種の融合分子に、試料が接触し；各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを同定するよう、センサーが構成される、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

二つのボリュームの間に電位差を印加し、孔を通る電流を測定するよう、さらに構成された電極を、センサーが含む、本発明1001～1017のいずれかの方法。

20

[本発明1019]

装置が、上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーを含み、上チャンバーが第1の孔を通して中央チャンバーと連絡しており、中央チャンバーが第2の孔を通して下チャンバーと連絡しており；

第1の孔および第2の孔が、直径約1nm～約100nmであり、相互に約10nm～約1000nm離れており；

チャンバーの各々が電源との接続のための電極を含む、

本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

30

各結合モチーフに結合した融合分子が標的分子または標的粒子に結合しているか否かを再び同定するように、結合モチーフが孔を通過した後、ポリマーを逆方向に移動させる工程をさらに含む、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

以下のものを含む、標的分子または標的粒子の存在を検出するためのキット、パッケージ、または混合物：

(a) 標的分子または標的粒子に結合することができるリガンドと結合ドメインとを含む融合分子；

(b) 結合ドメインが結合することができる少なくとも一つの結合モチーフを含むポリマー足場；および

40

(c) 装置の内部空間を二つのボリュームへ分離する孔を含み、ポリマーを孔を通して一方のボリュームから他方のボリュームへ通過させるよう構成されており、(i) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合しているか、(ii) 結合モチーフが融合分子に結合しており、リガンドが標的分子もしくは標的粒子に結合していないか、または(iii) 結合モチーフが融合分子に結合していないかを同定するよう構成された、孔に隣接したセンサーをさらに含む装置。

[本発明1022]

標的分子または標的粒子を含有していると推測される試料をさらに含む、本発明1021のキット、パッケージ、または混合物。

[本発明1023]

50

試料が、標的分子もしくは標的粒子または標的分子もしくは標的粒子/リガンド複合体に結合することができる検出可能標識をさらに含む、本発明1022のキット、パッケージ、または混合物。

【0029】

限定ではなく例証によって特色を例示するに過ぎない図面が、本開示の態様として提供される。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、本開示の方法の一つの態様による標的分子または標的粒子の検出を例示する。

10

【図2】図2は、二本鎖DNAがポリマー足場として使用され、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)エンベロープタンパク質がリガンドとして使用されている、より具体的な例の例示を提供する。その組み合わせは、抗HIV抗体を検出するために使用される。

【図3A】図3は、融合分子単独またはDNA単独のものと比較して異なる電流プロファイルを有するため、ナノポアを通過する時、標的分子(または粒子)と融合分子との間の結合が検出され得ることを証明する、三つの例分子の代表的な理想的な電流プロファイルを示す。具体的には、図3Aは、孔を通る正の電流を生成する、実験緩衝液中のより高い塩濃度(>0.4M KCl、例えば、1M KCl)および正の印加電圧と一致する電流プロファイルを示す。

【図3B】図3は、融合分子単独またはDNA単独のものと比較して異なる電流プロファイルを有するため、ナノポアを通過する時、標的分子(または粒子)と融合分子との間の結合が検出され得ることを証明する、三つの例分子の代表的な理想的な電流プロファイルを示す。もう一つの例として、図3Bは、実験緩衝液中のより低い塩濃度(<0.4M KCl、例えば、100mM KCl)および再び正の印加電圧と一致する電流プロファイルを示す。

20

【図3C】図3は、融合分子単独またはDNA単独のものと比較して異なる電流プロファイルを有するため、ナノポアを通過する時、標的分子(または粒子)と融合分子との間の結合が検出され得ることを証明する、三つの例分子の代表的な理想的な電流プロファイルを示す。もう一つの例として、図3Cは、実験緩衝液中のより低い塩濃度(<0.4M KCl、例えば、100mM KCl)および負の印加電圧と一致する電流プロファイルを示す。

【図4】図4は、ポリマー足場に異なる結合モチーフを含めることによる本発明のテクノロジーの多重化能力を例示する。そのような多重化は、1個のナノポアまたは複数個のナノポアによって達成され得る。

30

【図5I】図5(I)~(III)は、複数のチャンバーを分離する少なくとも2個の孔を含むナノポア装置を例示する。具体的には、図5(I)は、各孔の独立の電圧調節( $V_1$ または $V_2$ )および電流測定( $I_1$ または $I_2$ )のための二重孔チップおよび二重増幅器電子機器の構成の模式図である。3個のチャンバーA~Cが示され、共通の孔を除き、ボリュームが分離されている。

【図5II】図5(I)~(III)は、複数のチャンバーを分離する少なくとも2個の孔を含むナノポア装置を例示する。図5(II)は、 $I_1$ および $I_2$ を効果的にデカップリングするため、全てのアクセス抵抗を最小化する装置を構築することによって、電氣的に、 $V_1$ および $V_2$ が各ナノポアの抵抗に主に印加される概略図である。

40

【図5III】図5(I)~(III)は、複数のチャンバーを分離する少なくとも2個の孔を含むナノポア装置を例示する。図5(III)は、競合する電圧が調節のために使用されている模式図を示し、矢印は各印加電圧の方向を示す。

【図6】図6a~6cは、2個のチャンバーを接続する1個の孔を有するナノポア装置およびその使用の例結果を例示する。具体的には、図6aは、ナノポア装置の模式図を示す。図6bは、孔を通る二本鎖DNAの通過に起因する遮断イベントを示す代表的な電流トレースを示す。電流振幅シフト量( $I = I_0 - I_B$ )および持続時間 $t_D$ が、通過イベントを定量化するために使用される。図6cは、16分間記録された全ての遮断イベントについての移行時間( $t_D$ )に対する電流量の変化( $I$ )を示す散布図を示す。

50

【図7】図7a~7bは、本発明に従って製作されたナノポア装置の一つの態様において測定された電流トレースを示す。提供された電流トレースは、未結合のdsDNAが0.4M未満のKCl濃度で電流増強イベントを引き起こすことを示している。(図3Cのように)電圧および電流が両方とも負であるため、電流増強は、提供された実験において下方シフトとして出現した。具体的には、-200mVで0.1M KClにおいて10~11nm直径の孔を使用したDNA単独対照実験において、5.6kb dsDNA足場(図7a)は、振幅50~70pA、持続時間10~200マイクロ秒である短時間の電流増強イベントを引き起こす。同様に、48kbラムダDNA(図7b)は、振幅50~70pA、持続時間50~2000マイクロ秒の電流増強イベントを引き起こす。

【図8】図8は、ポリマー足場の模式図を示す。具体的には、図8は、5,631bp dsDNA足場および全部で10個のVspR結合部位の位置を示す。10個のVspR結合部位のうち、5個が、14塩基対配列、3個が異なる18塩基対配列、2個が27塩基対配列のものである。結合部位の間の距離も(塩基対で)示されている。

【図9】図9aおよび9bは、各々、ナノポアの態様の模式図を、それを通過する足場と共に示す。各々は、開示されたナノポア装置の一つの態様によって測定された足場通過に関連した結果として生じる電流プロファイルも示す。図9(a)および9(b)は、DNA足場単独(a)およびVspR結合DNA(b)によるイベントを比較する。具体的には、(a)は、孔を通過する5,631bp dsDNA足場を示す図、および足場が孔を通過する時の代表的な電流増強イベント(100マイクロ秒続く下方50pAシフト)を示す。パート(b)は、孔を通過しているdsDNA足場に結合した複数のVspRを示す図、およびVspR結合足場が孔を通過する時の代表的な電流減弱イベント(1.1ミリ秒続く上方150pAシフト)を示す。-100mVの印加電圧で、オープンチャンネル電流は負であり、従って、(図3Cのように)下方イベントは電流増強イベントに相当し、上方イベントは電流減弱イベントに相当する。ディスプレイ目的のため基線がゼロにされても、シフト方向は保存される。

【図10】図10は、孔を通過するVspR結合足場と一致する電流プロファイルに示されたさらに10個の代表的な電流減弱イベントを示す。全てのシフトが電流減弱と一致しており；基線はディスプレイ目的のためにゼロにされている。

【図11】図11は、直径16~18nmのナノポアを使用した、180mVおよび1M KClでの、5.6kb dsDNA足場およびRecAタンパク質による実験において取得された電流プロファイルに示された2個の代表的な電流イベントを示す。第1のイベントは、孔を通過する未結合のdsDNAまたはおそらく遊離型RecA(または複数個の会合したRecAタンパク質)と一致し、280pA平均電流減弱が70マイクロ秒続いている。第2のイベントは、孔を通過するRecA結合足場と一致し、1.1nA平均電流減弱が2.7ミリ秒続いている。RecA結合イベントは、一般的に、より長い持続時間、より深い遮断を示す。

【図12】図12は、さらに四つの電流プロファイルを示し、各々、孔を通過するRecA結合足場と一致する代表的な電流イベントを示している。

【図13】図13は、本明細書に記載された方法の態様を使用して実施された一つの実験において10分間記録された全部で1385個のイベントを示す散布図およびヒストグラムを示す。示されたグラフにおいて、各イベントについて1個のデータ点が提供される。具体的には、示されたグラフは：(a)ログスケールでの持続時間(秒)に対する最大コンダクタンス(nS)(最大電流シフト(pA)を電圧(mV)で割ったもの)；(b)最大コンダクタンスシフト値の確率ヒストグラム；(c)ログスケールでの持続時間に対する平均コンダクタンス(平均電流シフトを電圧で割ったもの)；(d)平均コンダクタンス値の確率ヒストグラム；および(e)ログスケールでの持続時間の確率ヒストグラム：を示す。

【図14】図14(a~c)は、DNA/RecA複合体およびDNA/RecA複合体上のRecA抗体を検出するナノポア装置からの結果、ならびにこれらの複合体を未結合のDNAおよび遊離型RecAから区別する結果を例示する。具体的には、図14(a)はゲルシフトアッセイである。具体的には、DNA/RecA/mAb ARM191ゲルシフト実験(EMSA)は、以下のレーンを有する：(1)ラダー、一番上のバンド5000bp；(2)RecA標識緩衝液中の足場DNAのみ；(3)DNA/RecA複合体、理論上のRecA結合部位に対するRecAタンパク質1:1；(4)DNA/RecA/Ab複合体、モノクローナルAb ARM191の1:2000希釈物と共にインキュベートされたDNA/Rec；(5)Ab

10

20

30

40

50

標識緩衝液中の足場DNAのみ；および(6) mAb (ARM191) と混合された足場DNA。図14 (b) は、DNA (230pA、0.1ms)、DNA/RecA (390pA、1.1ms)、および可能性のあるDNA/RecA/Ab (860pA、1.5ms) の代表的なイベントを示す。これらのイベントを測定するために使用された孔は相当大きい(直径27~29nm)ため、RecA結合DNAイベント振幅は以前の図(図11~13)より一様に小さい。図14 (c) は、(i)  $|I|$  対  $t_D$  の散布図および(ii) 重ね合わせられた二つの別々の実験についての  $|I|$  の水平確率ヒストグラムを示す。RecA単独対照実験においては、180mVで1M KClにおいて直径20nmの孔を用いて0.5uM RecA (\*) を測定したところ、10分間で767個のイベントが生成された。これらの条件の下で、RecAイベントの0.6%のみが(600pA、0.2ms)の基準を越えることに注意すること。もう一つの実験において、3種の試薬を1M LiClで順に添加した。まず、0.1uM DNA (白四角) を200mVで直径20nmの孔を用いて測定したところ、0.1イベント/秒で402個のイベントが生成された。孔を27nmに拡大した後、1.25nM DNA/RecA (黒丸) を添加したところ、1.44イベント/秒で3387個のイベントが生成された。最後に、1.25nM DNA/RecA/Ab (白丸) を添加したところ、4.49イベント/秒で4953個のイベントが生成された。(600pA、0.2ms)基準を越えるイベントは、DNA単独による0%から、DNA/RecA添加によって5.2%(176個)に、DNA/RecA/Ab添加によって9.8%(485個)に単調に増加した。DNAについて示されたように、RecAはLiClにおいてイベント持続時間を増加させ得るが、イベント振幅が(600pA、0.2ms)基準に向かって有意にシフトする可能性は低い。

10

【図15】図15は、本開示の態様と一致するポリマー足場の模式図を例示する。具体的には、図15 (a) は、アビジン(例えば、ニュートラアビジンおよびまたは1価ストレプトアビジン)との結合のための3個のビオチン化部位を各々有する12残基長ペプチド核酸(PNA)分子に結合するよう操作された、様々な実験において使用された5.6kb dsDNA足場を示す。75個ものアビジンバイオマーカ結合部位を局在化させる、足場上の25個の異なるPNA結合部位を同定する図15 (b) も示される。

20

【図16】図16 (a) ~ (c) は以下のものを例示する：(a) ナノポアを通過する5.6kb dsDNA足場の模式図；(b) ナノポアを通過する遊離型ニュートラアビジンの模式図；(c) ナノポアを通過する(ニュートラアビジンが結合する3個のビオチン部位を全て有する) PNAによって標識されたdsDNAの模式図；および(d) 本開示に従って製作されたナノポア装置における孔の上のチャンパーにおいて測定された対応する電流トレース。図16 (d) において、電流トレースは、DNA単独、ニュートラアビジン単独、およびDNA/PNA/ニュートラアビジン複合体による別々のナノポア実験からの記録された電流における代表的な移行イベントを示す。実施例において詳述されるように、D/P/N実験におけるより深くより長いイベントパターンは、DNA/PNA/ニュートラアビジンイベントとして同定され、DNA単独またはニュートラアビジン単独のイベントとは明白に区別される。

30

【図17】図17 (a) ~ (c) は以下のものを例示する：(a) 200mVでの直径10~11nmの孔による三つの別々の実験についての全ての記録されたイベントの持続時間に対する電流シフト( $|I|$ 対 $t_D$ )の散布図；実験は、(D) 16分間で1301個のイベントを与えた1nMの5.6kb dsDNA単独；(N) 11分間で2589個のイベントを与えた80nMのニュートラアビジン単独；および(D/P/N) 7.3分間で4198個のイベントを与えた60pMのDNA/PNA/Neut複合体を含んでいた。D/P/N亜集団は、NおよびDの対照実験集団とオーバーラップし、DPN実験における大部分のイベントが未結合Nイベントの特徴とマッチする；(b) 三つのデータセットについての  $|I|$  の水平確率ヒストグラム。挿入図は、D/P/Nデータセットから非DNAイベントを除去することを試みた、 $t_D > 0.08ms$ を有する578個のDPNイベントのサブセットについてのヒストグラムを示す(対照から、Nイベントの8%およびDイベントの54%が $t_D > 0.08ms$ を有する)。そのようなDPNイベントは、 $|I|$ の有意な拡大を有し、これらのより長い持続時間のイベントの252個(全部の6%)が2.4 nAを超え、対照からは、18個(0.7%)のNイベントおよび33個(2.5%)のDイベントのみが( $|I|$ 、 $t_D$ ) > (2.4nA、0.08ms)を有する；(c) 以下のレーンを含む、DNA/PNA/ニュートラアビジンゲルシフト実験(EMSA)：(1) サイジングラダー(sizing ladder)、一番上のバンド5000bp；(2) 標識緩衝液中のDNAのみ；(3) DNA/PNA + ビオチンに対して3倍過剰のNeut；(4) DNA/PNA + ビオチン

40

50

に対して7倍過剰のNeut；(5) DNA/PNA + ビオチンに対して16倍過剰のNeut；(6) DNA/PNA + ビオチンに対して36倍過剰のNeut；および(7) 標識緩衝液中のDNA/PNA。

【0031】

図面のいくつかまたは全ては、例証のための模式図であり、従って、それらは、示された要素の実際の相対的なサイズまたは位置を必ずしも示さない。図面は、下記の特許請求の範囲の範囲または意味を限定するためには使用されないことの明確な理解と共に、一つ以上の態様を例示する目的で提示される。

【発明を実施するための形態】

【0032】

詳細な説明

本願の全体において、本文は、本発明の装置、組成物、系、および方法の様々な態様に言及する。記載された様々な態様は、多様な例示的な例を提供するためのものであって、代替種の説明として解釈されるべきでない。むしろ、本明細書に提供される様々な態様の説明は、重複する範囲のものであり得ることに注意すべきである。本明細書に記述された態様は、例示的なものに過ぎず、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0033】

この開示の全体において、様々な刊行物、特許、および公開された特許明細書が、同定する引用によって参照される。これらの刊行物、特許、および公開された特許明細書の開示は、参照によってその全体が本開示に組み入れられる。

【0034】

明細書および特許請求の範囲において使用されるように、単数形(「a」、「an」および「the」)には、そうでないことが前後関係から明白に示されない限り、複数の指示対象が含まれる。例えば、「電極」という用語には、それらの混合物を含む、複数の電極が含まれる。

【0035】

本明細書において使用されるように、「を含む」という用語は、系、装置、および方法が、列挙された成分または工程を含むが、その他を除外しないことを意味するものである。「から本質的になる」とは、系、装置、および方法を定義するために使用された時、組み合わせに対して本質的に重要な他の成分または工程を除外することを意味する。「からなる」とは、他の成分または工程を除外することを意味する。これらの連結用語の各々によって定義された態様は、本発明の範囲内である。

【0036】

数的表記、例えば、距離、サイズ、温度、時間、電圧、および濃度は、範囲を含め、全て、0.1の増分だけ(+)または(-)変動する近似値である。必ずしも明示されないが、全ての数的表記の前に「約」という用語が付くことが理解されるべきである。必ずしも明示されないが、本明細書に記載された成分は、例示的なものに過ぎず、そのようなものの等価物は当技術分野において公知であることも理解されるべきである。

【0037】

本明細書において使用されるように、「内部空間を分離する孔を含む装置」とは、内部空間を複数のボリュームまたはチャンバーへ分離する構造の中に開口部を含む孔を有する装置をさす。

【0038】

分子検出

本開示は、分子の検出および定量化のための方法および系を提供する。さらに、方法および系は、もう一つの分子と結合する分子の親和性を測定するよう構成されてもよい。さらに、そのような検出、定量化、および測定を、多重に実施し、効率を大きく増加させることが可能である。

【0039】

図1は、開示された方法および系の一つの態様の例示を提供する。より具体的には、系は、検出または定量化すべき標的分子105に結合することができるリガンド104を含む。リ

10

20

30

40

50

リガンド104は、ポリマー足場109上の特異的結合モチーフ101に結合することができる（「結合ドメイン」と呼ばれる）結合モエティ103の一部であるかまたはそれに連結されていてよい。リガンド104および結合ドメイン103は、共に、融合分子102を形成する。様々な態様において、融合分子102の両成分（即ち、リガンド104および結合ドメイン103の両方）は、高い親和性および特異性で、それぞれの標的（例えば、それぞれ、標的分子105および結合モチーフ101）に結合する。

#### 【0040】

従って、全てが溶液中に存在する場合、融合分子102は、一方で、結合モチーフ101と結合ドメイン103との間の特異的な認識および結合を通して、ポリマー足場（または単に「ポリマー」）109に結合し、他方で、リガンド104と標的分子105との間の相互作用によって、標的分子105に結合する。そのような結合は、ポリマー109と融合分子102と標的分子105とを含む複合体の形成を引き起こす。

#### 【0041】

形成された複合体は、ナノポア（または単に孔）107およびセンサーを含む装置108を使用して検出され得る。孔107は、二つのポリュームを分離する構造の中のナノスケールまたはマイクロスケールの開口部である。センサー107は、孔107の内部もしくは近隣に位置していてもよいし、または二つのポリュームの中の他の場所に位置していてもよい。センサーは、孔107を通過する物体を同定するよう構成される。例えば、いくつかの態様において、センサーは、孔107を通過する物体の指標となる測定可能なパラメーターの変化を検出することによって、孔107を通過する物体を同定する。この装置は、本明細書全体において「ナノポア装置」と呼ばれる。いくつかの態様において、ナノポア装置108は、ポリマー109を孔107を介してあるポリュームからもう一つのポリュームへ移動させるための、電源に接続された電極のような手段を含む。ポリマー109は、荷電していてもよいしまたは電荷を含有するよう修飾されてもよく、そのような手段の一つの例は、ポリマー109の移動を容易にし調節するため、孔107を介した電位または電圧を生成する。好ましい態様において、センサーは、物体の通過を検出しかつ孔107を介した電圧を提供するよう構成された1対の電極を含む。この態様において、電位固定またはパッチクランプが、孔を介した電圧の供給および孔を通る電流の測定を同時に行うため使用される。

#### 【0042】

形成された複合体を含む試料がナノポア装置108に負荷される時、ナノポア装置108はポリマー109を孔107に通過させるよう構成され得る。結合モチーフ101が孔107の内部にあるかまたは孔107に隣接している時、モチーフ101の結合状態がセンサーによって検出され得る。

#### 【0043】

結合モチーフの「結合状態」とは、本明細書において使用されるように、結合モチーフが対応する結合ドメインを含む融合分子に結合しているか否か、および融合分子が標的分子にも結合しているか否かをさす。本質的に、結合状態は、以下の三つの可能性のある状態のうちの一つであり得る：(i) 結合モチーフが、遊離型であって、融合分子に結合していない（図3中の305を参照すること）；(ii) 標的分子に結合していない融合分子に結合モチーフが結合している（図3中の306を参照すること）；または(iii) 標的分子に結合している融合分子に結合モチーフが結合している（図3中の307を参照すること）。

#### 【0044】

結合モチーフの結合状態の検出は、様々な方法によって実施され得る。一つの局面において、各状態における結合モチーフの異なるサイズのため、結合モチーフが孔を通過する時、異なるサイズが、孔を介した異なる電流をもたらす。一つの局面において、図3Aに示されるように、正の電圧が印加され実験緩衝液中のKCl濃度が0.4Mを越えている場合、305、306、および307が孔を通過する時に測定される電流シグナル301は、それぞれ、シグナル302、303、および304である。KCl濃度が0.4Mを超えており、正の電流の低下を引き起こす時、三つのイベント型は、全て、電流減弱を受ける。三つのシグナル302、303、および304は、電流シフトの量（高さ）および/もしくは電流シフトの持続時間（幅）によって

10

20

30

40

50

、または三つのイベント型を区別するシグナルのその他の特色によって相互に区別され得る。304は一般的に302および303と異なるが、302および303は一般的に相互に異なる可能性もあり、その場合には、通過する分子に結合したバイオマーカーの頑丈な検出がさらに達成され得る。もう一つの局面において、図3Bに示されるように、正の電圧が印加され実験緩衝液中のKCl濃度が0.4M未満である場合、312、313、および314が孔を通過する時に測定される電流シグナル308は、それぞれ、シグナル309、310、および311である。dsDNA単独の通過は、0.4M未満のKCl濃度では、電流増強イベント(309)を引き起こす。これは、Smeets, Ralph MM, et al. 「固体ナノポアを通したイオン輸送およびDNA移行の塩依存性 (Salt dependence of ion transport and DNA translocation through solid-state nanopores)」 Nano Letters 6.1(2006):89-95によって発表された研究において示された。従って、シグナル309は、一般的に異なる電流シフトの量(高さ)および/もしくは電流シフトの持続時間(幅)を有する三つのシグナルに加えて、オープンチャネル基線電流レベル(308)に対するイベント振幅方向(極性)によって、または三つのイベント型を区別するシグナルのその他の特色によって、310および311から区別され得る。もう一つの局面において、図3Cに示されるように、負の電圧が印加され実験緩衝液中のKCl濃度が0.4M未満である場合、319、320、および321が孔を通過する時に測定される負の電流シグナル315は、それぞれ、シグナル316、317、および318である。正の電圧によるシグナル309、310、および311と比較して、シグナル316、317、および318は、印加される電圧が反対(負)の極性を有するため、反対の極性を有する。図3の態様の全ての局面において、センサーは、電源に接続された電極を含み、電流を検出することができる。従って、電極の一方または両方が「センサー」として役立つ。この態様において、電位固定またはパッチクランプが、孔を介した電圧の供給および孔を通る電流の測定を同時に行うため、使用される。

10

20

#### 【0045】

いくつかの局面において、図1に示されるような薬剤106が、検出を助けるために複合体に付加される。この薬剤は、標的分子またはリガンド/標的分子複合体に結合することができる。一つの局面において、薬剤は、検出を容易にするため、負または正の電荷を含む。もう一つの局面において、薬剤は、検出を容易にするため、サイズを増加させる。もう一つの局面において、薬剤は、フルオロフォアのような検出可能標識を含む。

#### 【0046】

この状況において、状態(iii)の同定が、ポリマー-融合分子-標的分子複合体が形成されたことを示す。換言すると、標的分子が検出される。

30

#### 【0047】

##### 粒子検出

本開示は、いくつかの局面において、タンパク質、タンパク質凝集物、オリゴマー、もしくはタンパク質/DNA複合体のような粒子、またはウイルス、細菌、および細胞凝集物を含む、細胞および微生物の検出、定量化、および測定のための方法および系も提供する。

#### 【0048】

いくつかの局面において、装置を二つのボリュームへ分離する構造の中の孔は、ウイルス、細菌、細胞、または細胞凝集物のような粒子が通過することを可能にするサイズを有する。リガンドが結合ドメインおよび結合モチーフを通して独特の標的粒子およびポリマー足場に結合して複合体を形成することができるよう、検出または定量化すべき標的粒子に結合することができるリガンドが、ナノポア装置内の溶液に含まれ得る。多くのそのような粒子が、リガンドによって特異的に認識され得る独特のマーカーを表面上に有する。例えば、腫瘍細胞は、細胞表面上に発現された腫瘍抗原を有する場合があります、細菌細胞は、細胞膜上に付着した内毒素を有する場合があります。

40

#### 【0049】

ナノポア装置へ負荷された溶液の中の形成された複合体が、ポリマー足場と共に移動して孔を通過する時、本開示中に別記された分子検出法に類似した方法を使用して、リガ

50

ドに結合した標的微生物が同定され得るよう、孔の内部または近隣にある複合体の結合状態が検出され得る。

【0050】

ポリマー足場

本発明のテクノロジーにおいて使用するために適当なポリマー足場は、ナノポア装置へ負荷され、孔を一方の端から他方の端へ貫通することができる足場である。

【0051】

ポリマーの非限定的な例には、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、またはペプチド核酸(PNA)、デンドリマー、および直鎖化されたタンパク質またはペプチドのような核酸が含まれる。いくつかの局面において、DNAまたはRNAは、一本鎖もしくは二本鎖であってもよいし、またはDNA/RNAハイブリッド分子であってもよい。

10

【0052】

一つの局面において、ポリマーは合成であるかまたは化学的に修飾されている。化学的修飾は、ポリマーの安定化、可動性を増加させるためのポリマーへの電荷の付加、直鎖性の維持、または結合特異性の付加もしくは修飾を助けることができる。いくつかの局面において、化学的修飾は、アセチル化、メチル化、SUMO化、酸化、リン酸化、グリコシル化、またはビオチンの付加である。

【0053】

いくつかの局面において、ポリマーは荷電している。DNA、RNA、PNA、およびタンパク質は、典型的には、生理学的条件の下で荷電している。そのようなポリマーを、帯びている電荷を増加させるかまたは減少させるため、さらに修飾することができる。他のポリマーを、電荷を導入するために修飾してもよい。ポリマー上の電荷は、ポリマーがナノポア装置の孔を通過するよう駆動するために有用であり得る。例えば、荷電ポリマーは、孔を介した電圧の適用によって、孔を介して移動することができる。

20

【0054】

いくつかの局面において、ポリマーに電荷を導入する時、ポリマーの末端に電荷を付加することができる。いくつかの局面において、電荷は、ポリマー上に分散している。

【0055】

一つの態様において、荷電ポリマーの各単位は、選択されたpHにおいて荷電している。もう一つの態様において、荷電ポリマーは、静電気力によって孔へ引き込まれるために十分な荷電単位を含む。例えば、本明細書に記載された装置および方法において使用されるために十分なエンティティを含有しているペプチドは、選択されたpHにおいて荷電することができる(リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸等)。同様に、メタクリル酸およびエチレンを含むコポリマーは、本明細書に記載された装置および方法において使用されるために十分なメタクリル酸残基の荷電カルボキシレート基が存在する場合、本発明の目的のための荷電ポリマーである。一つの態様において、荷電ポリマーは、ポリマーの一方の末端またはその付近に1個以上の荷電単位を含む。もう一つの態様において、荷電ポリマーは、ポリマーの両方の末端またはその付近に1個以上の荷電単位を含む。コポリマーの一例は、タンパク質の周囲に巻き付いたDNA(例えば、DNA/ヌクレオソーム)である。コポリマーのもう一つの例は、N末端およびC末端においてDNAにコンジュゲートされた直鎖化されたタンパク質である。

30

40

【0056】

結合モチーフおよび結合ドメイン

ポリマー足場のような核酸およびポリペプチドについて、結合モチーフは、結合ドメインによって認識可能なヌクレオチド配列またはペプチド配列であり得る。結合ドメインはタンパク質である必要はないが、いくつかの態様において、結合ドメインは、タンパク質の機能性の一部分を形成するペプチド配列である。核酸については、例えば、プロモーター、エンハンサー、チミンチミンダイマーのような配列(モチーフ)、ならびに湾曲したヌクレオチドおよび一本鎖破壊を含む配列のようなある種の二次構造を特異的に認識しそれに結合するタンパク質が存在する。

50

## 【 0 0 5 7 】

いくつかの局面において、結合モチーフは、結合ドメインによる認識および結合を引き起こすかまたは容易にする化学的修飾を含む。例えば、メチル化されたDNA配列は、転写因子、DNAメチルトランスフェラーゼ、またはメチル化修復酵素によって認識され得る。他の態様において、ビオチンが組み入れられ、アビジンファミリーメンバーによって認識され得る。そのような態様において、ビオチンが結合モチーフを形成し、アビジンまたはアビジンファミリーメンバーが結合ドメインである。

## 【 0 0 5 8 】

ヌクレオチド結合モチーフを特異的に認識することができる分子、特に、タンパク質は、当技術分野において公知である。例えば、ヘリックスターンヘリックス、ジンクフィンガー、ロイジンジッパー、ウイングドヘリックス、ウイングドヘリックスターンヘリックス、ヘリックスループヘリックス、およびHMGボックスのようなタンパク質ドメインは、ヌクレオチド配列に結合し得ることが公知である。

10

## 【 0 0 5 9 】

いくつかの局面において、結合ドメインは、ロックド核酸 (LNA)、全ての型のタンパク質核酸 (例えば、ビスPNA、PNA)、TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR、またはアプタマー (例えば、DNA、RNA、タンパク質、もしくはそれらの組み合わせ) であり得る。

## 【 0 0 6 0 】

いくつかの局面において、結合ドメインは、DNA結合タンパク質 (例えば、ジンクフィンガータンパク質)、抗体断片 (Fab)、化学的に合成された結合剤 (例えば、PNA、LNA、TALEN、もしくはCRISPR)、または合成ポリマー内の化学的修飾 (即ち、反応モエティ) (例えば、チオレート、ビオチン、アミン、カルボキシレート) のうちの一つ以上である。

20

## 【 0 0 6 1 】

標的分子 / 粒子およびリガンド

本発明のテクノロジーにおいて、標的分子または標的粒子は、ポリマー足場に結合する融合分子の中のリガンドとの結合によって検出されるかまたは定量化される。標的分子または標的粒子および対応する結合リガンドは、相互に認識し結合することができる。粒子については、リガンドが結合するために適当な表面分子または表面マーカーが存在し得る (従って、マーカーおよびリガンドが結合対を形成する)。

30

## 【 0 0 6 2 】

標的分子または粒子上の分子との結合を可能にする結合対の例には、抗原 / 抗体 (または抗体断片) ; ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子、または細胞認識分子 / 受容体 ; およびイオンまたは元素 / キレート剤またはカルモジュリンのようなイオン結合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。結合対は、相補配列を有する一本鎖核酸、酵素と基質、相互に結合するタンパク質複合体のメンバー、酵素と補助因子、酵素とその1種以上の阻害剤 (アロステリックもしくはその他)、核酸 / タンパク質、またはシステインによって束縛されたペプチドによって検出可能な細胞もしくはタンパク質であってもよい。

40

## 【 0 0 6 3 】

いくつかの態様において、リガンドは、タンパク質、タンパク質足場、ペプチド、アプタマー (DNAもしくはタンパク質)、核酸 (DNAもしくはRNA)、抗体断片 (Fab)、化学的に合成された分子、化学的に反応性の官能基、または標的分子と結合対を形成するその他の適当な構造である。

## 【 0 0 6 4 】

従って、タンパク質、ペプチド、核酸、化学化合物、イオン、および元素のような、検出または定量化の必要がある任意の標的分子が、対応する結合リガンドを見出すことができる。大部分のタンパク質および核酸について、抗体もしくは相補配列またはアプタマーを容易に調製することができる。

50

## 【0065】

同様に、タンパク質複合体およびタンパク質凝集物、タンパク質/核酸複合体、断片化されたまたは完全に組み立てられたウイルス、細菌、細胞、および細胞凝集物のような粒子のため、(抗体およびアプタマーのような)結合リガンドを、容易に見出すかまたは調製することができる。

## 【0066】

## 融合分子

「融合分子」とは、二つの機能性の領域、結合ドメインおよびリガンドを含有している分子または複合体を意味するものとする。結合ドメインは、ポリマー足場上の結合モチーフに結合することができ、リガンドは標的分子に結合することができる。

10

## 【0067】

いくつかの局面において、融合分子は、結合または力によって二つの領域を連結することによって調製される。そのような結合または力は、例えば、共有結合、水素結合、イオン結合、金属結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、または平面スタッキング相互作用であり得る。

## 【0068】

いくつかの局面において、融合タンパク質のような融合分子を、組換えコーディングヌクレオチドから単一分子として発現させることができる。いくつかの局面において、融合分子は、本発明のテクノロジーにおいて使用するために適当な結合ドメインおよびリガンドを有する天然分子である。

20

## 【0069】

結合ドメインをリガンドと接続して融合分子を形成させるため、多くのオプションが存在する。例えば、遊離アミンのような官能性リンカーを通じた化学的カップリング、カルボキシレートカップリング、チオレート化学、ヒドラジド化学、またはアジド(クリック)化学を介して成分が接続されてもよいし、または結合ドメインおよびリガンドが一つの連続的な転写物を形成してもよい。

## 【0070】

図2は、図1に示される系のより具体的な態様を例示する。図2において、融合分子は、ジンクフィンガータンパク質またはジンクフィンガードメイン202とヒト免疫不全ウイルス(HIV)エンベロープタンパク質203とを含むキメラタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質202は、ポリマー足場、二本鎖DNA 201上の適当なヌクレオチド配列に結合することができる; HIVエンベロープタンパク質203は、検出のため、生物学的試料(例えば、患者由来の血液試料)の中に存在し得る抗HIV抗体204に結合することができる。

30

## 【0071】

二本鎖DNA 201が、ナノポア装置206の孔205を通過する時、ナノポア装置206は、融合分子がDNA 201に結合しているか否か、および結合した融合分子が抗HIV抗体204に結合しているか否かを検出することができる。

## 【0072】

## 結合親和性の測定

本発明のテクノロジーは、2個の分子の間の結合親和性を測定し、その他の結合動力学を決定するためにも使用され得る。例えば、結合モチーフがナノポア装置の孔を通過した後、結合モチーフが再び孔を通過することができるよう、装置を(下記のように)ポリマー足場の移動方向を逆転させるよう再構成することができる。

40

## 【0073】

結合モチーフが再び孔に進入する前に、ナノポア装置へ負荷される試料の条件を変化させることができる。例えば、条件の変化は、試料からの標的分子の除去、標的分子またはリガンドと結合について競合する薬剤の添加、およびpH、塩、または温度の変化のうちの一つ以上であり得る。

## 【0074】

変化させられた条件の下で、結合モチーフを再び孔を通過させることができる。従って

50

、条件の変化が結合にいかに関与するかを決定するため、標的分子が未だ融合分子に結合しているか否かを検出することができる。

【0075】

いくつかの局面において、結合モチーフが孔に入った後、条件を変化させる間、それをそこに保持し、従って、条件の変化の影響をインサイチューで測定することができる。

【0076】

あるいはまたはさらに、ポリマー足場は、複数個の結合モチーフを含んでいてもよく、結合モチーフは、各々、一つ以上の特異的な標的分子または標的粒子に結合することができる融合分子に結合することができる。各結合モチーフが孔を通過する間、試料の条件を変化させ、リガンドおよび標的分子または標的粒子との間の結合の変化の継続的な検出を可能にすることができる。

10

【0077】

多重化

いくつかの局面において、上記のように同一の種類の結合モチーフを複数個含むのではなく、ポリマー足場は、各々異なる対応する結合ドメインを有する複数の型の結合モチーフを含んでいてもよい。そのような態様において、試料は、異なる対応する結合ドメインのうちの一つと、異なる標的分子または標的微生物のためのリガンドとを各々含む、複数の型の融合分子を含むことができる。

【0078】

多重化の付加的方法には、各々異なる融合分子と会合している異なる足場分子のコレクションを試験においてアッセイすることを含む。どの標的分子が溶液中にあるかを決定するため、どの融合分子がその特定の足場に結合するかをセンサーが同定することができるよう、同一の型の足場を標識する。これは、例えば、変動する長さまたはサイズのポリエチレングリコール分子によって各型の足場をバーコード化することによって達成され得る。

20

【0079】

そのような環境では、複数の型の標的分子もしくは標的微生物（例えば、細菌もしくはウイルス）または標的細胞（例えば、循環腫瘍細胞）を検出するために、単一のポリマー足場を使用することができる。図4は、そのような方法を例示する。ここでは、複数の結合モチーフ：2コピーの第1の結合モチーフ404、2コピーの第2の結合モチーフ405、および1コピーの第3の結合モチーフ406を含む二本鎖DNA 403が、ポリマー足場として使用されている。

30

【0080】

DNAが2個の同軸の孔401および402を有するナノポア装置407を通過する時、結合モチーフ404の両方のコピーが対応する標的分子に結合しており、結合モチーフ405の両方のコピーが対応する標的分子に結合しており；結合モチーフ406に結合した融合分子が対応する標的分子に結合していない、結合モチーフの各々の結合状態が検出される。

【0081】

このように、単一のポリマーおよび単一のナノポア装置によって、本発明のテクノロジーは、複数の異なる標的分子または標的微細構造（例えば、凝集物、微生物、または細胞）を同時に検出することができる。さらに、何コピーの結合モチーフが標的分子または標的微生物に結合しているかを決定し、結合に影響する条件を補正することによって、系はより詳細な結合動力学の情報を入手することができる。

40

【0082】

ナノポア装置

提供されるナノポア装置は、装置の内部空間を二つのボリュームへ分離する構造の中の開口部を形成する少なくとも1個の孔、および（例えば、物体の指標となるパラメーターの変化を検出することによって）孔を通過する物体を同定するよう構成された少なくとも1個のセンサーを含む。

【0083】

50

ナノポア装置内の孔は、ナノスケールまたはマイクロスケールである。一つの局面において、各孔は、低分子もしくは高分子または微生物が通過することを可能にするサイズを有する。一つの局面において、各孔は、少なくとも直径約1nmである。あるいは、各孔は、少なくとも直径約2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、または100nmである。

【0084】

一つの局面において、孔は、大きくとも直径約100nmである。あるいは、孔は、大きくとも直径約95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、または10nmである。

10

【0085】

いくつかの局面において、各孔は、少なくとも直径約100nm、200nm、500nm、1000nm、2000nm、3000nm、5000nm、10000nm、20000nm、または30000nmである。一つの局面において、孔は、大きくとも直径約100000nmである。あるいは、孔は、大きくとも直径約50000nm、40000nm、30000nm、20000nm、10000nm、9000nm、8000nm、7000nm、6000nm、5000nm、4000nm、3000nm、2000nm、または1000nmである。

【0086】

一つの局面において、孔は、約1nm～約100nm、あるいは約2nm～約80nmまたは約3nm～約70nmまたは約4nm～約60nmまたは約5nm～約50nmまたは約10nm～約40nmまたは約15nm～約30nmである直径を有する。

20

【0087】

いくつかの局面において、ナノポア装置内の孔は、大きい微生物または細胞の検出のため、より大きいスケールのものである。一つの局面において、各孔は、大きい細胞または微生物が通過することを可能にするサイズを有する。一つの局面において、各孔は、少なくとも直径約100nmである。あるいは、各孔は、少なくとも直径約200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1000nm、1100nm、1200nm、1300nm、1400nm、1500nm、1600nm、1700nm、1800nm、1900nm、2000nm、2500nm、3000nm、3500nm、4000nm、4500nm、または5000nmである。

【0088】

一つの局面において、孔は、大きくとも直径約100,000nmである。あるいは、孔は、大きくとも直径約90,000nm、80,000nm、70,000nm、60,000nm、50,000nm、40,000nm、30,000nm、20,000nm、10,000nm、9000nm、8000nm、7000nm、6000nm、5000nm、4000nm、3000nm、2000nm、または1000nmである。

30

【0089】

一つの局面において、孔は、約100nm～約10000nm、あるいは約200nm～約9000nmまたは約300nm～約8000nmまたは約400nm～約7000nmまたは約500nm～約6000nmまたは約1000nm～約5000nmまたは約1500nm～約3000nmである直径を有する。

【0090】

いくつかの局面において、ナノポア装置は、ポリマー足場を孔を介して移動させる手段および/または孔を通過する物体を同定する手段をさらに含む。さらなる詳細は、以下に提供され、2孔装置に関して記載される。

40

【0091】

1孔ナノポア装置と比較して、2孔装置は、孔を介したポリマーの移動の速度および方向の良好な調節を提供するよう、より容易に構成され得る。

【0092】

一つの態様において、ナノポア装置は、各々、少なくとも1個の孔を通して隣接チャンパーと連絡している、複数個のチャンパーを含む。これらの孔のうち、2個の孔、即ち、第1の孔および第2の孔は、ポリマーの少なくとも一部分が、第1の孔から第2の孔へ移動することを可能にするよう置かれる。さらに、装置は、移動中にポリマーを同定することができるセンサーを含む。一つの局面において、同定は、ポリマーの個々の成分を同定する

50

ことを必要とする。もう一つの局面において、同定は、ポリマーに結合した融合分子および/または標的分子を同定することを必要とする。単一のセンサーが利用される時、単一のセンサーは、孔を介したイオン電流を測定するため、孔の両端に置かれた2個の電極を含み得る。もう一つの態様において、単一のセンサーは電極以外の成分を含む。

【0093】

一つの局面において、装置は、2個の孔を通して接続された3個のチャンバーを含む。3チャンバー装置の片側または3個のチャンバーのうちの2個の間に1個以上の付加的なチャンバーを含めるため、3個より多いチャンバーを含む装置を容易に設計することができる。同様に、2個より多い孔を、チャンバーを接続するため、装置に含めることができる。

【0094】

一つの局面において、複数のポリマーが1個のチャンバーから次のチャンバーへ同時に移動することを可能にするため、2個の隣接するチャンバーの間に2個以上の孔が存在してもよい。そのような多孔設計は、装置におけるポリマー分析のスループットを増強することができる。

【0095】

いくつかの局面において、装置は、1個のチャンバーからもう1個のチャンバーへポリマーを移動させる手段をさらに含む。一つの局面において、移動によって、第1の孔および第2の孔の両方に同時にポリマーが負荷される。もう一つの局面において、手段は、さらに、同一の方向への両方の孔を通したポリマーの移動を可能にする。

【0096】

例えば、3チャンバー2孔装置（「2孔」装置）において、チャンバーの各々は、チャンバーの間の孔の各々に別々の電圧を印加することができるよう、電源との接続のための電極を含有していてもよい。

【0097】

本開示の一つの態様によると、上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーを含む装置が提供される。上チャンバーは第1の孔を通して中央チャンバーと連絡しており、中央チャンバーは第2の孔を通して下チャンバーと連絡している。そのような装置は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる二重孔装置（Dual-Pore Device）という名称のUS 2013-0233709に以前に開示された寸法またはその他の特徴のいずれかを有し得る。

【0098】

いくつかの態様において、図5(1)に示されるように、装置は、上チャンバー505（チャンバーA）、中央チャンバー504（チャンバーB）、および下チャンバー503（チャンバーC）を含む。チャンバーは、各々別々の孔（511または512）を有する2枚の分離する層または膜（501および502）によって分離されている。さらに、各チャンバーは、電源との接続のための電極（521、522、または523）を含有している。上チャンバー、中央チャンバー、および下チャンバーという注釈は、相対的な関係にあり、例えば、上チャンバーがグラウンドに対して中央チャンバーもしくは下チャンバーより上に置かれていること、またはその逆を示すものではない。

【0099】

孔511および512は、各々独立に、低分子もしくは高分子または微生物が通過することを可能にするサイズを有する。一つの局面において、各孔は、少なくとも直径約1nmである。あるいは、各孔は、少なくとも直径約2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、または100nmである。

【0100】

一つの局面において、孔は、大きくとも直径約100nmである。あるいは、孔は、大きくとも直径約95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、または10nmである。

【0101】

10

20

30

40

50

一つの局面において、孔は、約1nm～約100nm、あるいは約2nm～約80nmまたは約3nm～約70nmまたは約4nm～約60nmまたは約5nm～約50nmまたは約10nm～約40nmまたは約15nm～約30nmである直径を有する。

【0102】

他の局面において、各孔は、少なくとも直径約100nm、200nm、500nm、1000nm、2000nm、3000nm、5000nm、10000nm、20000nm、または30000nmである。一つの局面において、各孔は、直径50,000nm～100,000nmである。一つの局面において、孔は、大きくとも直径約100000nmである。あるいは、孔は、大きくとも直径約50000nm、40000nm、30000nm、20000nm、10000nm、9000nm、8000nm、7000nm、6000nm、5000nm、4000nm、3000nm、2000nm、または1000nmである。

10

【0103】

いくつかの局面において、孔は実質的に丸い形を有する。「実質的に丸い」とは、本明細書において使用されるように、少なくとも約80%または90%円柱形である形をさす。いくつかの態様において、孔は、正方形、長方形、三角形、楕円形、または六角形である。

【0104】

孔511および512は、各々独立に、深さ（即ち、隣接した二つのポリユームの間に及ぶ孔の長さ）を有する。一つの局面において、各孔は、少なくとも約0.3nmである深さを有する。あるいは、各孔は、少なくとも約0.6nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、または90nmである深さを有する。

20

【0105】

一つの局面において、各孔は、大きくとも約100nmである深さを有する。あるいは、深さは、大きくとも約95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、または10nmである。

【0106】

一つの局面において、孔は、約1nm～約100nm、あるいは約2nm～約80nmまたは約3nm～約70nmまたは約4nm～約60nmまたは約5nm～約50nmまたは約10nm～約40nmまたは約15nm～約30nmである深さを有する。

【0107】

いくつかの局面において、ナノポアは、膜の端から端まで及ぶ。例えば、孔は、脂質二重層膜に挿入されたタンパク質チャネルであってもよいし、または二酸化ケイ素、窒化ケイ素、グラフェン、もしくはこれらもしくはその他の材料の組み合わせから形成された層のような固体基質の穿孔、エッチング、またはその他の方法での孔の形成によって操作されたものであってもよい。いくつかの局面において、ナノポアの長さまたは深さは、そうでなければ別々である二つのポリユームを接続するチャネルを形成するために十分に大きい。いくつかのそのような局面において、各孔の深さは、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、または900nmより大きい。いくつかの局面において、各孔の深さは、大きくとも2000nmまたは1000nmである。

30

【0108】

一つの局面において、孔は、約10nm～約1000nmの距離だけ離れている。いくつかの局面において、孔の間の距離は、1000nm、2000nm、3000nm、4000nm、5000nm、6000nm、7000nm、8000nm、または9000nmより大きい。いくつかの局面において、孔は、大きくとも30000nm、20000nm、または10000nmだけ離れている。一つの局面において、距離は、少なくとも約10nm、あるいは少なくとも約20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、または300nmである。もう一つの局面において、距離は、大きくとも約1000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、250nm、200nm、150nm、または100nmである。

40

【0109】

さらにもう一つの局面において、孔の間の距離は、約20nm～約800nm、約30nm～約700nm、約40nm～約500nm、または約50nm～約300nmである。

50

## 【0110】

2個の孔は、チャンパー間の流体連絡を可能にし、規定されたサイズおよび間隔を有する限り、任意の位置に配置され得る。一つの局面において、孔は、それらの間に直接の妨害がないように置かれる。さらに、一つの局面において、孔は、図5(1)に例示されるように、実質的に同軸である。

## 【0111】

一つの局面において、図5(1)に示されるように、装置は、それぞれ、チャンパー503、504、および505の中の電極521、522、および523を通して、1個以上の電源に接続される。いくつかの局面において、電源は、各孔に電圧を供給し、各孔を通る電流を独立に測定することができる電位固定またはパッチクランプを含む。これに関して、電源および電極の構成は、中央チャンパーを両方の電源のための共通グランドに設定することができる。一つの局面において、電源は、上チャンパー505(チャンパーA)と中央チャンパー504(チャンパーB)との間に第1の電圧 $V_1$ を印加し、中央チャンパー504と下チャンパー503(チャンパーC)との間に第2の電圧 $V_2$ を印加するよう構成される。

10

## 【0112】

いくつかの局面において、第1の電圧 $V_1$ および第2の電圧 $V_2$ は、独立に調整可能である。一つの局面において、中央チャンパーは、二つの電圧に対するグランドであるよう調整される。一つの局面において、中央チャンパーは、孔の各々と中央チャンパー内の電極との間にコンダクタンスを提供するための媒体を含む。一つの局面において、中央チャンパーは、孔の各々と中央チャンパー内の電極との間に抵抗を提供するための媒体を含む。そのような抵抗をナノポア抵抗に比べて十分に小さく維持することは、電圧の独立の調整のために役立つ、孔を介した二つの電圧および電流のデカップリングのために有用である。

20

## 【0113】

電圧の調整は、チャンパー内の荷電粒子の移動を調節するために使用され得る。例えば、両方の電圧が同一の極性に設定される時、適切に荷電した粒子は、上チャンパーから中央チャンパー、そして下チャンパーへ、または反対に、連続的に移動することができる。いくつかの局面において、二つの電圧が反対の極性に設定される時、荷電粒子は、上チャンパーまたは下チャンパーのいずれかから中央チャンパーへ移動し、そこに維持され得る。

## 【0114】

装置における電圧の調整は、両方の孔と同時に交差するために十分に長い荷電ポリマーのような高分子の移動を調節するために特に有用であり得る。そのような局面において、分子の移動の方向および速度は、下記のように電圧の相対的な大きさおよび極性によって調節され得る。

30

## 【0115】

装置は、液体試料、特に、生物学的試料の保持のために適当な材料および/またはナノファブリケーションのために適当な材料を含有していることができる。一つの局面において、そのような材料には、以下に限定されないが、ケイ素、窒化ケイ素、二酸化ケイ素、グラフェン、カーボンナノチューブ、 $TiO_2$ 、 $HfO_2$ 、 $Al_2O_3$ 、またはその他の金属層、またはこれらの材料の任意の組み合わせのような誘電性材料が含まれる。いくつかの局面において、例えば、厚さ約0.3nmの1枚のグラフェン膜が、孔保持膜として使用され得る。

40

## 【0116】

マイクロ流体装置であり、2孔マイクロ流体チップ実装を収容する装置は、多様な手段および方法によって作成され得る。2枚の平行の膜を含むマイクロ流体チップの場合、2個の同心の孔を形成するため、シングルビームによって両方の膜を同時に穿孔することができるが、適当なアライメント技術と協力して膜の各側に異なるビームを使用することも可能である。一般に、ハウジングは、チャンパーA~Cの密封された分離を確実にする。一つの局面において、図5(11)に示されるように、ハウジングは、各電圧が各孔に主に印加されることを確実にするため、電圧電極521、522、および523とナノポア511および512との間に最小のアクセス抵抗を提供するであろう。

50

## 【0117】

一つの局面において、装置は、スペーサーによって接続された2枚の平行の膜を含む（「二重コアチップ」と表示される）マイクロ流体チップを含む。各膜は、膜の中心を通るシングルビームによって穿孔された孔を含有している。さらに、装置は、好ましくは、チップのためのテフロン（登録商標）ハウジングを有する。ハウジングは、チャンバーA~Cの密封された分離を確実にし、各電圧が各孔に主に印加されることを確実にするため、電極についての最小のアクセス抵抗を提供する。

## 【0118】

より具体的には、孔保持膜は、厚さ5~100nmのケイ素ウィンドウ、窒化ケイ素ウィンドウ、または二酸化ケイ素ウィンドウを有する透過型電子顕微鏡（TEM）グリッドによって作成され得る。SU-8、フォトレジスト、PECVD酸化物、ALD酸化物、ALDアルミナのような絶縁体、またはAg、Au、もしくはPtのような蒸着金属材料を使用した、膜間のチャンバーBのそうでなければ水性である部分のうちの小容量を占めるスペーサーを、膜を分離するために使用することができる。ホルダーは、チャンバーBの最大容積画分を含む水浴の中に置かれる。チャンバーAおよびCは、膜密封をもたらす（低いアクセス抵抗のための）より大きい直径のチャンネルによってアクセス可能である。

10

## 【0119】

集束電子またはイオンビームを、天然にアラインさせて、膜を通る孔を穿孔するために使用することができる。各層に正確なビーム集束を適用することによって、孔をより小さいサイズに彫刻（縮小）することもできる。所定の方法について可能な穿孔の深さおよび膜の厚さを考慮して、2枚の膜に一对の孔を穿孔するため、単一のナノポア穿孔法を使用することもできる。膜の厚さをさらに精巧にするため、規定された深さにマイクロポアを予め穿孔し、次いで、膜の残りにナノポアを穿孔することも可能である。

20

## 【0120】

もう一つの局面において、ハイブリッド孔を形成させるための固体ナノポアへの生物学的ナノポアの挿入を、2孔法において、一方または両方の孔において使用することができる。生物学的孔は、イオン電流測定 of 感度を増加させることができ、一本鎖ポリヌクレオチドのみが、例えば、配列決定のため、2孔装置において、捕獲され調節されることになっている時、有用である。

30

## 【0121】

装置の孔に存在する電圧によって、荷電分子は、チャンバー間の孔を通過して移動することができる。移動の速度および方向は、電圧の大きさおよび極性によって調節され得る。さらに、二つの電圧の各々を独立に調整することができるため、荷電分子の移動の方向および速度は、各チャンバーにおいて微調節され得る。

## 【0122】

一例は、両方の孔の深さ+2孔の間の距離を含む合計距離より長い長さを有するDNAのような荷電ポリマー足場に関する。例えば、1000bp dsDNAは長さ約340nmであり、20nm離れている2個の深さ10nmの孔が及ぶ40nmより実質的に長いであろう。第1工程において、ポリヌクレオチドを上チャンバーまたは下チャンバーのいずれかに負荷する。約7.4のpHでの生理学的条件下での負の電荷のため、ポリヌクレオチドは、電圧が印加された孔を介して移動することができる。従って、第2工程において、ポリヌクレオチドを両方の孔を介して連続的に移動させるため、同一の極性および同一または類似の大きさで、二つの電圧を孔に印加する。

40

## 【0123】

ほぼ、ポリヌクレオチドが第2の孔に到達する時間に、電圧の一方または両方を変化させることができる。2孔の間の距離は、ポリヌクレオチドの長さより短くなるよう選択されているため、ポリヌクレオチドは、第2の孔に到達した時、第1の孔にもある。従って、第1の孔での電圧の極性の急速な変化は、図5(III)に例示されるように、第2の孔からポリヌクレオチドを引き抜く力を生成するのである。

## 【0124】

50

2個の孔が同一の電圧-力影響を有し、 $|V_1|=|V_2|+V$ であると仮定すると、値  $V>0$  (または $<0$ ) は、 $V_1$  (または $V_2$ ) の方向の補正可能な運動のため、調整され得る。実際、各孔での電圧によって誘導された力は、 $V_1=V_2$ と同一でないであろうが、較正実験によって、所定の2孔チップについて等しい引力をもたらすであろう適切なバイアス電圧を同定することができ；次いで、そのバイアス電圧の付近での変動を方向調節のために使用することができる。

#### 【0125】

この点で、第1の孔での電圧によって誘導された力の大きさが、第2の孔での電圧によって誘導された力より低い場合、ポリヌクレオチドは、より低い速度であるが、第2の孔に向かって両方の孔と交差し続けるであろう。これに関して、ポリヌクレオチドの移動の速度および方向は、両方の電圧の極性および大きさによって調節され得ることが、容易に認識される。以下にさらに記載されるように、移動のそのような微調節は、広い適用を有する。

#### 【0126】

従って、一つの局面において、ナノポア装置を通る荷電ポリマーの移動を調節する方法が提供される。方法は、(a) 上チャンバーと中央チャンバーとの間に第1の電圧を提供し、中央チャンバーと下チャンバーとの間に第2の電圧を提供するため、1個以上の電源に接続されている、上記の態様のいずれかの装置の上チャンバー、中央チャンバー、または下チャンバーのうちの一つに、荷電ポリマーを含む試料を負荷する工程；(b) ポリマーがチャンバー間を移動し、それによって、ポリマーが第1および第2の孔の両方に位置付けられるよう、初期の第1の電圧および初期の第2の電圧を設定する工程；ならびに(c) 荷電ポリマーが、いずれかの方向に、調節された様式で両方の孔を介して移動するよう調節された条件の下で、両方の電圧が、荷電ポリマーを中央チャンバーから引き出す力を生成するよう(電圧競合モード)、第1の電圧および第2の電圧を調整する工程(二つの電圧は大きさが異なる)を必要とする。

#### 【0127】

工程(c)において電圧競合モードを確立するため、各孔で各電圧が及ぼす相対的な力が、使用される各2孔装置について決定されるべきであり、これは、ポリヌクレオチドの既知の位置および検出可能な特色を感知することによって測定され得る、ポリヌクレオチドの運動に対する異なる電圧値の影響を観察することによって、較正実験によって行われ得、そのような特色の例は、本開示中に後に詳述される。各々の共通の電圧において力が等しい場合には、例えば、(アースされた中央チャンバーに対する上チャンバーおよび下チャンバーの極性を共通にして)各孔において同一の電圧値を使用することによって、熱じょう乱の非存在下で、ゼロネット運動が作出される(ブラウン運動の存在および影響は以下に記述される)。各々の共通の電圧において力が等しくない場合、等しい力の達成は、共通の電圧においてより弱い力を受ける孔の同定、およびその孔におけるより大きい電圧の使用を含む。電圧競合モードの較正は、各2孔装置について、そして各孔を通過する時の力に影響を及ぼす特色を有する具体的な荷電ポリマーまたは荷電分子について、行われ得る。

#### 【0128】

一つの局面において、荷電ポリマーを含有している試料は、上チャンバーへ負荷され、初期の第1の電圧は、上チャンバーから中央チャンバーへ荷電ポリマーを誘引するよう設定され、初期の第2の電圧は、中央チャンバーから下チャンバーへポリマーを誘引するよう設定される。同様に、試料を最初に下チャンバーへ負荷し、荷電ポリマーを中央チャンバーおよび上チャンバーへ誘引することもできる。

#### 【0129】

もう一つの局面において、荷電ポリマーを含有している試料は、中央チャンバーへ負荷され；初期の第1の電圧は、中央チャンバーから上チャンバーへ荷電ポリマーを誘引するよう設定され；初期の第2の電圧は、中央チャンバーから下チャンバーへ荷電ポリマーを誘引するよう設定される。

## 【0130】

一つの局面において、工程(c)における調整された第1の電圧および第2の電圧は、二つの電圧の間の差/差分より、大きさが約10倍～約10,000倍高い。例えば、二つの電圧は、それぞれ、90mVおよび100mVである。二つの電圧の大きさ、約100mVは、それらの間の差/差分、10mVの約10倍である。いくつかの局面において、電圧の大きさは、それらの間の差/差分より約15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、または9000倍高い。いくつかの局面において、電圧の大きさは、それらの間の差/差分の大ききとも約10000倍、9000倍、8000倍、7000倍、6000倍、5000倍、4000倍、3000倍、2000倍、1000倍、500倍、400倍、300倍、200倍、または100倍である。

10

## 【0131】

一つの局面において、工程(c)における第1の電圧および第2の電圧のリアルタイムまたはオンラインの調整は、数百メガヘルツまでのクロックレートで、専用のハードウェアおよびソフトウェアを使用して、アクティブコントロールまたはフィードバックコントロールによって実施される。第1もしくは第2または両方の電圧の自動調節は、第1もしくは第2または両方のイオン電流測定のフィードバックに基づく。

## 【0132】

センサー

上述のように、様々な局面において、ナノポア装置は、結合モチーフの結合状態の同定を実施するための1個以上のセンサーをさらに含む。

20

## 【0133】

装置において使用されるセンサーは、ポリマーのような分子または粒子の同定のために適当な任意のセンサーであり得る。例えば、センサーは、ポリマーに関連した電流、電圧、pH値、光学的特色、または滞留時間を測定することによって、ポリマーを同定するよう構成され得る。他の局面において、センサーは、ポリマーの1個以上の個々の成分またはポリマーに結合した1個以上の成分を同定するよう構成され得る。センサーは、ポリマー、ポリマーの成分、または好ましくはポリマーに結合した成分の指標となる測定可能なパラメーターの変化を検出するよう構成された任意の成分から形成されていてよい。一つの局面において、センサーは、分子または粒子、具体的には、ポリマーが、孔を通して移動する時の孔を介したイオン電流を測定するため、孔の両側に置かれた1対の電極を含む。ある種の局面において、孔を介したイオン電流は、孔を通過するポリマーセグメントが、融合分子および/または融合分子-標的分子複合体に結合している時、測定可能に変化する。電流のそのような変化は、例えば、融合分子の存在、欠如、および/またはサイズ、ならびに存在する標的分子に対応する予測可能な測定可能な方式で変動し得る。

30

## 【0134】

一つの態様において、センサーは、ポリマー、ポリマーの成分(もしくは単位)、またはポリマーに結合した成分の光学的特色を測定する。そのような測定の一つの例には、赤外線(または紫外線)分光法による特定の単位に特有の吸収帯の同定が含まれる。

## 【0135】

滞留時間測定が使用される時、感知装置を通過するためにかかる時間の長さに基づき、成分のサイズを、その特定の成分と関連させることができる。

40

## 【0136】

さらに、ポリマーの単位の検出に関する態様において、センサーは、最後から二番目の単位からポリマーの末端単位を分離し、それによって、ポリマーの単一分子単位を提供することができる酵素を、感知装置の遠位に含んでいてもよい。次いで、単一のヌクレオチドまたはアミノ酸のような単一の分子が、孔を通して移行することができ、それを検出してもよいまたは検出しなくてもよい。しかしながら、酵素は、結合した標的分子に遭遇した時には、最後から二番目の単位を切断することができず、従って、停止するか、または次の利用可能な切断部位にスキップし、従って、単一の単位との比較可能なサイズの差を有し、従って、検出可能である断片を放出するであろう。検出は、本願において記載さ

50

れるセンサーによって行われてもよいし、または質量分析のような方法によって検出されてもよい。そのような単位を測定する方法は、当技術分野において公知であり、Cal Techによって開発されたものを含む（例えば、[spectrum.ieee.org/tech-talk/at-work/test-and-measurement/a-scale-for-weighing-single-molecules](http://spectrum.ieee.org/tech-talk/at-work/test-and-measurement/a-scale-for-weighing-single-molecules)を参照すること）。そのような分析の結果は、分析の正確さを確認するため、感知装置のものと比較され得る。

【0137】

いくつかの態様において、センサーは、各会合部位または各会合した標的分子との別の非共有結合性の結合を形成する試薬によって官能化される。これに関して、ギャップは効果的な測定を可能にするために十分に大きい。例えば、センサーが、dsDNA足場上の5nmであるDNA上の特色を検出するため、試薬によって官能化される時、DNAの幅は2.5nmであるため、7.5nmのギャップを使用することができる。

10

【0138】

官能化されたセンサーによるトンネルセンシングは「認識トンネリング」と呼ばれる。電流テクノロジーを使用して、認識トンネリングによる走査型トンネル顕微鏡（STM）は、短いDNAオリゴマーの中の他の塩基が隣接するDNA塩基を同定する。記載されたように、認識トンネリングは、使用者が検出したい分子と独特の方向で水素結合するよう設計された「ユニバーサルリーダー」を提供することができる。最も多く報告されているのは、核酸の同定である；しかしながら、それは足場上の標的分子を検出するために利用するため、本明細書において修飾される。

【0139】

従来の認識トンネリングによる限界は、ギャップにランダムに結合するか、または顕微鏡作動中に偶然ギャップに入る、自由に拡散する分子のみを検出することができ、ギャップにおける明確な捕獲の方法がないという点である。しかしながら、STMセットアップの集合的な欠点は、感度のために最適化された認識試薬をナノポアチャネルの電極トンネリングギャップ内に組み入れることによって排除され得る。

20

【0140】

従って、一つの態様において、センサーは、試薬による表面修飾を含む。一つの局面において、試薬は、会合部位または付着した標的分子との非共有結合性の結合を形成することができる。具体的な局面において、結合は水素結合である。試薬の非限定的な例には、4-メルカプトベンズアミドおよび1-H-イミダゾール-2-カルボキサミドが含まれる。

30

【0141】

さらに、本発明のテクノロジーの方法は、各々、ナノポアチャネルの一方または両方に位置する1個以上の認識トンネリング部位についてDNA送達速度調節を提供することができ、電圧調節は、各標的分子が、頑強な同定のために十分な持続時間、各部位に滞留することを確実にすることができる。

【0142】

本開示の装置および方法におけるセンサーは、金、白金、グラフェン、もしくは炭素、またはその他の適当な材料を含むことができる。具体的な局面において、センサーは、グラフェンで作成された部分を含む。グラフェンは、伝導体および絶縁体として働くことができ、従って、グラフェンを通りナノポアを横切るトンネル電流は、移行中のDNAを配列決定することができる。

40

【0143】

いくつかの態様において、トンネルギャップは、約1nm～約20nmの幅を有する。一つの局面において、ギャップの幅は、少なくとも約1nm、あるいは少なくとも約1.5nm、2nm、2.5nm、3nm、3.5nm、4nm、4.5nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、12nm、または15nmである。もう一つの局面において、ギャップの幅は、大きくとも約20nm以下、あるいは大きくとも約19nm、18nm、17nm、16nm、15nm、14nm、13nm、12nm、11nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、または2nmである。いくつかの局面において、幅は、約1nm～約1.5nm、約1nm～約10nm、約2nm～約10nm、約2.5nm～約10nm、または約2.5nm～約5nmである。

【0144】

50

他の態様において、トンネルギャップは、マイクロサイズの粒子（例えば、ウイルス、細菌、および/または細胞）の検出のために適当であり、約1000nm～約100,000nmの幅を有する。いくつかの態様において、ギャップの幅は、約10,000nm～80,000nmまたは約20,000nm～50,000nmである。もう一つの態様において、ギャップの幅は、約50,000nm～100,000nmである。いくつかの態様において、ギャップの幅は、大きくとも約100,000nm、90,000nm、80,000nm、70,000nm、60,000nm、50,000nm、40,000nm、30,000nm、20,000nm、10,000nm、9000nm、8000nm、7000nm、6000nm、5000nm、4000nm、3000nm、2000nm、または1000nmである。

#### 【0145】

いくつかの態様において、センサーは電気センサーである。いくつかの態様において、センサーは、通過する標的分子または検出可能標識が独特の蛍光サインを有する時、蛍光検出手段を検出する。孔の出口にある放射線源が、そのサインを検出するために使用され得る。

10

#### 【実施例】

#### 【0146】

本発明のテクノロジーは、以下の実施例および実験を参照することによってさらに定義される。本発明の範囲を逸脱することなく、多くの修飾が実施され得ることが、当業者には明白であろう。

#### 【0147】

実施例セクションは、バイオマーカー検出においてポリマー足場および融合分子を使用する主な理由を最初に指摘することによって開始する。第1の理由は、Calin Plesa, Stefan W. Kowalczyk, Ruben Zinsmeister, Alexander Y. Grosberg, Yitzhak Rabin, and Cees Dekker. 固体ナノポアを通るタンパク質の迅速な移行 (Fast translocation of proteins through solid state nanopores.) Nano letters 13, no.2 (2013):658-663において変動するサイズのタンパク質について示されたように、あるサイズ閾値未満のバイオマーカーは単独ではナノポアによって検出不可能であるということである。さらに、検出可能なバイオマーカーであっても、区別できないことがある。バイオマーカーは、区別を妨げる、比較可能なサイズ/電荷を有する全ての他の分子と同一のナノポアサインを与えるであろう。足場および融合分子を使用することによって、本発明者らは、これらの問題の両方を回避することができる。具体的には、本発明者らは、足場上の代表的な融合分子の検出が証明され得、さらに、足場上の融合分子に対する標的分子の検出も検出され得ることを、実施例によって示す。この能力によって、関心対象の標的分子に対する特異性を達成するため、融合分子のリガンドドメインを適切に操作することによって、区別を達成することができる。

20

30

#### 【0148】

実施例1 - 固体ナノポア実験における単独のDNA

ナノポア器機は、開いた孔を通るイオン電流  $I_0$  を測定しながら、孔に電圧  $V$  を印加するため、高感度電位固定増幅器を使用する（図6a）。二本鎖DNA（dsDNA）のような単一の荷電分子が捕獲され、電気泳動によって孔に通される時（図6b）、 $I_0$  から  $I_B$  への測定された電流シフトおよびシフト量  $I = I_0 - I_B$  および持続時間  $t_D$  が、イベントを特徴付けるために使用される。実験において多くのイベントを記録した後、イベントの分布（図6c）を、対応する分子を特徴付けるため、分析する。このようにして、ナノポアは、バイオマーカー感知のための、単純な、標識なしの、純粋に電気的な単一分子法を提供する。

40

#### 【0149】

図6に示されるDNA実験において、窒化ケイ素（SiN）基質において製作された単一のナノポアは、厚さ100nmのSiN膜の中の直径40nmの孔である（図6a）。図6bにおいて、代表的な電流トレースは、200mVおよび1M KClで、厚さ10nmのSiNの中の直径11nmのナノポアを一系列に（折り畳まれずに）通過する5.6kb dsDNAによって引き起こされた遮断イベントを示す。平均オープンチャネル電流は、 $I_0 = 9.6$ nAであり、平均イベント振幅  $I_B = 9.1$ nA、持続時間  $t_D = 0.064$ msである。振幅シフトは  $I = I_0 - I_B = 0.5$ nAである。図6cにおいて、散布図

50

は、16分間記録された全部で1301個のイベントについての $|I|$ 対 $t_D$ を示す。

【0150】

図7に示されるDNA実験において、単独のdsDNAは100mM KClで電流増強イベントを引き起こす。これは、Smeets, Ralph MM, et al. 「固体ナノポアを通したイオン輸送およびDNA移行の塩依存性」 Nano Letters 6.1(2006):89-95の発表された研究において示された。その研究は、0.4Mを超えるKCl濃度については、振幅シフト  $I = I_0 - I_B > 0$  であるが、0.4M未満のKCl濃度については、シフトが反対の極性 ( $I < 0$ ) を有することを示した。これは0.4M未満のKCl濃度による負電圧実験 (-200mV) であるため、DNAイベントが、図3Cに示されたのと同じの基線 (315) に対する極性 (316) を有することが認められる。

【0151】

実施例2 - VspRタンパク質のDNA足場への結合およびナノポア検出

VspRタンパク質は、高いマイクロモル濃度の親和性でdsDNAに直接結合するコレラ菌 (*V. cholerae*) 由来の90kDaタンパク質である (参照: Yildiz, Fitnat H., Nadia A. Dolganov, and Gary K. Schoolnik. 「2成分制御系の応答制御因子のメンバーVpsRはコレラ菌O1 El Torにおける生合成遺伝子の発現およびEPSETr関連表現型のために必要とされる (VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of Biosynthesis Genes and EPSETr-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor.)」 Journal of bacteriology 183, no.5(2001):1716-1726を参照すること)。ナノポアテクノロジーを使用した標的検出のこの実施例において、VspRは、部位特異的DNA結合ドメインと、抗体または糖を含む多様な標的を検出する目的で操作され得るリガンド特異的結合部位とを含む融合分子として働く。この証明において、本発明者らは、モデル融合分子としてDNA足場上のVspRの検出を示す。足場は10個のVspR特異的結合部位を含有している (図8)。dsDNA結合のためのVspRの親和性を保存するため、本発明者らは、実施例1および図7において示されるように単独のDNAの移行が電流増強を引き起こす塩濃度、0.1M KClを使用する。5.631kb DNA足場は、全部で10個のVspR結合部位: ある配列 (14塩基対) 5個、異なる配列 (18塩基対) 3個、第3の配列 (27bp) 2個を含有している。3種の異なる配列は、等しい親和性でVspRに結合しなくてもよい。実験において、VspRタンパク質濃度は、記録緩衝液中では18nM、標識 (結合工程) 中は180nMである。これは、DNA上の結合部位に対して18倍過剰のVspRタンパク質をもたらす。実験を、pH8.0 (VspRタンパク質のpIは5.8である) で実行した。KdおよびDNA濃度を考慮に入れると、DNAの0.1~1%のみがVspRによって完全に占有されており、より大きい割合が部分的に占有されており、DNAの不明な割合の残りが完全に未結合であるはずである。ナノポア実験において、溶液中には遊離型VspRタンパク質も存在する。

【0152】

二つの代表的なイベントが図9に示される。VspRによる実験において、VspR濃度は18nM (1.6mg/L)、10nM結合部位であった。足場濃度は6.6秒毎の捕獲をもたらす1nMであった。これから、10ulの試料を使用した理論上の感度は、116pM (0.01mg/ml) である。孔サイズは15nmの直径および長さである。電圧は-100mVであり、負の電圧は負の電流を作出し、従って、上方シフトはVspR結合DNAイベントについて示されたような減弱イベントに相当し (図9b)、下方シフトは未結合DNA足場イベントについて示されたような正のシフトを作出することに注意すること (図9a)。これは、図3Cの理想的なシグナルパターンおよび条件と一致しており、DNAイベント (316) は、融合分子結合DNAイベント (320) と比較して、より速い持続時間および反対の極性を有している。従って、この図からの重要な観察は、VspR結合イベントが、未結合DNAイベントと比較して、反対のシグナル極性を有するという点である。図10は、孔を通過するVspR結合足場と一致するさらに10個の代表的な電流減弱イベントを示す。10分間の記録において90個のそのようなイベントが存在し、それは、6.6秒毎に1個のVspR結合イベントに相当した。イベントは、振幅50~150pA、持続時間0.2~2ミリ秒の減弱であった。前述のように、図9~10において、下方イベントは電流増強イベントに相当し、上方イベントは電流減弱イベントに相当し、基線がディスプレイ目的のためにゼロにされていても、このシフト方向は保存される。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 3 】

## 実施例3 - RecAタンパク質のDNA足場への結合およびナノポア検出

RecAは、融合分子の要素を含み、この実施例は、標的バイオマーカーを検出するためにこれらの要素を使用する能力を証明する。具体的には、融合分子は、DNAに結合するRecAの部分（即ち、DNA結合ドメイン）と、バイオマーカー（抗RecA抗体）のベイトとなるRecAの部分（エピトープ）とからなる。DNAおよびRecAの実験を、最初に、抗RecA抗体の非存在下で、次いで、抗RecA抗体の存在下で実施した。

## 【 0 1 5 4 】

試薬DNA/RecAは、RecAによってコーティングされた5.6kb dsDNA足場分子からなる。RecAは、dsDNAに沿って重合することができる、DNA修復に参与する38kDa細菌タンパク質である（[C Bell.大腸菌RecA ATPaseの構造および機序（Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase）] Molecular microbiology, 58(2):358-366, Jan 2005]を参照すること）。この試薬は、10mM  $\gamma$ -S-ATP、70mM トリスpH 7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、および5mM DTT（New England Biolabs）において、112 $\mu$ M RecAタンパク質と共に60nM足場をインキュベートすることによって作出される。RecAは、RecAにATPが結合している場合、より大きい親和性でdsDNAと結合するため、 $\gamma$ -S-ATPが含まれる。RecAは、ATPをADPに加水分解し、それによって、DNAに対する親和性が低下し得るため、非加水分解可能な  $\gamma$ -S ATP類似体は、ADPへのこの変換を防止し、従って、より高い親和性状態が維持される。DNAに対するRecAの比は、可能な3bp結合部位1個に対してRecA分子1個であるが、本発明者らは、他のナノポア研究（Smeets, R.M.M., S.W.Kowalczyk, A.R.Hall, N.H.Dekker, and C.Dekker. 「RecAによってコーティングされた二本鎖DNAの固体ナノポアを通る移行（Translocation of RecA coated double-stranded DNA through solid-state nanopores.）」 Nano letters 9, no.9(2008):3089-3095、およびKowalczyk, Stefan W., Adam R.Hall, and Cees Dekker. 「固体ナノポアを使用したDNAに沿った局所的なタンパク質構造の検出（Detection of local protein structures along DNA using solid-state nanopores.）」 Nano letters 10, no.1(2009):324-328を参照すること）において観察されたように、全てのRecAタンパク質が結合しているとは限らず、従って、溶液中に遊離型RecAが存在すると予想する。次いで、DNA/RecA試料を、1M KClまたはLiCl、10mM EDTAに調整し、ナノポア実験において試験するか、または過剰のRecAタンパク質をゲルろ過（ThermoScientific Spin Columns）を使用して除去する。

## 【 0 1 5 5 】

一つの実験セットにおいて、本発明者らは、1M KCl、pH8で、180mVを印加して、厚さ30nmのSiN膜に形成された直径16~18nmの孔を使用した。別の対照実験において、未結合の5.6kb dsDNA足場は、2100~400pAおよび530~500マイクロ秒の範囲でイベントの95%を生成する。また、遊離型RecAイベントは、2100~600pA、20~200 $\mu$ sである。最後に、RecA結合DNAイベントは、典型的には、範囲0.51~3nAの、より長い持続時間（0.200~3ミリ秒）のはるかに深い遮断である。RecA結合DNAの代表的なイベントは、図11および図12に示される。これらのイベントは、興味深いパターンを有し、Kowalczyk et al. [「固体ナノポアを使用したDNAに沿った局所的なタンパク質構造の検出」 Nano letters 10, no.1(2009):324-328] による論文において、著者らは、各DNAに結合しているRecAフィラメントの位置および長さを推論することを試みている；しかしながら、dsDNAが均一な速度で孔を通過しないことをもう一つの研究が示したが [Lu, Bo, et al. DNAのナノポア通過中の速度変動の起源および結果（Origins and consequences of velocity fluctuations during DNA passage through a nanopore.） Biophysical journal 101.1(2011):70-79]、それは孔を通る均一な通過速度を仮定しているため、これは推論に過ぎない。図13aおよび図13cは、それぞれ電圧によって標準化された最大電流シフトおよび平均電流シフトを縦軸に示し、イベント持続時間を横軸に示している。両方のイベントのプロットは、10分間にわたり記録された全部で1385個のイベントを有する。振幅は、ナノポア研究論文において一般的であるイベントコンダクタンスシフト値を与えるため、電圧によって標準化されている。例えば、200mVでの14nSの平均コンダクタンスは、2.8nAの平均電流振幅と等価である。振

10

20

30

40

50

幅（またはコンダクタンスと等価）および持続時間について二つの観察可能な亜集団が存在し、より深くより長い持続時間のイベントは、RecA結合DNAに起因し、より速くより浅いイベントは、溶液中の遊離型RecAに起因する。本発明者らは、RecA単独対照実験を実行することによって、より速くより浅い亜集団の、遊離型RecAとしての同一性を確認した。これは、初期の研究 [Smeets, R.M.M., S.W.Kowalczyk, A.R.Hall, N.H.Dekker, and C.Dekker. 「RecAによってコーティングされた二本鎖DNAの固体ナノポアを通る移行」 Nano letters 9, no.9(2008):3089-3095] においても確証された。平均（図13c~d）の代わりに最大電流シフト値（図13a~b）を見ることによって、亜集団イベントはより明瞭になる。未結合DNAに対するRecA結合DNAのイベントパターンが、図3A中のモデルシグナルパターンと一致していることに注意すること。

10

## 【0156】

別の実験において、標的抗体の検出を証明するため、RecA抗体を使用した。1:10000希釈の抗RecAモノクローナル抗体（ARM191、Fisher Scientific）またはポリクローナルRecA抗血清（Prof.Ken Knight, Ph.D. (UMass Medical School)からの寄贈）のいずれかと共に、30分間、1ナノモル濃度のDNA/RecAをインキュベートすることによって、DNA/RecA試薬は抗体バイオマーカーに結合し、DNA/RecA/Ab複合体を作出する。複合体の移動度をDNAのみまたは適切な対照と比較することによって、DNA/RecA複合体およびDNA/RecA/Ab複合体を試験するため、電気泳動移動度シフトアッセイ、1xTBE緩衝液中の5%TBEポリアクリルアミドゲルを使用する。

20

## 【0157】

DNA単独対照においては直径20nmであり、次いで、RecA結合DNA複合体が添加された後、27nmへ拡大させた孔を用いて、200mVで1M LiClにおいてナノポア実験を実行した。ゲルシフト実験において、図14aは、DNA/RecA/mAbについてDNA/RecAより明白なシフトを示し、DNA/RecAは、未結合の5.6kb dsDNA足場を十分に上回っていた。この複合体をナノポアによって実験的に試験した。具体的には、0.1nM DNAを孔の上のチャンパーに添加し、10分間の記録の後、1.25nM DNA/RecAを添加した。もう1回の記録期間の後、1.25nM DNA/RecA/mAbを添加した。溶液中のAB結合複合体によって、他の二つの複合体型（DNA、DNA/RecA）に特徴的なイベントパターンとマッチしない、新しいマルチレベルのイベント型が観察された（図14b）。実験の各期において記録されたイベントの  $I$  対  $t_D$  分布（図14c）は、RecA結合DNAイベントがより長い持続時間  $t_D$  を有し、DNA/RecA/mAbが添加された後、3倍多いイベントが、0.6nAより大きい平均振幅シフト  $I$  を有していたことを示す。このデータセットにおけるイベントをAb結合型でもあるとしてタグ付けるための単純な基準は、 $(I, t_D) > (0.6nA, 0.2ms)$  である。未結合DNAイベントにはほぼ存在しないが、（抗体もDNA/RecAに結合しているかまたは結合していない）RecA結合イベントの有意な画分に存在する最良のサインを同定することは、ナノポア上の溶液の中のRecA結合DNA複合体の存在の検出のために有用である。抗体検出の目的で、本発明者らは、これをさらに拡張し、未結合DNAイベント型およびRecA結合DNAイベント型にはほぼ存在しないが、抗体もDNA/RecAに結合しているRecA結合イベントの有意な画分に存在する最良のサインを同定することを目指とする。これは、ナノポア上の溶液の中のRecA結合DNA複合体の存在の検出のための基準を提供する。これらのDNA実験およびRecA実験およびRecA-抗体実験は、0.4Mを超えるKCl濃度で、正の電圧によって行われるため、図14bにおけるイベントパターンは、図3A中の理想的なパターンと比較可能であることが認められる。

30

40

## 【0158】

実施例4 - 標的タンパク質検出のためのPNAとビオチンを含む融合分子

以前の実施例は、RecAによってコーティングされたdsDNA複合体に結合したRecA抗体の検出を調査している。RecAは3bp領域に非特異的に結合し、従って、RecA抗体はdsDNA上の任意のRecAと結合することができるため、標的が特定の部位に結合することを可能にするアプローチを証明することも望ましい。具体的には、本発明者らは、アビジンファミリーメンバー（例えば、ニュートラアビジンおよびまたは1価ストレプトアビジン）に結合するためのビオチン化された部位を各々3個有するPNAを用いて、12残基長ペプチド核酸（PN

50

A) 分子に結合するよう操作された5.6kb dsDNA足場を使用する(図15a)。足場は、全部で75個ものアビジンバイオマーカ結合部位が局在する25個の異なる部位を有する(図15b)。本発明者らのデータ(図16)は、DNA/PNA/Neut複合体が、他のバックグラウンドイベント型(未結合DNA単独、ニュートラアビジン単独、PNA/ニュートラアビジン単独)を超えて検出可能であり、従って、完全に組み立てられた(即ち、DNA/PNA/ニュートラアビジン)イベントとしてタグ付けされ得るイベントサインを引き起こすことを示す。このセットアップにおいて、足場+融合分子として働くのは完全に組み立てられたDNA/PNA/ニュートラアビジン複合体である。実施例の残りにおいて、本発明者らは、ナノポアによってDNA/PNA/ニュートラアビジン複合体が検出され得ることを示すために十分な詳細を提供する。

10

## 【0159】

このセットアップにおいて、融合分子は、二つの別々のドメイン、独特のDNA配列に結合するドメインと、抗ニュートラアビジン抗体に結合するもう一つのドメインとを含有している。DNA結合ドメインは、足場上に25回リピートされる独特の配列

(GAAAGTGAAAGT, (SEQ ID NO: 1))

と結合するタンパク質核酸分子(PNA)である(図15b)。PNA分子は、相補配列と対合することができるA塩基、T塩基、C塩基、G塩基を有するオリゴヌクレオチドと類似しているが、典型的なオリゴヌクレオチドのようなリン酸骨格の代わりに、骨格がタンパク質である。これは、リン酸骨格によって提供される負の電荷を排除し、従って、PNA分子は、相補DNA鎖に置き換わることによってdsDNAへ組み入れられ、PNA分子を包含する短いスト

20

ッチについて新しいDNA/PNAハイブリッドを作成する。実験において使用されたPNAは、配列GAA\*AGT\*GAA\*AGT(SEQ ID NO: 1)を有していた。\*は、リジンアミノ酸とのカップリングによって、PNA骨格の 位にピオチンが組み入れられていることを示し、従って、各PNAは3個のピオチン分子を有する(PNABio)。融合分子結合足場を作出するため、60nM足場を2分間95 に加熱し、60 に冷却し、1時間、15mM NaClにおいて、可能な結合部位に対して10倍過剰のPNAと共にインキュベートし、次いで、4 に冷却する。過剰のPNAを、10mMトリ

30

リスpH8.0に対して2時間透析する(20k MWCO, Thermo Scientific)。次いで、このDNA/PNA複合体を、(透析におけるPNAの60%の低下を仮定して)可能なピオチン部位に対して10倍過剰のニュートラアビジンタンパク質(Pierce/Thermo Scientific)によって標識する。純度、濃度、および可能性のある凝集を査定するため、上記のように、反応物を電気泳動にかける。この試薬、DNA/PNA/ニュートラアビジン(D/P/N)は、使用まで-20 で保管される。

20

30

## 【0160】

図17a~bは、三つの別々の実験: DNA単独、ニュートラアビジン単独、およびD/P/N試薬からの |I| 対tD分布を比較するデータを示す。D/P/N実験における最大の|I|イベントは、D/P/N複合体に起因する可能性が最も高く(図16d)、結合した融合分子(即ち、PNAおよびニュートラアビジンが結合している足場)としてイベントをタグ付けるための単純な基準を提供する。具体的には、イベントについて|I| > 4nAである場合、そのイベントを「結合された融合分子」であるとしてフラグ付けることができる。図17におけるデータセットについて、D/P/N実験におけるイベントの9.3%(390個)が、|I| > 4nAを有し、

40

対照においては、Dイベントの0.46%、Nイベントの0.16%のみが、4nAを超えている。1M KCl、200mV印加での、直径7nmの孔による別の実験(示されないデータ)において、0.4nM濃度のPNAおよびニュートラアビジンのみによる対照において、4nAを越えたイベントはなかった(0%)。本発明者らの数学的な基準を適用すると、ランダム変数 $Q = \{\text{フラグ付けられたイベントの画分}\}$ は、二項分布を有し、これおよびその他の統計モデリングツールを使用すると、このデータセットについての99%信頼区間を $Q = 9.29 \pm 1.15\%$ として計算することができる。9.29% > 0.46%(最大偽陽性%)は、Qについての99%信頼区間において十分に満たされるため、本発明者らは、8分未満のデータ収集において、陽性の試験結果を有する。実際、同一の99%信頼が、最初の60秒のデータのみによるこのデータセットについて達成される。ゲルシフト(図17c)は、足場DNAの移動が、ニュートラアビジン

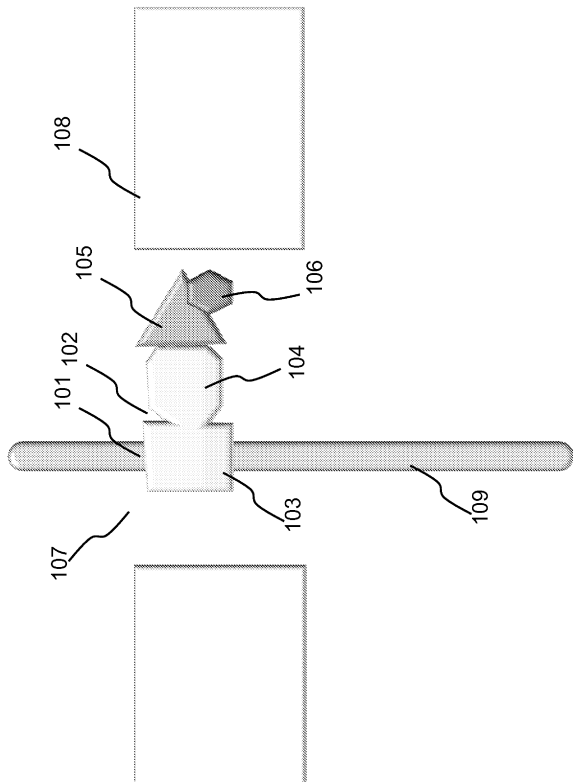
50

依存的に遅滞することを示す；これは、全てのDNAが標識され、ほぼ均質の集団が作出されているようであったため、この予備実験における10倍濃度の使用に導いた。DNA/PNA複合体によるシフトは見られないが、より短いDNAを使用したもう一つのDNA/PNAナノポア研究においてはシフトが観察された (Alon Singer, Meni Wanunu, Will Morrison, Heiko Kuhn, Maxim Frank-Kamenetskii, and Amit Meller. 「ゲノムプロファイリングのための二重鎖DNAのナノポアに基づく配列特異的検出 (Nanopore based sequence specific detection of duplex DNA for genomic profiling.) Nano letters 10,no.2(2010):738-742. )。

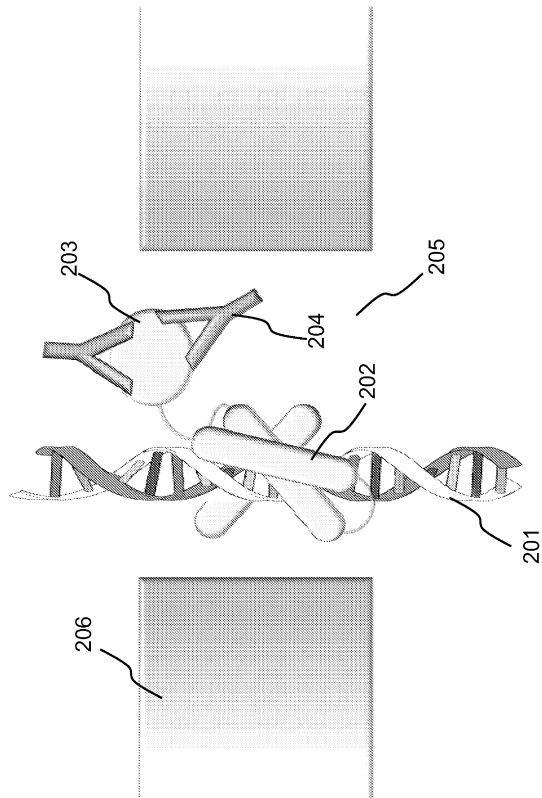
【 0 1 6 1 】

上記の態様と共に本発明を説明したが、前述の説明および実施例は、本発明を例示するためのものであって、その範囲を限定するためのものではないことが理解されるべきである。本発明の範囲内の他の局面、利点、および修飾は、本発明が関係する技術分野の当業者に明白であろう。

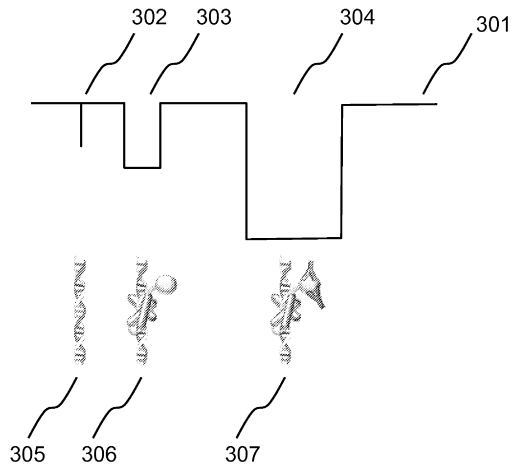
【 図 1 】



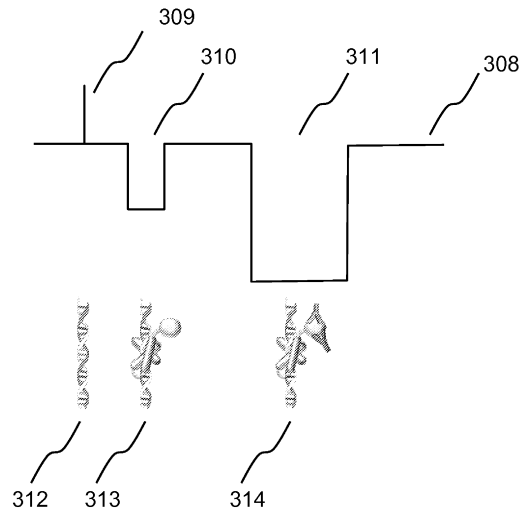
【 図 2 】



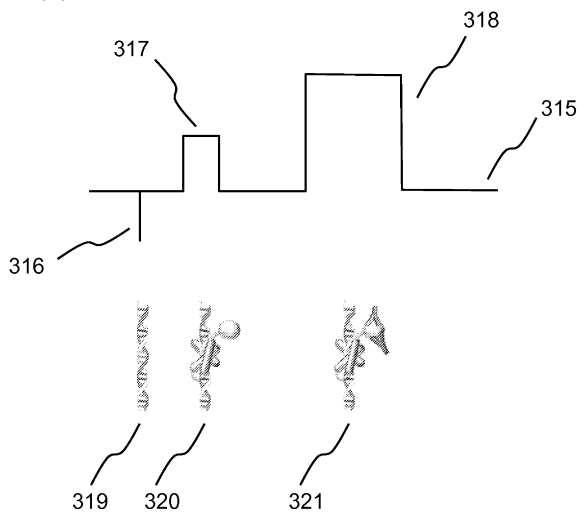
【図 3 A】



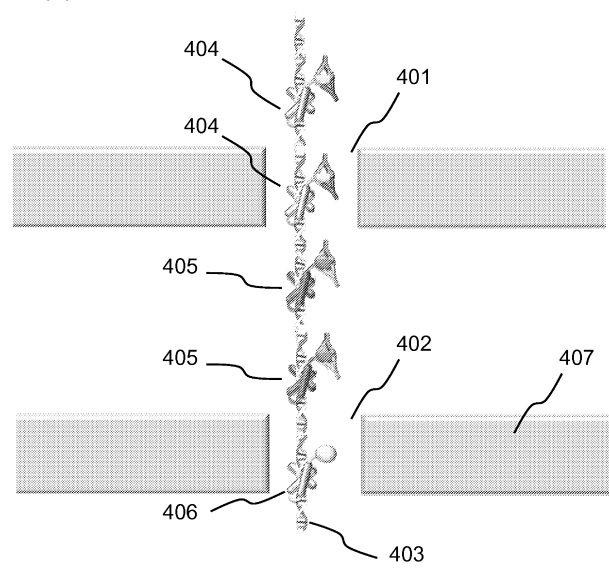
【図 3 B】

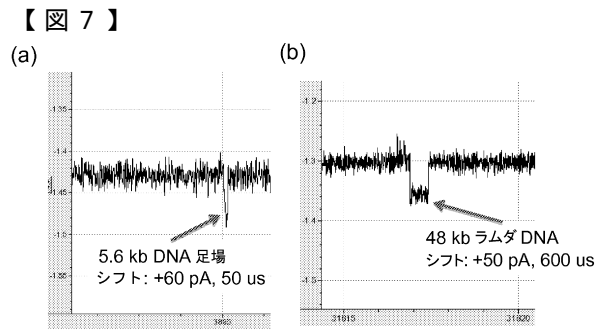
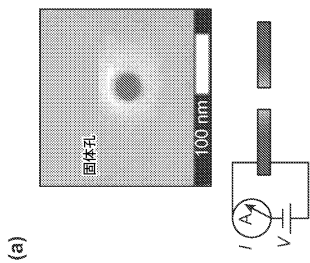
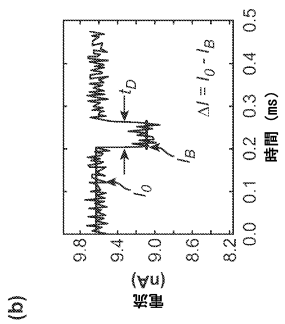
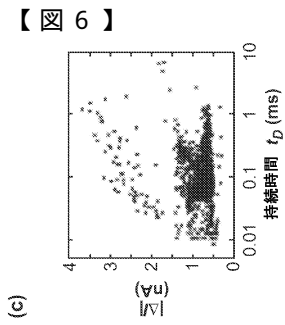
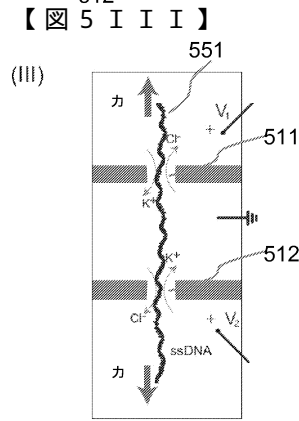
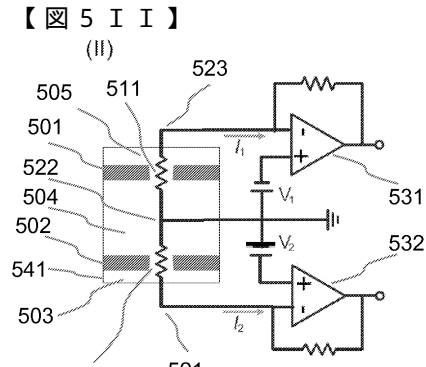
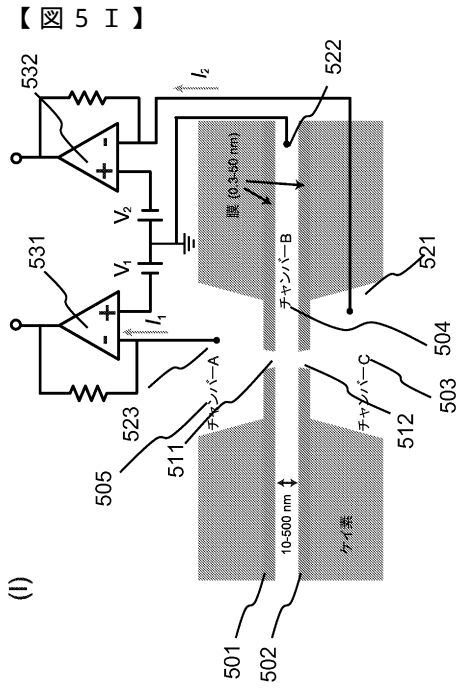


【図 3 C】

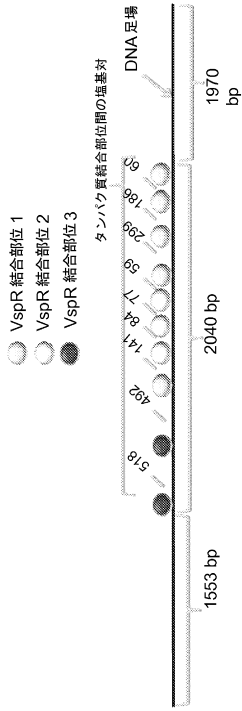


【図 4】

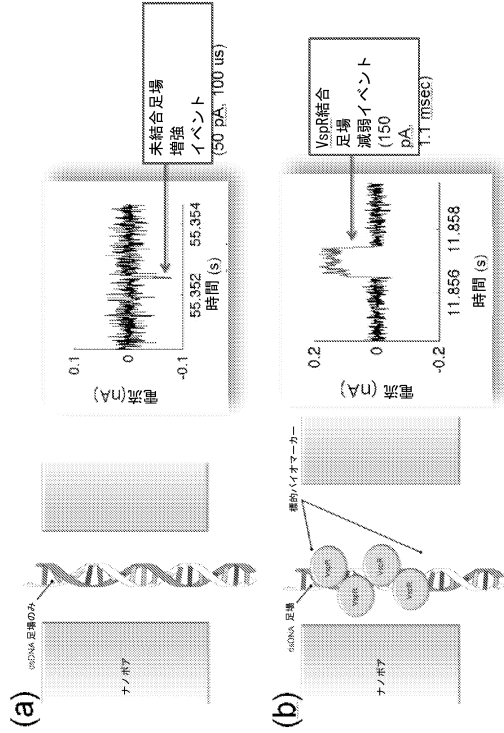




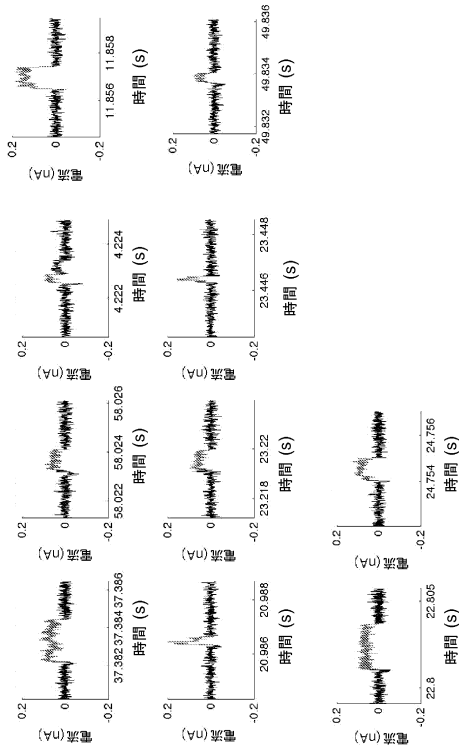
【 図 8 】



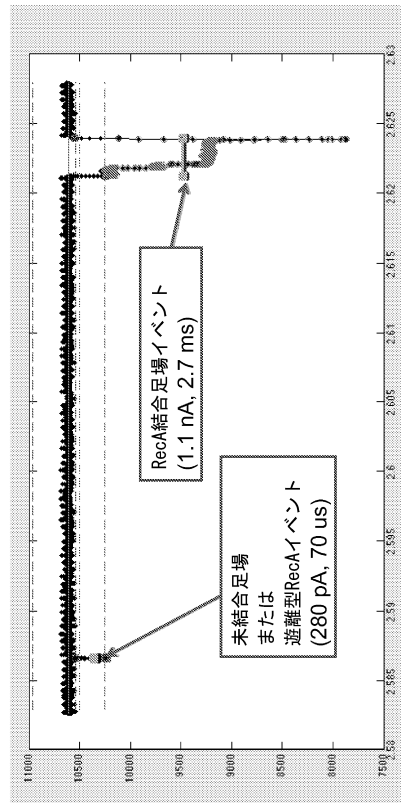
【 図 9 】



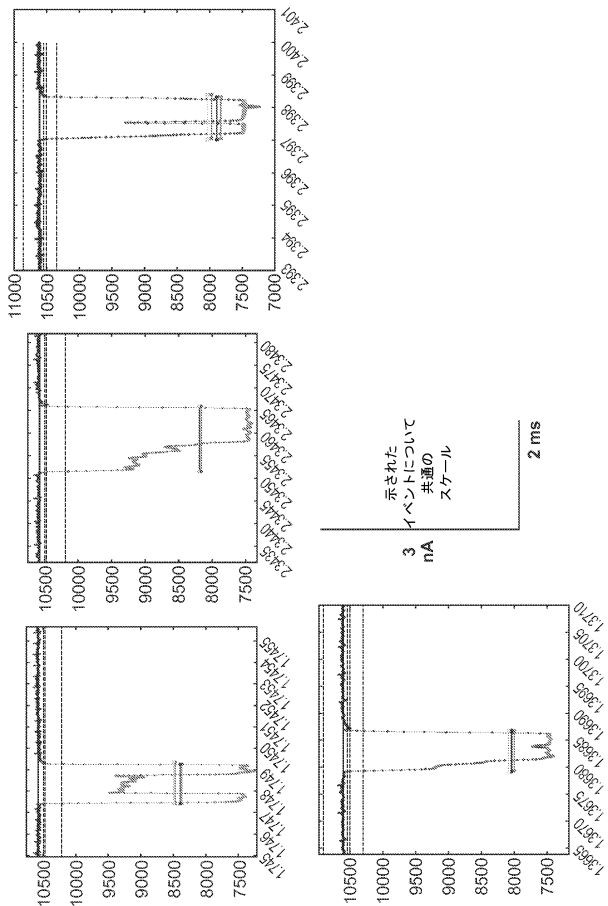
【 図 10 】



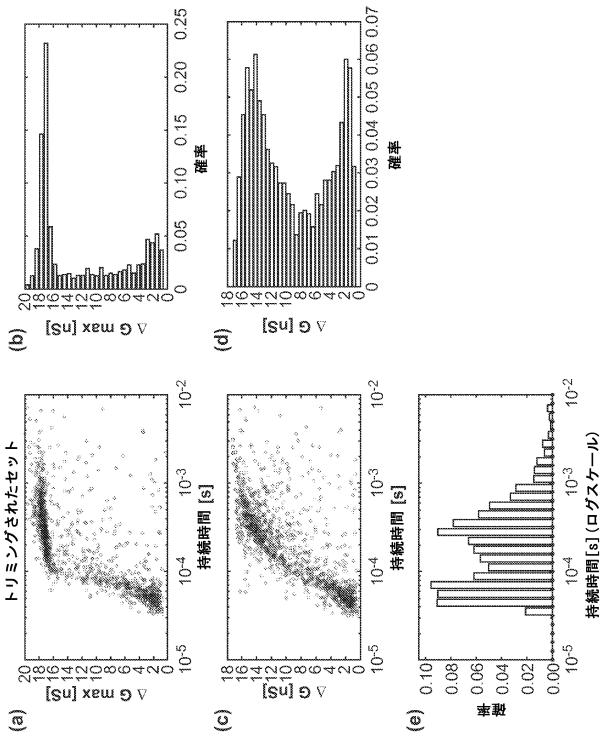
【 図 11 】



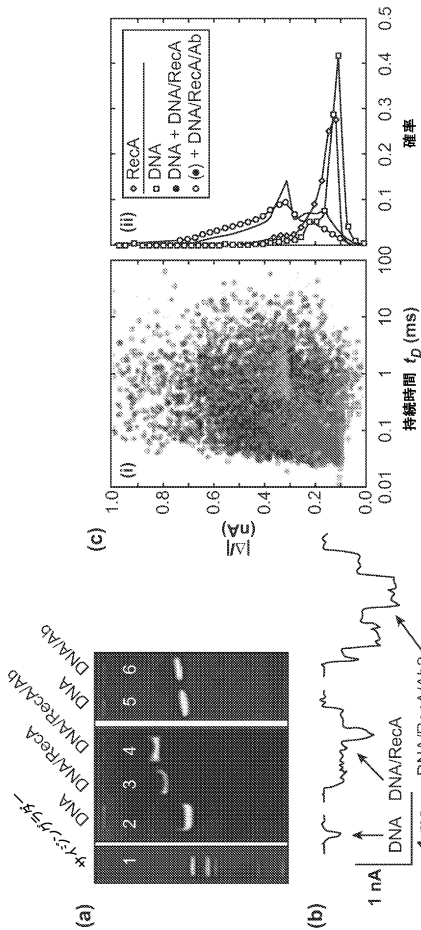
【図 1 2】



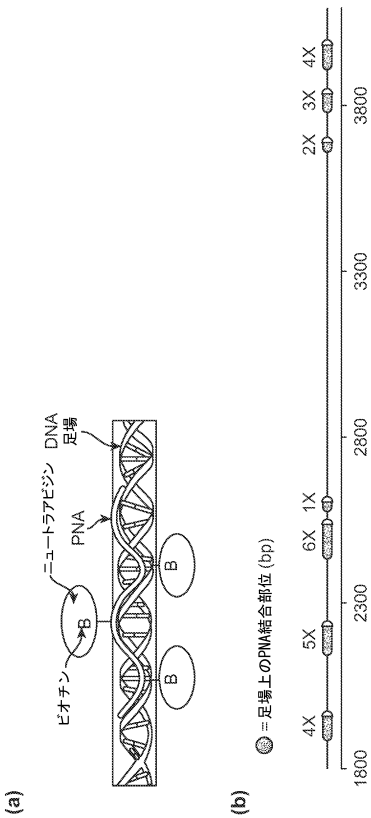
【図 1 3】



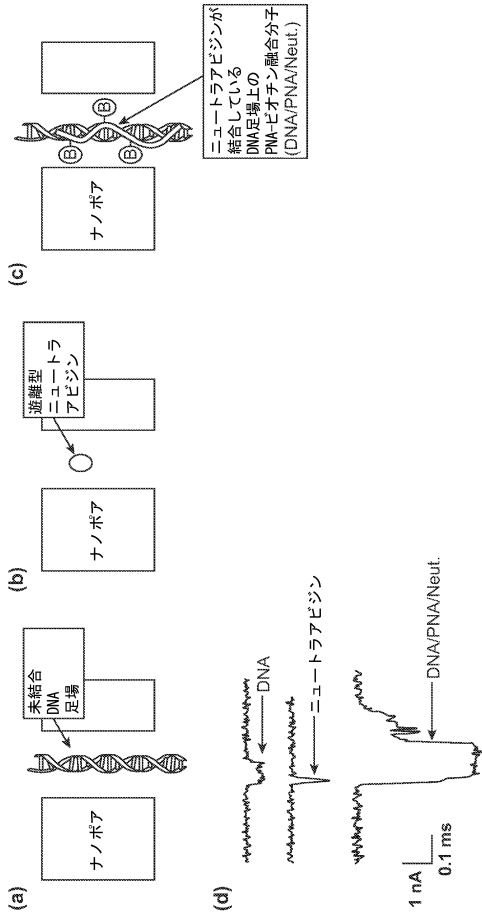
【図 1 4】



【図 1 5】



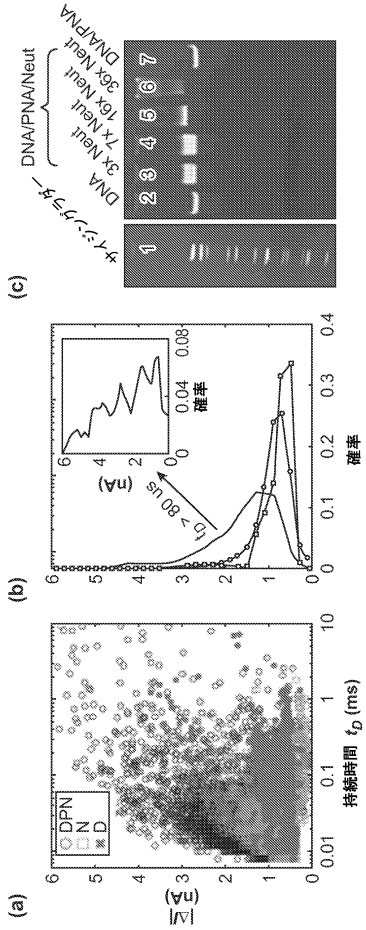
【 図 16 】



【 配列表 】

0006541114000001.app

【 図 17 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 モリン トレバー ジェイ .  
アメリカ合衆国 9 5 0 6 0 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2  
1 6 1 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ヘラー ダニエル  
アメリカ合衆国 9 5 0 6 0 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2  
1 6 1 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ダンバー ウィリアム  
アメリカ合衆国 9 5 0 6 0 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2  
1 6 1 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

審査官 小澤 瞬

- (56)参考文献 国際公開第2013/123450(WO, A1)  
米国特許出願公開第2013/0233709(US, A1)  
米国特許出願公開第2005/0026202(US, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10  
C12Q 1/00-3/00  
G01N 27/00-27/10  
27/14-27/24  
33/48-33/98