

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6275052号  
(P6275052)

(45) 発行日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日(2018.1.19)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 27/00	(2006.01)	GO 1 N 27/00	Z
GO 1 N 33/536	(2006.01)	GO 1 N 33/536	Z
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
C 1 2 N 15/115	(2010.01)	C 1 2 N 15/00	H

請求項の数 18 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2014-557118 (P2014-557118)	(73) 特許権者	511252899
(86) (22) 出願日	平成25年2月14日 (2013.2.14)		オックスフォード ナノボール テクノロ ジーズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2015-508893 (P2015-508893A)		イギリス国 オックスフォードシャー オ ーエックス4 4ジーエー, オックスフォ ード, オックスフォード サイエンス パ ーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドマンド カートライト ハウス
(43) 公表日	平成27年3月23日 (2015.3.23)	(74) 代理人	100092783
(86) 国際出願番号	PCT/GB2013/050348		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開番号	W02013/121201	(74) 代理人	100120134
(87) 国際公開日	平成25年8月22日 (2013.8.22)		弁理士 大森 規雄
審査請求日	平成28年2月10日 (2016.2.10)	(74) 代理人	100104282
(31) 優先権主張番号	61/599, 240		弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成24年2月15日 (2012.2.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アプタマー法

(57) 【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、

アプタマーが、3 次元構造に折り畳まれているときには孔を通過して移動するには大きすぎ、折り畳みがほどかされると孔を通過して移動することが可能であり、

尾部が、孔に侵入し、孔を流れる電流に影響を与えることができる直鎖状の重合体を含み

、

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。

10

【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) 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 ) を含む；および/または

20

(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

30

(e) 配列番号 7 から 2 3 の残基 1 から 3 0 を含む、請求項 1 から 3 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 7 0 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 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、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【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 6 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、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【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プタマーを含む、請求項1から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、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

孔が、前庭またはバレルを含み、場合によって、

(a) 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；および/または

(b) 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；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 (Ms 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ターリポタンパク質 (Na 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；(ii) 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 % の同一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；(iii) 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 (iv) 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、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 % の同一性を有し、かつ/またはサブユニットの 1 つもしくは複数、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 % の同一性を有し、かつ孔が孔活性を維持する前記バリエーションである、請求項 1 から 10 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、請求項 1 から 11 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、

(ii) 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】

10

20

30

40

50

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プタマーと、( i i ) 膜貫通孔に侵入でき、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、

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、

アプタマーが、3 次元構造に折り畳まれているときには孔を通過して移動するには大きすぎ、折り畳みがほどこれると孔を通過して移動することが可能であり、

尾部が、孔に侵入し、孔を流れる電流に影響を与えることができる直鎖状の重合体を含み

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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、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新しい方法に関する。従って、本発明は、複数の分析物の群における各分析物の存在または非存在を決定するための多重アッセイに関する。アッセイは、アプタマーおよび膜貫通孔を用いる。

【背景技術】

【0002】

膜貫通孔(ナノポア)は、重合体および小分子などの多様な分析物についての直接的で電氣的なバイオセンサとして大きい可能性を有する。ナノポアを横切って電位を印加すると、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどの分子がナノポアのバレルまたはチャンネルにある期間一過的にある場合に、電流が変化する。特定のヌクレオチドおよび特定のポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドなどの特定の分子は、既知のサインおよび持続期間の電流変化をもたらす。このような電流変化を用いて、孔に存在するヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを同定できる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明者らは、多重アッセイにおいて膜貫通孔を用いて、2つ以上の分析物の群中の各分析物の存在または非存在を決定できることを実証する。より具体的には、本発明者らは、分析物の存在または非存在を、膜貫通孔とアプタマー含有プローブのパネルとを用いて決定できることを実証する。対象の各分析物は、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。各プローブは、孔に侵入して、孔を流れる電流に影響できる尾部も含む。各尾部は、プローブが対象の分析物の1つと結合しているか否かに応じて異なる示差的な方式で孔を流れる電流に影響する。パネル中の各プローブが孔を流れる電流に与える影響も、各プローブの正体を検出できるように示差的である。アプタマーと尾部とのこの組み合わせは、孔を流れる電流に与えるプローブ尾部の影響を分析することによりパネル中の1つもしくは複数または全てのプローブと対象の分析物との結合を驚くべきことに同定できるようなものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

従って、本発明は、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、

20

(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、(ii) 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、

30

(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

を含む方法を提供する。

【0005】

本発明は、

- 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濃度を決定する方法であって、

(i) 本発明の方法を行うステップと、

(ii) 試料中に存在することが示された1つ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

40

を含む方法；

- 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プタマーと、(ii) 膜貫通孔に侵入でき、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

50

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；

- 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)本発明のプローブのパネルと、(b)膜貫通孔とを含むキット；ならびに

- 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、複数の孔と、本発明のプローブのパネルとを含む分析装置

10

も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】結合した分析物の非存在下(a)および存在下(b)でのナノポア内のプローブ配置の漫画での図を示す図である。結合した分析物の非存在(c)および存在(d)に対応する期待される事象トレースパターンをその下に示す(y軸=電流およびx軸=(c)および(d)についての時間)。点線は、ポリ(dA)領域を表し、x印領域は、脱塩基領域を表す。この実施形態では、脱塩基領域が孔の-バレル内に保持される場合、ポリ(dA)領域が-バレル内にある場合よりも多くの電流がチャンネルを流れる。高いレベルから低いレベルへの電流の移行は、アプタマー-分析物複合体の解離を示す。

20

【図2】トロンビンの存在下(b)および非存在下(a)でアプタマー配列5A15x10A\_\_TBAについて観察される異なるブロックレベルを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=(a)および(b)についての時間(s))。a)トロンピンが存在しない溶液中にアプタマー(配列5A15x10A\_\_TBA)が存在する場合は、レベル1のみが観察される。b)アプタマー(配列5A15x10A\_\_TBA)およびトロンピンが溶液中に存在する場合は、レベル1および2が検出される(レベル間の違いは、30.5pAである)。レベル2の出現は、アプタマーとトロンピンとの結合を示し、レベル2からレベル1への移行は、アプタマー-トロンピン複合体の解離を示す。

【図3】トロンピン濃度と観察された事象比率(トロンピン結合および未結合事象を組み合わせた数と比較したトロンピン結合事象のみの数)との間の関係を示す図である。これらの2つのグラフは、トロンピン結合事象と事象の総数(トロンピン結合および未結合)との間の比率がトロンピンの濃度とともにどのように変動するかを示す。この実験において用いたプローブ配列は、5A15x10A\_\_TBAであり、最終濃度は、1250nMであった。これらの校正グラフを用いて、試料中のトロンピンの濃度を決定することが可能である(グラフ(a)y軸=比率(結合/未結合)、x軸=トロンピン濃度(nM)、グラフ(b)y軸=比率、x軸=log<sub>10</sub>トロンピン濃度(nM))。

30

【図4】アプタマー配列15X15A\_\_TBA3'CholTEG(3'端にコレステロールTEGを有する配列番号19)について観察される異なるブロックレベルが、トロンビンの存在(b)および非存在(a)であることを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=(a)および(b)についての時間(s))。a)トロンピンが存在しない溶液中にアプタマー(配列15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEG)が存在する場合は、レベル1のみが観察される。b)アプタマーをトロンビンの存在下でプレインキュベートした場合は、レベル1および2が検出される。レベル2の出現は、アプタマーとトロンピンとの結合を示し、レベル2からレベル1への移行は、アプタマー-タンパク質複合体の解離を示す。この実験は、実施例2において用いたよりもかなり低いアプタマーの濃度を用いて行った。

40

【図5】多くの異なるアプタマーをどのように用いてトロンビンの存在を検出できるかを示す図である(ここで、各アプタマーは、それ自体の示差的なステップレベルシグナルを生じる)。上の図(a)は、遊離アプタマーシグナル(区画Aと表示する)と、トロンピンと結合した場合の異なるアプタマー尾部のそれぞれについてのシグナル(区画Bと表示

50

する) について検出される事象の数を示す。トロンピンと結合したアプタマー 15 × 15 A についての事象は 1 と表示し、トロンピンと結合したアプタマー 17 × 13 A についての事象は 2 と表示し、トロンピンと結合したアプタマー 19 × 11 A についての事象は 3 と表示し、トロンピンと結合したアプタマー 5 A 15 × 10 A についての事象は 4 と表示する。x 軸上に示す「比率」は、開放孔レベル (ピンサイズ = 0.0025) で除したアプタマー尾部を用いて得られた電流レベルであり、y 軸は、カウントである。下の図 (b、y 軸 = 電流 (pA) および x 軸 = 時間 (s)) は、アプタマー尾部配列 (1 ~ 4) のそれぞれについて検出された 4 つの異なるブロックシグナルを示す。別々の区別可能なシグナルが、各アプタマーについてみられる。

【図 6】PDGF の存在下 (b) および非存在下 (a) でアプタマー配列 17 × 8 A \_\_ PDGF について観察される異なるブロックレベルを示す図である (y 軸 = 電流 (pA) および x 軸 = (a) および (b) についての時間 (s))。a) PDGF が存在しない溶液中にアプタマー (配列 17 × 8 A \_\_ PDGF) が存在する場合は、レベル 1 のみが観察される。b) アプタマー (配列 17 × 8 A \_\_ PDGF) および PDGF が溶液中に存在する場合は、レベル 1 および 2 が検出される。レベル 2 の出現は、アプタマーと PDGF との結合を示し、レベル 2 からレベル 1 への移行は、アプタマー - PDGF 複合体の解離を示す。

10

【図 7】PDGF の存在下 (b) および非存在下 (a) でアプタマー配列 25 × \_\_ PDGF について観察される異なるブロックレベルを示す図である (y 軸 = 電流 (pA) および x 軸 = (a) および (b) についての時間 (s))。a) PDGF が存在しない溶液中にアプタマー (配列 25 × \_\_ PDGF) が存在する場合は、レベル 1 のみが観察される。b) アプタマー (配列 25 × \_\_ PDGF) および PDGF が溶液中に存在する場合は、レベル 1 および 3 が検出される。レベル 3 の出現は、アプタマーと PDGF との結合を示し、レベル 3 からレベル 1 への移行は、アプタマー - PDGF 複合体の解離を示す。

20

【図 8】PDGF 濃度と観察された事象比率 (PDGF 結合および未結合を組み合わせた事象と比較した PDGF 結合事象のみ) との関係を示す図である。このグラフ (y 軸 =  $\log_{10}$  事象割合、x 軸 =  $\log_{10}$  PDGF 濃度 (nM)) は、PDGF 結合事象と事象の総数 (PDGF 結合および未結合事象) との間の比率が PDGF の濃度とともにどのように変動するかを示す。この実験において用いたプローブ配列は、25 × \_\_ PDGF であった。この校正グラフを用いて、試料中の PDGF の濃度を決定することが可能である。

30

【図 9】ATP の存在下 (b) および非存在下 (a) でアプタマー配列 25 × \_\_ ATP について観察される異なるブロックレベルを示す図である (y 軸 = 電流 (pA) および x 軸 = (a) および (b) についての時間 (s))。a) ATP が存在しない溶液中にアプタマー (配列 25 × \_\_ ATP) が存在する場合は、レベル 1 のみが観察される。b) アプタマー (配列 25 × \_\_ ATP) および ATP が溶液中に存在する場合は、レベル 1 および 2 が検出される。レベル 2 の出現は、アプタマーと ATP との結合を示し、レベル 2 からレベル 1 への移行は、アプタマー - ATP 複合体の解離を示す。

【図 10】ATP の存在下 (b) および非存在下 (a) でアプタマー配列および 17 × 8 A \_\_ ATP について観察される異なるブロックレベルを示す図である (y 軸 = 電流 (pA) および x 軸 = (a) および (b) についての時間 (s))。a) ATP が存在しない溶液中にアプタマー (配列 17 × 8 A \_\_ ATP) が存在する場合は、レベル 3 のみが観察される。b) アプタマー (配列 17 × 8 A \_\_ ATP) および ATP が溶液中に存在する場合は、レベル 2 および 3 が検出される。レベル 2 の出現は、アプタマーと ATP との結合を示し、レベル 2 からレベル 3 への移行は、アプタマー - ATP 複合体の解離を示す。

40

【図 11】ATP 濃度と観察された事象比率 (ATP 結合および未結合を組み合わせた事象と比較した ATP 結合事象のみ) との関係を示す図である。このグラフ (y 軸 = 事象割合、x 軸 =  $\log_{10}$  ATP 濃度 ( $\mu$ M)) は、ATP 結合事象と事象の総数 (ATP 結合および未結合事象) との間の比率が ATP の濃度とともにどのように変動するかを示す。この実験において用いたプローブ配列は、17 × 8 A \_\_ ATP であった。この校正

50

グラフを用いて、試料中のATPの濃度を決定することが可能である。アプタマー17×8A\_\_ATPを用いて、漸増トロンピン濃度について以前に観察されたことと同様に、ATPの濃度が増加するにつれて、事象割合の同様の増加が観察された。しかし、ATPのKdは、マイクロモル濃度範囲にあり、よって、同様の事象割合を得るためにはより高いATP濃度が必要である。

【図12】プローブのアレイをどのようにして用いて、同じ実験において1つより多い分析物を検出できるかを強調する図である。3つ全ての分析物、ATP(ATPアプタマーのみ=1、ATPと結合したATPアプタマー=2)、PDGF(PDGFアプタマーのみ=3、PDGFと結合したPDGFアプタマー=4)(拡大バージョンを(b)に示す)、およびトロンピン(トロンピンアプタマーのみ=5、トロンピンと結合したトロンピンアプタマー=6)についての結合および未結合アプタマーシグナルをとともに観察することが可能である。異なる分析物は、それらの特徴的なブロックレベルおよびシグナル形状から検出できる。y軸=トレースパターンa)およびb)についてのpAでの電流、x軸=トレースパターンa)およびb)についての時間((a)についての合計トレース時間=4秒およびb)についての合計トレース時間=0.1秒)。

10

【図13】理論的に算出した値(黒線で示す)および実験で観察された値(灰色のバーチャートで示す)の校正プロット(トロンピン濃度(nM)(x軸)に対する事象比率(y軸))を示す図である。理論的値が、実験で決定された値と密接に一致することがグラフから明らかである。

【図14】ストレプトアビジンの存在下(b)および非存在下(a)でアプタマー配列strepプローブ1(配列番号24)について観察される異なるブロックレベルを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=(a)および(b)についての時間(s))。a)ストレプトアビジンが存在しない溶液中にアプタマー(strepプローブ1)が存在する場合は、レベル1のみが観察される。b)アプタマー(strepプローブ1)およびストレプトアビジンが溶液中に存在する場合は、レベル2が検出される。

20

【図15】ストレプトアビジンの存在下(2)および非存在下(1)でアプタマー配列strepプローブ1(配列番号24)について観察される異なるブロックレベルの拡大図である(y軸=電流(pA)およびx軸=(a)および(b)についての時間(s))。このデータは、表示の目的のためにBesselフィルタにかけた。

【図16】K2 EDTA(Harlan Scientific、コード-S.B-0009)80%緩衝剤(625mM KCl、100mM HEPES、75mMフェロシアン化カリウム、25mMフェリシアン化カリウムpH8.0)中の20%ウサギ全血溶液中のトロンピンの存在下でアプタマー配列27×3A\_\_TBAについて観察された例示的なブロックレベルを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=時間(s))。アプタマー(配列27×3A\_\_TBA)およびトロンピンが溶液中に存在する場合は、レベル1および2が検出される。レベル2の出現は、アプタマーとトロンピンとの結合を示し、レベル2からレベル1への移行は、アプタマー-トロンピン複合体の解離を示す。

30

【図17】K2 EDTA(Harlan Scientific、コード-S.B-0009)80%緩衝剤(625mM KCl、100mM HEPES、75mMフェロシアン化カリウム、25mMフェリシアン化カリウムpH8.0)中の20%ウサギ全血溶液中のPDGFの存在下でアプタマー配列17×8A\_\_PDGFについて観察された例示的なブロックレベルを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=時間(s))。アプタマー(配列17×8A\_\_PDGF)およびPDGFが溶液中に存在する場合は、レベル1および2が検出される。レベル2の出現は、アプタマーとPDGFとの結合を示し、レベル2からレベル1への移行は、アプタマー-PDGF複合体の解離を示す。

40

【図18】K2 EDTA(Harlan Scientific、コード-S.B-0009)80%緩衝剤(625mM KCl、100mM HEPES、75mMフェロシアン化カリウム、25mMフェリシアン化カリウムpH8.0)中の20%ウサギ全血溶液中のATPの存在下でアプタマー配列25×\_\_ATPについて観察された例示的なブロックレベルを示す図である(y軸=電流(pA)およびx軸=時間(s))。アプタマ

50

ー（配列25×\_\_ATP）およびATPが溶液中に存在する場合は、レベル1および2が検出される。レベル2の出現は、アプタマーとATPとの結合を示し、レベル2からレベル1への移行は、アプタマー - ATP複合体の解離を示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

開示する生成物および方法の異なる用途を、当該技術における具体的な必要性に応じて仕立てることができることが理解される。本明細書において用いる用語は、本発明の特定の実施形態を説明する目的だけのためであり、限定することを意図しないことも理解される。

【0008】

さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明確にそうでないことを指図しない限り、複数形のものを含む。よって、「孔（a pore）」に対する言及は、2つ以上のそのような孔を含み、「尾部（a tail）」に対する言及は、2つ以上のそのような尾部を含み、「ポリヌクレオチド（a polynucleotide）」に対する言及は、2つ以上のそのようなポリヌクレオチドを含む、などである。

【0009】

本明細書の上または下に引用する全ての出版物、特許および特許出願は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0010】

本発明の方法

本発明は、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を提供する。従って、本発明は、分析物の群の各分析物メンバーについての多重アッセイに関する。群中の2つ以上の分析物は、予め決定されるよって、。本発明は、具体的で予め決定された分析物の群の各分析物メンバーについての多重アッセイに関する。

【0011】

本方法は、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を含む。パネル中の各または全てのプローブは、分析物メンバーの1つまたは複数を確認し、(i) 1つまたは複数の分析物メンバーと結合するアプタマーと、(ii) 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む。言い換えると、各または全てのプローブ中の尾部は、アプタマーが分析物メンバーの1つと結合していない場合に孔を流れる電流にある方式で影響し、アプタマーが分析物メンバーと結合している場合に孔を流れる電流に異なる方式で影響する。このことは、以下でより詳細に論じる。パネル中の各または全てのプローブは、孔を流れる電流に示差的な様式でも影響する。このことにより、パネル中の特定のプローブを同定できる。プローブの正体および分析物メンバーとのその結合はともに測定できるので、該分析物メンバーの存在を決定できる。2つ以上の分析物の群の各または全ての分析物メンバーは、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。

【0012】

本方法は、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も含む。電流は、当該技術において既知の任意の方法を用いて測定してよい。具体的な方法は、以下で論じる。

【0013】

ステップ(a)および(b)は、好ましくは、孔を横切って印加した電位を用いて行う。印加する電位は、電圧電位であってよい。代わりに、印加する電位は、化学電位であってよい。このことの例は、両親媒性の層を横切る塩勾配を用いることである。塩勾配は、Holdenら、J Am Chem Soc. 2007年7月11日 ; 129(27) : 8650~5に開示されている。

10

20

30

40

50

## 【0014】

本方法は、いくつかの利点を有する。本方法は、高い特異性をいまだに有しながら、現存するタンパク質アッセイと比較して迅速かつ安価である。アプタマーを含有するプローブは、例えば抗体と比較して、調製するのが速かつ安価である。アッセイからの出力は、リアルタイムで分析されるので、十分な情報が得られたときにアッセイを停止できる。本方法は、最小限の試料調製または試料調製なしで、単一の試料から複数の分析物の検出を可能にし、例えば、試料は、患者から直接得られた血液であることができるので、最小限の訓練を受けたかまたは資格を有する他人が方法を行うことができる。方法を用いて、単一試料から多くの分析物を検出でき、よって、単一試料に対して複数の試験を行う必要がなく、分析物の数は、作製できるプローブの多様性および示差的な尾部の数によってのみ制限される。本方法は、全般的に、未結合のアプタマーおよび未結合の分析物の存在下で、洗浄ステップまたは未結合物体の除去を必要とすることなく行われる。

10

## 【0015】

試料

試料は、任意の適切な試料であってよい。本発明は、2つ以上の分析物を含有することがわかっているかまたは含有することが疑われる試料に対して典型的に行われる。本発明は、その正体がわかっていない2つ以上の分析物を含有する試料に対して行うことができる。代わりに、本発明は、試料に対して行って、試料中のその存在がわかっているかまたは期待される2つ以上の分析物の正体を確認することができる。

## 【0016】

試料は、生体試料であってよい。本発明は、任意の生物または微生物から得られたかまたは抽出された試料に対して *in vitro* で行ってよい。生物または微生物は、典型的に、古細菌、原核生物または真核生物であり、典型的に、5界：植物界、動物界、真菌、原核生物界および原生生物界のうちの1つに属する。本発明は、任意のウイルスから得られたかまたは抽出された試料に対して *in vitro* で行ってよい。試料は、好ましくは、流体試料である。試料は、典型的に、患者の体液を含む。試料は、尿、リンパ液、唾液、粘液または羊膜液であってよいが、好ましくは血液、血漿または血清である。典型的に、試料は、ヒトを起源とするが、代わりに、試料は、ウマ、ウシ、ヒツジもしくはブタのように商業的に飼育される動物などの別の哺乳動物からであってよいが、または代わりにネコもしくはイヌなどのペットであってよい。代わりに、植物起源の試料は、典型的に、穀類、マメ科植物、果実または野菜、例えばコムギ、オオムギ、オーツ、キャノーラ、トウモロコシ、ダイズ、コメ、バナナ、リンゴ、トマト、ジャガイモ、ブドウ、タバコ、インゲンマメ、レンズマメ、サトウキビ、カカオ、綿、茶、コーヒーなどの商業的作物から得られる。

20

30

## 【0017】

試料は、非生体試料であってよい。非生体試料は、好ましくは、流体試料である。非生体試料の例は、外科的流体、飲用水、海水または川水などの水、および実験室試験のための試薬を含む。

## 【0018】

試料は、典型的に、例えば遠心分離または赤血球などの不要な分子もしくは細胞をろ去するメンブレンを通すことにより、アッセイする前に処理される。試料は、採取して直ちに測定してよい。試料は、典型的に、アッセイの前に好ましくは -70 未満で貯蔵してもよい。

40

## 【0019】

分析物

本発明の方法は、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ためである。2つ以上の分析物の群は、2、5、10、15、20、30、40、50、100以上の分析物などの任意の数の分析物を含んでよい。群は、好ましくは、約5から約80までの分析物、約10から約60までの分析物または約20から約50までの分析物などの約4から約100までの分析物を有する。

50

## 【0020】

分析物メンバーの1つまたは複数の存在または非存在が決定される。言い換えると、2つ以上の分析物の群について、本方法は、群中の分析物メンバーのそれぞれが存在するかまたは非存在であるかを決定する。分析物メンバーの2、5、10、15、20、30、40、50、100以上などの1つまたは複数が存在することがあり、群中の他の分析物メンバーの全てが非存在であることがある。分析物メンバーの全てが存在することがある。分析物メンバーのいずれも存在しないことがある（すなわち、分析物メンバーの全てが非存在であることがある）。存在する分析物メンバーの数および非存在の数は、本発明の方法を用いて決定される。

## 【0021】

2つ以上の分析物は、好ましくは、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。群は、2つ以上のタンパク質、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上の医薬品などの同じ型の2つ以上の分析物を含むことができる。代わりに、群は、1つまたは複数のタンパク質、1つまたは複数のヌクレオチドおよび1つまたは複数の医薬品などの異なる型の2つ以上の分析物を含むことができる。

## 【0022】

群中の2つ以上の分析物は、細胞から分泌された分析物であり得る。代わりに、2つ以上の分析物は、本発明を行うことができる前に細胞から分析物メンバーを抽出しなければならないように、細胞の内部に存在する分析物であり得る。

## 【0023】

群中の2つ以上の分析物は、好ましくは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドおよび/またはタンパク質から選択される。アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、自然に存在するかまたは自然に存在しないものであり得る。ポリペプチドまたはタンパク質は、合成または改変アミノ酸をその中に含むことができる。アミノ酸に対する多くの異なる型の改変が当該技術において既知である。適切なアミノ酸およびその改変は、膜貫通孔に関して以下で論じる。本発明の目的のために、分析物は、当該技術において利用可能な任意の方法により改変できることが理解される。

## 【0024】

タンパク質は、酵素、抗体、ホルモン、バイオマーカー、増殖因子またはサイトカインなどの増殖調節タンパク質であり得る。サイトカインは、インターロイキン、好ましくはIFN-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12およびIL-13、インターフェロン、好ましくはIL- およびTNF- などのその他のサイトカインから選択してよい。タンパク質は、細菌タンパク質、真菌タンパク質、ウイルスタンパク質または寄生生物由来タンパク質であってよい。

## 【0025】

2つ以上の分析物は、好ましくは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドから選択される。ヌクレオチドは、典型的に、ヌクレオ塩基、糖および少なくとも1つのリン酸基を含有する。ヌクレオ塩基は、典型的に、複素環式である。ヌクレオ塩基は、それらに限定されないが、プリンおよびピリミジン、より具体的にはアデニン、グアニン、チミン、ウラシルおよびシトシンを含む。糖は、典型的に、5炭糖である。ヌクレオチド糖は、それらに限定されないが、リボースおよびデオキシリボースを含む。ヌクレオチドは、典型的に、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、典型的に、1リン酸、2リン酸または3リン酸を含有する。リン酸は、ヌクレオチドの5'または3'側に付着してよい。

## 【0026】

ヌクレオチドは、それらに限定されないが、アデノシン1リン酸(AMP)、アデノシン2リン酸(ADP)、アデノシン3リン酸(ATP)、グアノシン1リン酸(GMP)、グアノシン2リン酸(GDP)、グアノシン3リン酸(GTP)、チミジン1リン酸(

10

20

30

40

50

TMP)、チミジン2リン酸(TDP)、チミジン3リン酸(TTP)、ウリジン1リン酸(UMP)、ウリジン2リン酸(UDP)、ウリジン3リン酸(UTP)、シチジン1リン酸(CMP)、シチジン2リン酸(CDP)、シチジン3リン酸(CTP)、5-メチルシチジン1リン酸、5-メチルシチジン2リン酸、5-メチルシチジン3リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン1リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン2リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン3リン酸、サイクリックアデノシン1リン酸(cAMP)、サイクリックグアノシン1リン酸(cGMP)、デオキシアデノシン1リン酸(dAMP)、デオキシアデノシン2リン酸(dADP)、デオキシアデノシン3リン酸(dATP)、デオキシグアノシン1リン酸(dGMP)、デオキシグアノシン2リン酸(dGDP)、デオキシグアノシン3リン酸(dGTP)、デオキシチミジン1リン酸(dTMP)、デオキシチミジン2リン酸(dTDP)、デオキシチミジン3リン酸(dTTP)、デオキシウリジン1リン酸(dUMP)、デオキシウリジン2リン酸(dUDP)、デオキシウリジン3リン酸(dUTP)、デオキシシチジン1リン酸(dCMP)、デオキシシチジン2リン酸(dCDP)およびデオキシシチジン3リン酸(dCTP)、5-メチル-2'-デオキシシチジン1リン酸、5-メチル-2'-デオキシシチジン2リン酸、5-メチル-2'-デオキシシチジン3リン酸、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン1リン酸、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン2リン酸ならびに5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン3リン酸を含む。ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMPまたはdCMPから選択される。ヌクレオチドは、脱塩基(すなわちヌクレオ塩基を欠く)であってよい。ヌクレオチドは、さらなる改変を含有してよい。特に、適切な改変ヌクレオチドは、それらに限定されないが、2'-アミノピリミジン(例えば2'-アミノシチジンおよび2'-アミノウリジン)、2'-ヒドロキシルプリン(例えば2'-フルオロピリミジン(例えば2'-フルオロシチジンおよび2'-フルオロウリジン)、ヒドロキシルピリミジン(例えば5'-P-ボラウリジン)、2'-O-メチルヌクレオチド(例えば2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-O-メチルウリジン)、4'-チオピリミジン(例えば4'-チオウリジンおよび4'-チオシチジン)を含み、ヌクレオチドは、ヌクレオ塩基の改変(例えば5-ペンチニル-2'-デオキシウリジン、5-(3-アミノプロピル)-ウリジンおよび1,6-ジアミノヘキシル-N-5-カルバモイルメチルウリジン)を有する。

#### 【0027】

オリゴヌクレオチドは、40以下、30以下、20以下、10以下または5以下のヌクレオチドなどの50以下のヌクレオチドを典型的に有する短いヌクレオチド重合体である。オリゴヌクレオチドは、脱塩基および改変ヌクレオチドを含む、上記の任意のヌクレオチドを含んでよい。

#### 【0028】

ポリヌクレオチドは、1本鎖または2本鎖であってよい。ポリヌクレオチドの少なくとも一部は、2本鎖であってよい。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)などの核酸であり得る。ポリヌクレオチドは、1本の鎖のDNAとハイブリダイズした1本の鎖のRNAを含むことができる。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸(PNA)、グリセロール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ロックド核酸(LNA)などの当該技術において既知の任意の合成核酸、またはヌクレオチド側鎖を有するその他の合成重合体であってよい。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチドを含む、上記の任意のヌクレオチドを含んでよい。

#### 【0029】

ポリヌクレオチドは、任意の長さであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500ヌクレオチドまたはヌクレオチド対の長さであり得る。ポリヌクレオチドは、1000以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対、5000以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対

10

20

30

40

50

の長さ、または10000以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対の長さであり得る。

【0030】

2つ以上の分析物の群は、分析物の任意の群であってよい。例えば、群は、特定の表現型と関連してよい。群は、特定の細胞の型と関連してよい。例えば、群は、細菌細胞を示すものであってよい。群は、ウイルス、真菌または寄生生物を示すものであってよい。群は、レクリエーションドラッグ（例えばSAMHSA 5パネル試験）、爆発物または環境汚染物質の具体的なパネルであってよい。

【0031】

2つ以上の分析物の群は、好ましくは、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。バイオマーカーは、タンパク質またはポリヌクレオチドなどの上記の任意の分析物であってよい。バイオマーカーの適切なパネルは、当該技術において既知であり、例えばEdwards, A.V.G.ら(2008) Mol. Cell. Proteomics 7、1824~1837頁; Jacquet, S.ら(2009)、Mol. Cell. Proteomics 8、2687~2699頁; Anderson N.L.ら(2010) Clin. Chem. 56、177~185頁に記載されるとおりである。疾患または状態は、好ましくは、がん、冠動脈心疾患、循環器疾患または敗血症である。

【0032】

以下でより詳細に論じるように、群は、同じクラスの2つ以上の分析物を含んでよい。分析物は、それらが構造的類似性を有するならば、同じクラス内にある。分析物がタンパク質である場合、これらが同じタンパク質構造分類(SCOP)の分類中にあるならば、同じクラス内である。分析物は、それらが機能的に関連するかまたは系統学的に関連するならば、同じクラス内である。例えば、ヘロイン、コデインおよびモルヒネなどのオピエートは、同じ分析物のクラス内にあると考えることができる。同様に、IL-1、IL-1およびIL-1RAなどのインターロイキン1の異なる形は、同じ分析物のクラス内にあると考えることができる。本発明の関係では、分析物のクラスは、典型的に、構造的に異なるが1つのアプタマーと結合できる2つ以上の分析物である。本方法は、好ましくは、ある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少なくとも1つのプローブの使用を含む。例えば、このような実施形態は、試料中の1つまたは複数のIL-1分析物の存在または非存在の決定を可能にする。特定のクラス内の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検出できることは、利点を有する。例えば、初期の多重アッセイを、多様なクラスの分析物について行ってよい。1つまたはそれ以上のクラスの存在が一旦決定されると、これらのクラスと関連するより特異的な多重アッセイを行って、各クラス内の分析物メンバーの1つまたは複数の存在または非存在を決定してよい。

【0033】

膜貫通孔

本発明の方法は、試料を膜貫通タンパク質孔と接触させるステップを含む。膜貫通孔は、印加された電位により駆動される水和イオンが膜の一方の側から膜の他方の側へと流れることを可能にする構造である。

【0034】

任意の膜を本発明に従って用いてよい。適切な膜は、当該技術において公知である。膜は、好ましくは、両親媒性の層である。両親媒性の層は、少なくとも1つの親水性部分と少なくとも1つの親油性または疎水性部分とをともに有するリン脂質などの両親媒性分子から形成される層である。両親媒性分子は、合成または自然に存在するものであってよい。自然に存在しない両親媒性物質および単層を形成する両親媒性物質は、当該技術において既知であり、例えばブロック共重合体を含む(Gonzalez-Perezら、Langmuir、2009、25、10447~10450頁)。ブロック共重合体は、2つ以上の単量体サブユニットが一緒に重合されて単一重合体鎖を創出する重合体材料である。ブロック共重合体は、各単量体サブユニットが寄与する特性を典型的に有する。しかし、ブロック共重合体は、個別のサブユニットから形成された重合体が有さない独自の特性を有することがある。ブロック共重合体

10

20

30

40

50

は、単量体サブユニットの1つが疎水性（すなわち親油性）であるが、他のサブユニット（複数可）が水性媒体中で親水性であるように工学的に操作できる。この場合、ブロック共重合体は、両親媒性の特性を有してよく、生体膜を模倣する構造を形成してよい。ブロック共重合体は、ジブロック（2つの単量体サブユニットからなる）であってよいが、2つより多い単量体サブユニットから構築されて、両親媒性物質として挙動するより複雑な配置を形成してもよい。共重合体は、トリブロック、テトラブロックまたはペンタブロック共重合体であってよい。

【0035】

両親媒性の層は、単層または2重層であってよい。両親媒性の層は、典型的に、平面状脂質2重層または支持2重層である。

10

【0036】

両親媒性の層は、典型的に、脂質2重層である。脂質2重層は、細胞膜のモデルであり、ある範囲の実験的研究のための優れたプラットフォームを提供する。例えば、脂質2重層は、単一チャンネル記録による膜タンパク質の *in vitro* 調査のために用いることができる。代わりに、脂質2重層は、バイオセンサとして用いて、ある範囲の物質の存在を検出できる。脂質2重層は、任意の脂質2重層であってよい。適切な脂質2重層は、それらに限定されないが、平面状脂質2重層、支持2重層またはリポソームを含む。脂質2重層は、好ましくは、平面状脂質2重層である。適切な脂質2重層は、国際出願第PCT/GB08/000563号(WO2008/102121として公開)、国際出願第PCT/GB08/004127号(WO2009/077734として公開)および国際出願第PCT/GB2006/001057号(WO2006/100484として公開)に開示されている。

20

【0037】

脂質2重層を形成するための方法は、当該技術において既知である。適切な方法を、実施例に開示する。脂質2重層は、MontalおよびMueller(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1972; 69: 3561~3566頁)の方法により一般的に形成され、該方法では、脂質単層が、水溶液/空気界面に垂直な開口のいずれかの側を通過した水溶液/空気界面に担持される。

【0038】

MontalおよびMuellerの方法は、タンパク質孔挿入のために適切な良質の脂質2重層を形成する経済的に有利で比較的単純な方法であるので、受け入れられている。2重層形成の他の一般的な方法は、2重層の先端浸漬、塗装およびリポソーム2重層のパッチクランプを含む。

30

【0039】

好ましい実施形態では、脂質2重層は、国際出願第PCT/GB08/004127号(WO2009/077734として公開)に記載されるようにして形成される。

【0040】

別の好ましい実施形態では、膜は、固体状態層である。固体状態層は、生体起源ではない。言い換えると、固体状態層は、生物または細胞などの生体環境または生物学的に入手可能な構造の合成されたバージョンに由来するものでもそこから単離されたものでもない。固体状態層は、超小型電子技術材料、 $Si_3N_4$ 、 $Al_2O_3$ および $SiO$ などの絶縁材料、ポリアミドなどの有機および無機重合体、Teflon(登録商標)などのプラスチック、または2液付加硬化型シリコンゴムなどのエラストマーならびにガラスを含む有機および無機の両方の材料から形成できるが、それらに限定されるものではない。固体状態層は、グラフェンなどの単原子層または数原子の厚さだけの層から形成できる。適切なグラフェン層は、国際出願第PCT/US2008/010637号(WO2009/035647として公開)に開示されている。両親媒性の層は、固体状態孔を横切って形成してよい。これは、当該技術において、ハイブリッド孔形成として記載されることがある(Hallら、Nat Nanotechnol., 2010, 5, 874~877頁)。本方法は、(i)孔を含む人工の両親媒性の層、(ii)孔を含む単離された自然に存在する脂質2重層または(iii)孔が挿入された細胞を用いて典型的に行われる。本方法は、人工脂質2重層などの人

40

50

工の両親媒性の層を用いて典型的に行われる。層は、その他の膜貫通および/または膜内タンパク質ならびにその他の分子を孔に加えて含んでよい。適切な装置および条件は、以下に論じる。本発明の方法は、典型的に、*in vitro*で行われる。

【0041】

パネル中のプローブの1つまたは複数は、好ましくは膜にカップリングされている。パネル中の各プローブは、より好ましくは、膜にカップリングされている。このことは、任意の既知の方法を用いて行ってよい。膜が脂質2重層(上で詳細に論じるような)などの両親媒性の層であるならば、プローブは、好ましくは、膜中に存在するポリペプチドまたは膜中に存在する疎水性アンカーを介して膜にカップリングされる。疎水性アンカーは、好ましくは脂質、脂肪酸、ステロール、カーボンナノチューブまたはアミノ酸である。

10

【0042】

プローブは、膜に直接カップリングされてよい。プローブは、好ましくは、リンカーを介して膜にカップリングされる。好ましいリンカーは、それらに限定されないが、ポリヌクレオチド、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリペプチドなどの重合体を含む。

【0043】

カップリングは、安定的または一過的であってよい。あるいくつかの用途について、一過的な性質のカップリングが好ましい。一過的なカップリングは、永続的な遮断を最小限にして、データがより短時間で蓄積されるようにする。なぜなら、孔の遮断を手動で解除するために時間をロスしないからである。永続的なカップリングを用いる場合、両親媒性の層を不安定化でき、そうでなければ、繫留されたアダプターがシス側に蓄積されて、実験の平衡を変える原因になる。これらの影響は、一過的にカップリングさせることにより最小限にできる。膜と安定的または一過的な連結を形成する化学基については、以下でより詳細に論じる。プローブは、脂質2重層などの両親媒性の層に、コレステロールまたは脂肪酸アシル鎖を用いて一過的にカップリングさせることができる。ヘキサデカン酸などの約6から約30までの炭素原子の長さを有する任意の脂肪酸アシル鎖を用いることができる。

20

【0044】

好ましい実施形態では、1つまたは複数のプローブまたは各プローブは、両親媒性の層にカップリングされる。合成脂質2重層とのカップリングは、様々な異なる繫留方策を用いて以前に行われている。これらを以下の表1にまとめる。

30

【0045】

【表1】

表1

付着基	カップリングの型	参考文献
チオール	安定的	Yoshina-Ishii, C.およびS. G. Boxer (2003). 「Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers.」 <i>J Am Chem Soc</i> <b>125</b> (13):3696~7頁。
ビオチン	安定的	Nikolov, V., R. Lipowskyら(2007). 「Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules.」 <i>Biophys J</i> <b>92</b> (12):4356~68頁
コレステロール(Cholesterol)	一過的	Pfeiffer, I.およびF. Hook (2004). 「Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies.」 <i>J Am Chem Soc</i> <b>126</b> (33):10224~5頁
脂質	安定的	van Lengerich, B., R. J. Rawleら 「Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions.」 <i>Langmuir</i> <b>26</b> (11):8666~72頁

10

## 【0046】

20

プローブは、合成反応において改変ホスホロアミダイトを用いて官能化してよく、改変ホスホロアミダイトは、チオール、コレステロール、脂質およびビオチン基などの反応性基の付加に容易に適合できる。これらの異なる付着化学は、プローブのための一連の付着オプションを提供する。異なる各改変基は、わずかに異なる方式でプローブを繫留し、カップリングは、常に永続的ではなく、よって、プローブは、2重層での異なる滞留時間を有する。

## 【0047】

プローブのカップリングは、反応性基をプローブに付加できることを条件として、いくつかの他の手段により達成することもできる。DNAのいずれかの端への反応性基の付加は、以前に報告されている。チオール基をssDNAの5'に、ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPを用いて付加できる(Grant, G. P.およびP. Z. Qin (2007). 「A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids.」 *Nucleic Acids Res* **35**(10):e77)。ビオチン、チオールおよび蛍光団などのより多様な選択の化学基を、末端転移酵素を用いて付加して、改変オリゴヌクレオチドをssDNAの3'に組み込むことができる(Kumar, A., P. Tchenら(1988). 「Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase.」 *Anal Biochem* **169**(2):376~82頁)。

30

## 【0048】

代わりに、反応性基は、2重層に既にカップリングされているものに相補的な短いDNA片の付加とみなすことができ、よって、付着は、ハイブリダイゼーションにより達成できる。T4 RNAリガーゼIを用いる短いssDNA片のライゲーションが、報告されている(Troutt, A. B., M. G. McHeyzer-Williamsら(1992). 「Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity.」 *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20):9823~5頁)。代わりに、ssDNAまたはdsDNAのいずれかを未変性dsDNAにライゲーションし、次いで、2つの鎖を熱または化学変性により分けることができる。未変性dsDNAには、2重鎖の一方もしくは両方の端にssDNA片または一方もしくは両方の端にdsDNAを付加できる。次いで、2重鎖を融解させた場合に、各1本鎖は、ssDNAをライゲーションのために用いたときは5'または3'改変のいずれかを有し、dsDNAをライゲーションのために用いたときは5'端、3'端またはその両方に改変を有する。プローブが合成ポリヌクレオチドを含むならば、カップ

40

50

リング化学を、プローブの化学合成中に組み込むことができる。例えば、プローブは、反応性基が付着したプライマーを用いて合成できる。

【0049】

ゲノムDNAの区画の増幅のための一般的な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる。この技術では、2つの合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、DNAの同じ区画の多くのコピーを作製でき、ここで、各コピーについて、2重鎖の各鎖の5'端は、合成ポリヌクレオチドになる。コレステロール、チオール、ビオチンまたは脂質などの反応性基を有するアンチセンスプライマーを用いることにより、増幅された標的DNAの各コピーは、カップリングのための反応性基を含有することになる。

【0050】

膜貫通孔が下記のような膜貫通タンパク質孔であるならば、パネル中のプローブは、好ましくは、孔にカップリングされない。孔がタンパク質孔であるならば、パネル中のプローブは、より好ましくは、孔と共有結合的に付着しない。

【0051】

膜貫通孔は、一般的に、前庭(vestibule)とバレルまたはチャンネルとを含む。バレルまたはチャンネルは、典型的に、実質的に円筒形の通路であり、その中を、水和イオンが膜を横切って流れることができる。前庭は、典型的に、バレルまたはチャンネルへの入口を形成し、バレルまたはチャンネルとは異なる横断面積を有する。典型的に、前庭は、バレルよりも大きい横断面積を有する。前庭とバレルまたはチャンネルとを有する孔の良好な例は、  
- 溶血素(-HL)であり、これについては、以下でより詳細に論じる。前庭とバレルまたはチャンネルとを含む孔は、固体状態層中で形成できる。前庭は、存在することが好ましい。なぜなら、前庭は、以下でより詳細に論じるように本発明の方法を容易にするからである。

【0052】

バレルまたはチャンネルは、任意の幅を有することができる。典型的に、バレルまたはチャンネルは、各プローブの尾部がバレルまたはチャンネルに侵入して、孔を流れる電流に影響できるように十分に幅が広い。以下でより詳細に論じるように、尾部は、好ましくは、重合体を含む。バレルまたはチャンネルは、好ましくは、重合体がバレルまたはチャンネルに侵入して、孔を流れる電流に影響できるように十分に幅が広い。いくつかの場合では、尾部は、ポリヌクレオチドを含むことができる。バレルまたはチャンネルは、好ましくは、1本鎖ポリヌクレオチドが孔に侵入して孔を通過できるが、2本鎖ポリヌクレオチドが孔に侵入できず孔を通過できないように十分に狭い。

【0053】

以下でより詳細に論じる理由のために、前庭は、典型的に、プローブのパネル中の各アプタマーが侵入できるように十分に幅が広いが、各アプタマー/分析物メンバー複合体が侵入することを妨げるように十分に狭い。前庭およびバレルまたはチャンネルは、それぞれ、典型的に、少なくとも2ヌクレオチド、例えば合計で少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20ヌクレオチド、例えば少なくとも8を前庭に、かつ少なくとも12をバレルに含有するように十分に長い。

【0054】

膜貫通孔は、好ましくは、膜貫通タンパク質孔である。膜貫通タンパク質孔は、分析物などの水和イオンが膜の一方の側から膜の他方の側まで流れることを可能にするポリペプチドまたはポリペプチドの収集物である。本発明では、膜貫通タンパク質孔は、印加された電位により駆動される水和イオンが膜の一方の側から他方の側まで流れることを可能にする孔を形成できる。膜貫通タンパク質孔は、下記のように、脂質2重層などの膜の一方の側から他方の側までプローブが流れることを可能にする。膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、ssDNAまたはRNAなどの1本鎖ポリヌクレオチドが孔を通過して移動することを可能にする。

【0055】

膜貫通タンパク質孔は、単量体またはオリゴマーであってよい。孔は、好ましくは、6

10

20

30

40

50

、7、8または9サブユニットなどのいくつかの反復サブユニットで作られる。孔は、好ましくは、6量体、7量体、8量体または9量体孔である。

【0056】

膜貫通タンパク質孔は、典型的に、そこを通過してイオンが流れることができるバレルまたはチャンネルを含む。孔のサブユニットは、典型的に、中心軸を取り囲み、その鎖が、膜貫通バレルもしくはチャンネルまたは膜貫通ヘリックス束もしくはチャンネルに寄与する。

【0057】

膜貫通タンパク質孔のバレルまたはチャンネルは、典型的に、尾部中の重合体単位のように、尾部との相互作用を容易にするアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、好ましくは、バレルまたはチャンネルのくびれ付近にある。膜貫通タンパク質孔は、典型的に、アルギニン、リシンもしくはヒスチジンなどの1つもしくは複数の正荷電アミノ酸またはチロシンもしくはトリプトファンなどの芳香族アミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、典型的に、孔と尾部中のヌクレオチドなどの負荷電重合体単位との間の相互作用を容易にする。

【0058】

本発明に従って用いるための膜貫通タンパク質孔は、 $\alpha$ -バレル孔または $\beta$ -ヘリックス束孔に由来できる。 $\alpha$ -バレル孔は、 $\alpha$ -鎖から形成されるバレルまたはチャンネルを含む。適切な $\alpha$ -バレル孔は、それらに限定されないが、 $\alpha$ -溶血素、炭疽毒素およびロイコシジンなどの $\alpha$ -毒素およびスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) ポリン (M s p)、例えばM s p Aなどの細菌の外膜タンパク質/ポリン、外膜ホスホリパーゼAならびに

ナイセリア (*Neisseria*) オートトランスポーターリポタンパク質 (N a l P) を含む。 $\beta$ -ヘリックス束孔は、 $\beta$ -ヘリックスから形成されるバレルまたはチャンネルを含む。適切な $\beta$ -ヘリックス束孔は、それらに限定されないが、内膜タンパク質ならびにW Z AおよびC l y A毒素などの外膜タンパク質を含む。膜貫通孔は、好ましくは、 $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -H L) またはロイコシジンに由来する。

【0059】

孔は、ホモオリゴマー (全ての単量体単位が同一) またはヘテロオリゴマー (2つ以上の異なる型の単量体) であってよい。孔は、連結された単量体、例えば2量体を含んでよい。

【0060】

孔は、少なくとも1つの2量体と、1、2、3、4、5、6、7または8つの単量体とを含んでよい。孔は、2、3、4つ以上の2量体を含んでよい。このような孔は、孔を形成するために十分な単量体をさらに含む。さらなる孔は、2量体だけを含み、例えば、孔は、4、5、6、7または8つの2量体を含んでよい。本発明に従う具体的な孔は、4つの2量体を含む。2量体は、2量体のうちの一方の単量体だけが孔のバレルまたは前庭に寄与するような構造を有する孔になるようにオリゴマー形成できる。典型的に、構築物の他の単量体は、孔のバレルまたは前庭の外側にある。例えば、孔は、5、6、7または8つの2量体を含んでよく、バレルまたは前庭は、8つの単量体を含む。

【0061】

膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、 $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -H L) に由来する。野生型 $\alpha$ -H L孔は、7つの同一の単量体またはサブユニットで形成される (すなわち、これは7量体である)。膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、 $\alpha$ -H Lに由来する7つの単量体を含む。 $\alpha$ -溶血素-N N (すなわち $\alpha$ -H Lに由来する孔) の1つの単量体またはサブユニットの配列を、配列番号2に示す。 $\alpha$ -溶血素-N Nは、置換E 1 1 1 NおよびK 1 4 7 Nを含有する。膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、7つの単量体を含み、そのそれぞれは、配列番号2に示す配列またはそのバリエーションを含む。配列番号4のアミノ酸1、7~21、31~34、45~51、63~66、72、92~97、104~111、124~136、149~153、160~164、173~206、210~213、217、218、223~228、236~242、262~265、272~274、287~290および294は、ループ領域を形成する。配列番号2の残基113および14

10

20

30

40

50

7は、 - H L のバレルまたはチャネルのくびれの一部を形成する。

【 0 0 6 2 】

孔は、好ましくは、7つのタンパク質または単量体を含み、そのそれぞれは配列番号2に示す配列またはそのバリエーションを含む。膜貫通タンパク質は、好ましくは、(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つもしくは複数または全てが配列番号2のバリエーションであり、孔活性を維持する前記バリエーションで形成される。7つのタンパク質は、同じ(ホモ7量体)または異なる(ヘテロ7量体)ことがある。

【 0 0 6 3 】

配列番号2のバリエーションは、配列番号2のアミノ酸配列から変動したアミノ酸配列を有し、その孔形成能力を維持するタンパク質である。孔を形成するバリエーションの能力は、当該技術において既知の任意の方法を用いてアッセイできる。例えば、バリエーションをその他の適当なサブユニットとともに脂質2重層などの両親媒性の層に挿入し、オリゴマー形成して孔を形成するその能力を決定できる。脂質2重層などの両親媒性の層にサブユニットを挿入するための方法は、当該技術において既知である。例えば、サブユニットは、脂質2重層に拡散し、脂質2重層と結合して機能的な状態に集合することにより挿入されるように脂質2重層を含有する溶液に精製形で懸濁できる。代わりに、サブユニットは、M.A. Holden, H. Bayley. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6502~6503頁および国際出願第PCT/GB2006/001057号(WO2006/100484として公開)に記載される「ピックアッププレス」法を用いて膜に直接挿入してもよい。

【 0 0 6 4 】

配列番号2のある好ましいバリエーションは、野生型サブユニット、すなわち111位にてEが置き換えられ、147位にてKが置き換えられているサブユニットである。

【 0 0 6 5 】

バリエーションは、別の分子との共有結合的付着または相互作用を容易にする改変を含んでよい。バリエーションは、好ましくは、付着を容易にする1つまたは複数の反応性システイン残基を含む。例えば、バリエーションは、配列番号2の8位、9位、17位、18位、19位、44位、45位、50位、51位、237位、239位および287位ならびに/またはアミノもしくはカルボキシ末端の1つまたは複数にてシステインを含んでよい。好ましいバリエーションは、配列番号2の8位、9位、17位、237位、239位および287位の残基のシステインへの置換を含む(A8C、T9C、N17C、K237C、S239CまたはE287C)。バリエーションは、好ましくは、国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に記載されるバリエーションのいずれか1つである。

【 0 0 6 6 】

バリエーションは、ヌクレオチド、アミノ酸またはエチレンオキシドなどの尾部中の重合体単位との任意の相互作用を容易にする改変も含んでよい。

【 0 0 6 7 】

バリエーションは、生物、例えばブドウ球菌(Staphylococcus)により自然に発現される、自然に存在するバリエーションであってよい。代わりに、バリエーションは、大腸菌(Escherichia coli)などの細菌により*in vitro*または組換えにより発現できる。バリエーションは、組換え技術により生成される自然に存在しないバリエーションも含む。

【 0 0 6 8 】

配列番号2のアミノ酸配列全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、アミノ酸同一性に基いてその配列と少なくとも50%相同である。より好ましくは、バリエーションは、配列番号2のアミノ酸配列全体にわたる該配列に対するアミノ酸同一性に基いて、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少

10

20

30

40

50

なくとも95%、97%または99%相同であってよい。200以上のひと続き、例えば230、250、270または280以上の連続アミノ酸にわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性がある(「堅い相同性」(hard homology))。

【0069】

当該技術における標準的な方法を用いて相同性を決定してよい。例えば、UWGCパッケージは、BESTFITプログラムを提供し、例えばこれをそのデフォルト設定で用いて、相同性を算出できる(Devereuxら(1984) Nucleic Acids Research 12、387~395頁)。例えばAltschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290~300頁; Altschul, S.F.ら(1990) J Mol Biol 215:403~10頁に記載されるように、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムを用いて相同性を算出または配列を整列させることができる(例えば等価な残基または対応する配列を同定する(典型的に、それらのデフォルト設定で))。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通して公共で入手可能である。

10

【0070】

上記論じたものに加えて、アミノ酸置換、例えば1、2、3、4、5、10、20または30までの置換を配列番号2のアミノ酸配列に対して行ってよい。保存置換は、アミノ酸を、同様の化学構造、同様の化学的特性または同様の側鎖容積の他のアミノ酸で置き換える。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と同様の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性または電荷を有することができる。代わりに、保存置換は、既に存在する芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入してよい。保存アミノ酸変化は、当該技術において公知であり、下の表2で規定する20種の主要アミノ酸の特性に従って選択してよい。アミノ酸が同様の極性を有する場合、このことは、表3のアミノ酸側鎖についての疎水性親水性指標の尺度を参照することによっても決定できる。

20

【0071】

【表2】

表2-アミノ酸の化学的特性

Ala	脂肪族、疎水性、中性	Met	疎水性、中性
Cys	極性、疎水性、中性	Asn	極性、親水性、中性
Asp	極性、親水性、荷電(-)	Pro	疎水性、中性
Glu	極性、親水性、荷電(-)	Gln	極性、親水性、中性
Phe	芳香族、疎水性、中性	Arg	極性、親水性、荷電(+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	極性、親水性、中性
His	芳香族、極性、親水性、荷電(+)	Thr	極性、親水性、中性
Ile	脂肪族、疎水性、中性	Val	脂肪族、疎水性、中性
Lys	極性、親水性、荷電(+)	Trp	芳香族、疎水性、中性
Leu	脂肪族、疎水性、中性	Tyr	芳香族、極性、疎水性

30

40

【0072】

## 【表 3】

表3-疎水性親水性指標の尺度

側鎖	疎水性親水性指標	
Ile	4.5	
Val	4.2	
Leu	3.8	
Phe	2.8	10
Cys	2.5	
Met	1.9	
Ala	1.8	
Gly	-0.4	
Thr	-0.7	
Ser	-0.8	
Trp	-0.9	
Tyr	-1.3	
Pro	-1.6	20
His	-3.2	
Glu	-3.5	
Gln	-3.5	
Asp	-3.5	
Asn	-3.5	
Lys	-3.9	
Arg	-4.5	

## 【0073】

配列番号2のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基は、上記のポリペプチドからさらに欠失してよい。1、2、3、4、5、10、20もしくは30残基またはそれ以上までが欠失してよい。

30

## 【0074】

バリエーションは、配列番号2の断片を含んでよい。このような断片は、孔形成活性を維持する。断片は、少なくとも50、100、200または250アミノ酸の長さであってよい。このような断片を用いて孔を生成できる。断片は、好ましくは、配列番号2の孔形成ドメインを含む。断片は、典型的に、配列番号2の残基119、121、135、113および139を含む。

## 【0075】

1つまたは複数のアミノ酸を、代わりにまたはさらに、上記のポリペプチドに付加できる。配列番号2のアミノ酸配列またはそのポリペプチドバリエーションもしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に伸長をもたらすことができる。伸長は、かなり短く、例えば約1から約10までのアミノ酸の長さであってよい。代わりに、伸長は、より長く、例えば約50または約100までのアミノ酸であってよい。キャリアタンパク質を、本発明に従うアミノ酸配列と融合させてよい。

40

## 【0076】

上記のように、バリエーションは、配列番号2から変動するアミノ酸配列を有し、孔を形成するその能力を維持するポリペプチドである。バリエーションは、典型的に、孔形成を担う配列番号2の領域を含有する。 - バレルを含有する - HLの孔形成能力は、各サブユニット中の鎖によりもたらされる。配列番号2のバリエーションは、典型的に、鎖を形成す

50

る配列番号 2 中の領域を含む。鎖を形成する配列番号 2 のアミノ酸については、上記している。1 つまたは複数の改変を、得られるバリエーションが孔を形成するその能力を維持する限り、鎖を形成する配列番号 2 の領域に作製できる。配列番号 2 の鎖領域に作製できる具体的な改変については、上記している。

【0077】

配列番号 2 のバリエーションは、好ましくは、その  $\alpha$ -ヘリックスおよび/またはループ領域内に、置換、付加または欠失などの 1 つまたは複数の改変を含む。 $\alpha$ -ヘリックスおよびループを形成するアミノ酸については、上記している。

【0078】

膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、ロイコシジンにも由来する。ロイコシジンは、1 つがクラス S サブユニットで 1 つがクラス F サブユニットである 2 つの異なるサブユニットを有するヘテロオリゴマー孔である。適切なロイコシジンは、それらに限定されないが、L u k F ( H l g B ) および H l g 2 ( H l g A ) を含むガンマ溶血素 ( $\gamma$ -H L)、L u k F ( H l g B ) および L u k S ( H l g C ) を含むロイコシジン、L u k F - P V および L u k S - P V を含むロイコシジン P V、L u k E および L u k D を含む L u k E / L u k D 孔、ならびに L u k F - I および L u k S - I を含む L u k S - I / L u k F - I を含む。

【0079】

膜貫通タンパク質孔がロイコシジンである場合、これは、好ましくは、ガンマ溶血素 ( $\gamma$ -H L) に由来する。野生型  $\gamma$ -H L 孔は、8 つのサブユニットで形成され (すなわち、これは、8 量体である)、L u k F の 4 つのサブユニットと H l g 2 の 4 つのサブユニットとを含有する。L u k F の 1 つの単量体またはサブユニットの配列を、配列番号 4 に示す。H l g 2 の 1 つの単量体またはサブユニットの配列を、配列番号 6 に示す。膜貫通タンパク質孔は、好ましくは、それぞれが配列番号 4 に示す配列またはそのバリエーションを含む 4 つの単量体と、それぞれが配列番号 6 に示す配列またはそのバリエーションを含む 4 つの単量体とを含む。配列番号 4 のアミノ酸 109 ~ 147 と配列番号 6 の 103 ~ 139 とは、ループ領域を形成する。

【0080】

$\gamma$ -溶血素孔は、好ましくは、( 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  $\gamma$ -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 つもしくは複数または全てが配列番号 4 のバリエーションであり、かつ/またはサブユニットの 1 つもしくは複数または全てが配列番号 6 のバリエーションであり、かつ孔が孔活性を維持する前記バリエーションである。このような孔は、ヘテロ 8 量体である。

【0081】

配列番号 4 または 6 のバリエーションは、配列番号 4 または 6 のアミノ酸配列から変異したアミノ酸配列を有し、その孔形成能力を維持するタンパク質である。孔を形成するバリエーションの能力は、当該技術において既知の任意の方法を用いてアッセイできる。例えば、バリエーションをその他の適当なサブユニットとともに脂質 2 重層などの両親媒性の層に挿入し、オリゴマー形成して孔を形成するその能力を決定できる。脂質 2 重層などの両親媒性の層にサブユニットを挿入するための方法は、当該技術において既知である。適切な方法については、上記している。

【0082】

バリエーションは、別の分子との共有結合的付着または相互作用を容易にする改変を含んでよい。バリエーションは、好ましくは、付着を容易にする 1 つまたは複数の反応性システイン残基を含む。バリエーションは、ヌクレオチド、アミノ酸またはエチレンオキシドなどの尾部中の重合体単位との任意の相互作用を容易にする改変も含んでよい。

【0083】

バリエーションは、生物、例えばブドウ球菌 (Staphylococcus) により自然に発現される、自然に存在するバリエーションであってよい。代わりに、バリエーションは、大腸菌 (Escherichia

10

20

30

40

50

a coli)などの細菌により *in vitro* または組換えにより発現できる。バリエーションは、組換え技術により生成される自然に存在しないバリエーションも含む。配列番号4または6のアミノ酸配列全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、アミノ酸同一性に基づいてその配列と少なくとも50%相同である。より好ましくは、バリエーションポリペプチドは、配列番号4または6のアミノ酸配列全体にわたる該配列に対するアミノ酸同一性に基づいて、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であってよい。200以上のひと続き、例えば230、250、270または280以上の隣接アミノ酸にわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性がある(「堅い相同性」)。相同性は、上記のようにして決定できる。

10

## 【0084】

上記のものに加えて、アミノ酸置換、例えば1、2、3、4、5、10、20または30までの置換を配列番号4または6のアミノ酸配列に対して行ってよい。保存置換は、上記のようにして作製してよい。

## 【0085】

配列番号4または6のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基は、上記のポリペプチドからさらに欠失してよい。1、2、3、4、5、10、20もしくは30残基またはそれ以上までが欠失してよい。

## 【0086】

バリエーションは、配列番号4または6の断片であってよい。このような断片は、孔形成性を維持する。断片は、少なくとも50、100、200または250アミノ酸の長さであってよい。断片は、好ましくは、配列番号4または6の孔形成ドメインを含む。

20

## 【0087】

1つまたは複数のアミノ酸を、代わりにまたはさらに、上記のポリペプチドに付加できる。配列番号4もしくは6のアミノ酸配列またはそのバリエーションもしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に伸長をもたらすことができる。伸長は、かなり短く、例えば約1から約10までのアミノ酸の長さであってよい。代わりに、伸長は、より長く、例えば約50または約100までのアミノ酸であってよい。キャリアタンパク質を、孔またはバリエーションと融合させてよい。

30

## 【0088】

上記のように、配列番号4または6のバリエーションは、配列番号4または6から変動するアミノ酸配列を有し、孔を形成するその能力を維持するサブユニットである。バリエーションは、典型的に、孔形成を担う配列番号4または6の領域を含有する。 - バレルを含有する - HLの孔形成能力は、各サブユニット中の鎖によりもたらされる。配列番号4または6のバリエーションは、典型的に、鎖を形成する配列番号4または6中の領域を含む。

鎖を形成する配列番号4または6のアミノ酸については、上記している。1つまたは複数の改変を、得られるバリエーションが孔を形成するその能力を維持する限り、鎖を形成する配列番号4または6の領域に作製できる。配列番号4または6の鎖領域に作製できる具体的な改変については、上記している。

40

## 【0089】

配列番号4または6のバリエーションは、好ましくは、その - ヘリックスおよび/またはループ領域内に、置換、付加または欠失などの1つまたは複数の改変を含む。 - ヘリックスおよびループを形成するアミノ酸については、上記している。

## 【0090】

いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質孔は、化学改変される。 - HL (すなわち配列番号2またはそのバリエーション) または - HL (すなわち配列番号4もしくは6またはそのバリエーション) に由来する単量体を改変して、例えばヒスチジン残基 (histタグ)、アスパラギン酸残基 (aspタグ)、ストレプトアビジンタグもしくはフラグタグの付加により、または細胞からのそれらの分泌を促進するシグナル配列 (ポリペプチドが

50

そのような配列を自然に含有しない場合)の付加により、それらの同定または精製を支援してよい。遺伝子タグを導入することの代替は、タグを孔上の天然または工学的に作製された位置に化学的に反応させることである。この例は、孔の外側に工学的に作製されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることである。このことは、 $\alpha$ -HLヘテロオリゴマーを分離するための方法として証明されている (Chem Biol. 1997年7月; 4(7): 497~505頁)。

【0091】

$\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、明示標識で標識されてよい。明示標識は、孔の検出を可能にする任意の適切な標識であってよい。適切な標識は、それらに限定されないが、蛍光分子、放射性同位体、例えば $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびビオチンなどのリガンドを含む。

10

【0092】

$\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、D-アミノ酸を用いて生成することもできる。例えば、 $\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、L-アミノ酸とD-アミノ酸との混合物を含んでよい。このことは、このようなタンパク質またはペプチドを生成するために当該技術において慣習的である。

【0093】

$\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、1つまたは複数の特異的改変を含んで、尾部との相互作用を容易にしてよい。 $\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、孔形成に干渉しない限り、その他の非特異的改変も含有してよい。多くの非特異的側鎖改変は当該技術において既知であり、 $\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体の側鎖に対して作製してよい。このような改変は、例えば、アルデヒドとの反応とその後の $\text{NaBH}_4$ を用いる還元とによるアミノ酸の還元的アルキル化、メチルアセトイミデートを用いるアミド化または無水酢酸を用いるアシル化を含む。

20

【0094】

$\alpha$ -HLまたは $\beta$ -HLに由来する単量体は、当該技術において既知の標準的な方法を用いて生成できる。 $\alpha$ -HLに由来する単量体は、合成によりまたは組換え手段により作製してよい。例えば、孔は、*in vitro*翻訳および転写 (IVTT) により合成してよい。孔を生成するための適切な方法は、国際出願第PCT/GB09/001690号 (WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号 (WO2010/004265として公開) または第PCT/GB10/000133号 (WO2010/086603として公開) で論じられている。孔を膜に挿入するための方法が論じられている。

30

【0095】

孔は、当該技術において既知の標準的な方法を用いて生成できる。孔をコードするポリヌクレオチド配列は、当該技術において標準的な方法を用いて導いて複製してよい。孔をコードするポリヌクレオチド配列は、当該技術において標準的な方法を用いて細菌宿主細胞において発現してよい。孔は、組換え発現ベクターからのポリペプチドの*in situ*発現により細胞において生成してよい。発現ベクターは、場合によって、誘導性プロモーターを有して、ポリペプチドの発現を制御する。これらの方法は、Sambrook, J.およびRussell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYに記載されている。

40

【0096】

孔は、タンパク質生成生物から任意のタンパク質液体クロマトグラフィーシステムによる精製の後または組換え発現の後に大規模で生成できる。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィーシステムは、FPLC、AKTAシステム、Bio-Cadシステム、Bio-Rad BiologicシステムおよびGilson HPLCシステムを含む。

【0097】

プローブのパネル

本発明の方法は、試料を、2つ以上のプローブのパネルと接触させるステップを含む。

50

言い換えると、本発明の方法は、試料を、2つ以上の型のプローブのパネルと接触させるステップを含む。パネルは、2、5、10、15、20、30、40、50、100以上のプローブなどの任意の数の2つ以上のプローブを含んでよい。パネルは、好ましくは、約5から約80までのプローブ、約10から約60までのプローブまたは約20から約50までのプローブなどの約4から約100までのプローブを有する。

【0098】

本方法は、パネル中の各または全てのプローブの複数の事例を用いる。なぜなら、分析物が試料中に存在するならば、そこには分析物の複数の事例がほぼ確実に存在するからである。言い換えると、本方法は、パネル中の各または全ての型のプローブの複数の事例を用いる。

10

【0099】

2つ以上の分析物の群の各または全ての分析物メンバーは、パネル中の少なくとも1つのプローブ(すなわち少なくとも1つの型のプローブ)により認識される。プローブは、試料中に分析物が存在する場合に本発明の方法においてプローブが陽性シグナルをもたらすならば、分析物メンバーを認識する。言い換えると、プローブは、試料中に分析物が存在する場合にプローブが電流に示差的な様式で影響するならば、分析物メンバーを認識する。プローブは、典型的に、分析物メンバーを認識する。なぜなら、プローブは、分析物メンバーと結合するアダプターを含むからである。各分析物メンバーが少なくとも1つのプローブにより認識されるという事実は、本発明の方法を用いて、群中の各分析物メンバーの存在または非存在を決定することを可能にする。プローブが分析物メンバーを認識する方式については、以下でより詳細に論じる。

20

【0100】

パネル中の少なくとも1つのプローブ(すなわち少なくとも1つの型のプローブ)は、好ましくは、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、その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。群内の分析物メンバーのあるクラスの存在または非存在を決定することに関連する利点については、上記している。1つより多い分析物メンバーと結合するアダプターの生成については、以下で論じる。

【0101】

パネル中の少なくとも1つのプローブ(すなわち少なくとも1つの型のプローブ)は、好ましくは、分析物メンバーの1つを特異的に認識し、該分析物メンバーと特異的に結合するアダプターを含む。プローブは、試料中に分析物が存在する場合に本発明の方法においてプローブだけが陽性シグナルをもたらすならば、分析物メンバーの1つを特異的に認識する。言い換えると、プローブは、試料中に分析物が存在する場合にプローブだけが電流に示差的な様式で影響するならば、分析物メンバーを特異的に認識する。プローブは、典型的に、分析物メンバーを特異的に認識する。なぜなら、プローブは、分析物メンバーと特異的に結合するアダプターを含むからである。アダプターの特異的結合は、以下でより詳細に論じる。本実施形態では、少なくとも1つのプローブは、1つの分析物メンバーだけを標的にする。パネル中の各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、より好ましくは、分析物メンバーの1つを特異的に認識し、該分析物メンバーと特異的に結合するアダプターを含む。この実施形態では、各プローブは、1つの分析物メンバーだけを標的にする。本発明の多重アッセイは、分析物メンバーを検出するために1つのプローブだけを用いるならば、より単純である。特に、孔を流れる電流に対する1つのプローブの示差的な効果を測定することにより分析物メンバーの存在または非存在を決定することが、より簡単明瞭である。

30

40

【0102】

パネル中の各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、好ましくは、異なるアダプターを含む。言い換えると、同じアダプターを含むプローブは、パネル中に2つとない(すなわち、そのような2つの同じ型のプローブはない)。以下でより詳細に論じるように、異なるアダプター間の差は、孔を流れる電流に各プローブが与える影響の示差性に寄与できる。異なるアダプターは、典型的に、異なる分析物メンバーと結合するが、同じ

50

分析物メンバーと結合することがある。好ましい実施形態では、パネル中の2つ以上のプローブは、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。パネル中の2つ以上のプローブは、好ましくは、異なるアダプターと同じポリヌクレオチド尾部とを含む。この実施形態では、孔を流れる電流に各プローブが与える影響の示差性は、典型的に、アダプター間の差によりもたらされる。

**【0103】**

パネル中の各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、好ましくは、異なる尾部を含む。以下でより詳細に論じるように、異なる尾部間の差も、孔を流れる電流に各プローブが与える影響の示差性に寄与する。パネル中の2つ以上のプローブは、好ましくは、同じアダプターと異なる尾部とを含む。この実施形態では、孔を流れる電流に各プローブが与える影響の示差性は、典型的に、尾部間の差によりもたらされる。この実施形態では、2つ以上のプローブは、同じ1つまたは複数の分析物メンバーを標的にする。なぜなら、これらは同じアダプターを共有するからである。このことにより、内部対照がもたらされる。なぜなら、1つまたは複数の分析物メンバーの1つが試料中に存在すると結論付けるために両方のプローブからの陽性シグナルが必要であるからである。

10

**【0104】**

パネル中の各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、異なるアダプターと異なるポリヌクレオチド尾部とを含むことがある。言い換えると、言い換えると、同じアダプターと同じ尾部とを含むプローブは、パネル中に2つとない(すなわち、そのような2つの同じ型のプローブはない)。実施形態では、異なるアダプターと異なる尾部とはともに、典型的に、孔を流れる電流に2つ以上のプローブのそれぞれが与える影響の示差性に寄与する。

20

**【0105】**

パネル中のプローブ(すなわちプローブの型)の数は、典型的に、群の分析物メンバーの数と同じまたはそれより大きい。群の分析物メンバーの数よりもパネル中のプローブが少なくてもよい。なぜなら、各プローブは、1つまたは複数の分析物メンバーを認識できるからである。パネル中のプローブの数が群の分析物メンバーの数よりも大きいならば、2つ以上のプローブは、同じ1つまたは複数の分析物メンバーを標的にし、本発明の方法は、上記のように内部対照を含む。パネル中のプローブの数は、好ましくは、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。これが本発明の最も単純な実施形態であるが、これは、内部対照を含まない。

30

**【0106】****アダプター**

パネル中の各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、分析物メンバーの1つまたは複数と認識し、1つまたは複数の分析物メンバーと結合するアダプターを含む。プローブによる分析物メンバーの認識については、上記している。

**【0107】**

アダプターは、1つまたは複数の分析物メンバーと結合する小分子である。アダプターは、S E L E X (Stoltenburg, R.ら、(2007)、Biomolecular Engineering 24、381~403頁; Tuerk, C.ら、Science 249、505~510頁; Bock, L. C.ら、(1992)、Nature 355、564~566頁) または非S E L E X (Berezovski, M.ら(2006)、Journal of the American Chemical Society 128、1410~1411頁) を用いて生成できる。

40

**【0108】**

アダプターは、1つまたは複数の分析物メンバーと結合できる。この実施形態では、アダプターを含むプローブは、1つまたは複数の分析物メンバーを認識できる。1つより多い分析物メンバーと結合するアダプターは、トグル(Toggle) S E L E X (White, R.ら、(2001)、Molecular Therapy 4、567~573頁) を用いて生成できる。アダプターは1つまたは複数の分析物と結合できるが、各アダプターは、典型的に、本発明の方法において1つの分析物とだけ結合する。このことは、以下でより詳細に論じる。

**【0109】**

50

アプタマーは、好ましくは、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と結合する。分析物メンバーのあるクラスについては、上記している。分析物メンバーのあるクラスと結合するアプタマーは、トグル S E L E X を用いて生成できる。

【0110】

アプタマーは、好ましくは、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。ペプチドアプタマーは、任意のアミノ酸を含んでよい。アミノ酸は、上記のものいずれであってもよい。オリゴヌクレオチドアプタマーは、任意のヌクレオチドを含んでよい。ヌクレオチドは、上記のものいずれであってもよい。

【0111】

アプタマーは、任意の長さであることができる。アプタマーは、典型的に、約15から約50まで、約20から約40までまたは約25から約30までのアミノ酸またはヌクレオチドの長さなどの少なくとも15アミノ酸またはヌクレオチドの長さである。

【0112】

尾部

パネル中の各プローブ（すなわちそれぞれの型のプローブ）は、孔に侵入できる尾部を含む。尾部は、典型的に、孔のパレルまたはチャンネルに侵入して、それを通過できる直鎖状分子である。尾部を形成するために適切な分子については、以下で論じる。尾部が孔に侵入すると、尾部は、パレルまたはチャンネル中に存在する尾部の部分に特異的な様式で孔を流れる電流に影響する。

【0113】

尾部は、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、孔を流れる電流に対して異なる影響を有する。各プローブ中の尾部は、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ある方式で影響し、アプタマーが分析物メンバーと結合している場合に孔を流れる電流に異なる方式で影響する。このことは、重要である。なぜなら、このことにより、方法を用いて群中の各分析物メンバーの存在または非存在を決定できるからである。

【0114】

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依存する孔を流れる電流に対する尾部の異なる影響は、プローブが孔を通過して移動するのにかかる時間に基づいて測定できる。言い換えると、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依存する孔を流れる電流に対する尾部の異なる影響は、プローブが孔を流れる電流に影響する時間に基づいて測定できる。理論と結び付けられることを望まないが、各プローブの尾部は、パネルが孔と接触し、孔を流れる電流に影響するときに、孔のパレルまたはチャンネルに侵入する。本発明の方法では、複数の事例の孔を用いる。短い時間の間に、孔を通るプローブ全体の移動は、アプタマーにより妨げられる（すなわち遅れる）。アプタマーは、典型的に、3次元構造に折り畳まれ、よって、孔のパレルまたはチャンネルを通過して移動するには典型的に大きすぎる。短い時間の後に、アプタマーは、電位の影響の下で折り畳みがほどかれ、プローブ全体が電位に沿って孔を通過して移動する。プローブが一旦孔を通過すると、孔を流れる電流は、プローブのパネルの非存在下で見られるレベルに戻る。プローブの標的分析物メンバーが存在するならば、アプタマーは、分析物メンバーと結合し、アプタマー/分析物複合体は、孔を通過して移動するプローブをさらに遅らせる。この実施形態では、プローブは、分析物メンバーの存在下で、分析物メンバーの非存在下よりもゆっくりと孔を通過して移動する。言い換えると、プローブは、分析物メンバーの存在下で、分析物メンバーの非存在下よりも長い時間、孔を流れる電流に影響する。この実施形態では、プローブ間（すなわち異なる型のプローブ間）の示差性は、（1）異なる長さのプローブ、（2）各プローブの尾部中の1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチド領域の存在または非存在、および（3）各プローブ中の異なるアプタマーの異なる結合親和性の1つもしくは複数または全てによるものであり得る。これら3つ全ては、各プローブが特定の量の時間（「滞留時間」）孔を流れる電流に影響するように変更することができる。1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチド領域の存在を用いて、下

10

20

30

40

50

記のように、バレルまたはチャンネル中のプローブを示す特異的尾部領域を保持することもできる。

【0115】

尾部は、好ましくは、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、ある領域は、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、異なる領域は、アプタマーが該分析物メンバーと結合しているときに孔の中にある。少なくとも2つの領域は、異なる組成を有し、よって、孔を流れる電流に異なる方式で影響する。例えば、ある領域は、ポリペプチドであり得、他の領域は、ポリヌクレオチドであり得るか、または少なくとも2つの領域は、異なるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであり得る。このことは、以下でより詳細に論じる。

10

【0116】

対照実験を行って、プローブが分析物メンバーの1つと結合しているかまたは結合していない場合に尾部中の異なる領域が孔を流れる電流に与える影響を決定してよい。試験試料に対して本発明の方法を行うことにより得られる結果を、次いで、そのような対照実験に由来する結果と比較して、特定の分析物が試験試料中に存在または非存在であるかを決定できる。

【0117】

ここでもまた理論と結び付けられることを望まないが、各プローブの尾部は、パネルが孔と接触し、孔を流れる電流に影響するときに、孔のバレルまたはチャンネルに侵入する。本発明の方法では、複数の事例の孔を用いる。短い時間の間に、孔を通るプローブ全体の移動は、アプタマーにより妨げられる。なぜなら、上記のように、折り畳まれたアプタマーは、孔のバレルまたはチャンネルを通して移動するには典型的に大きすぎるからである。プローブの標的分析物メンバーが存在しないならば、アプタマーは、分析物メンバーと結合せず、尾部のある領域（第1領域）は、典型的に、アプタマーが孔を通るプローブの移動を妨げるので、バレルまたはチャンネル中に保持される。この第1領域は、領域の組成に基づいて特定の方式で孔を流れる電流に影響する。短い時間の後に、アプタマーは、電位の影響の下で折り畳みがほどかれ、プローブ全体が電位に沿って孔を通して移動する。プローブが一旦孔を通過すると、孔を流れる電流は、プローブのパネルの非存在下で見られるレベルに戻る。

20

【0118】

プローブの標的分析物メンバーが試料中に存在するならば、各プローブの尾部は、上記のように、孔のバレルまたはチャンネルにまだ侵入するが、アプタマー/分析物メンバー複合体は、典型的に、分析物メンバーが存在しない限り、尾部侵入を妨げる。従って、尾部の異なる領域（第2領域）は、バレルまたはチャンネル中に保持され、第1領域とは異なる方式で孔を流れる電流に影響する。短い時間の後に、アプタマーは、電位の影響の下で折り畳みがほどかれ、分析物メンバーを遊離し、プローブ全体が孔を通して移動する。プローブが孔を通して移動するにつれて、第1領域は、バレルまたはチャンネルを通して第2領域に続き、短い時間の間、分析物メンバーが存在しないかのように孔を流れる電流に影響する。プローブが一旦孔を通過すると、孔を流れる電流は、プローブのパネルの非存在下で見られるレベルに戻る。このことの例を、図1において漫画の形で示す。

30

40

【0119】

この実施形態では、プローブ間（すなわち異なる型のプローブ間）の示差性は、（1）異なる長さのプローブ、（2）各プローブの尾部中の1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチド領域の存在または非存在、（3）各プローブ中の異なるアプタマーの異なる結合親和性、および（4）各プローブ中の少なくとも2つの領域間の差の1つもしくは複数または全てによるものであり得る。1から3は、各プローブが特定の量の時間（「滞留時間」）孔を流れる電流に影響するように変えることができる。1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチド領域の存在を用いて、下記のように、バレルまたはチャンネル中のプローブを示す特異的尾部領域を保持することもできる。各プローブ中の少なくとも2つの領域は、方法において用いる各（または全ての）プローブ間の区別が簡単明瞭であるように設計でき

50

る。

【0120】

上記のように、孔は、好ましくは、前庭を含む。このことは、前庭が、典型的に、アプタマーの侵入を可能にするが、アプタマー/分析物メンバー複合体の侵入を可能にしないので、有利である。このことは、尾部が、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異なる程度で孔のバレルまたはチャンネルに侵入できることを意味する。このことは、尾部の異なる領域が、アプタマーが分析物メンバーの1つと結合しているか否かに応じて、孔のバレルまたはチャンネル中に存在することも意味する。特定の孔について、プローブのパネル中で用いるために適切な尾部を設計することが簡単明瞭である。例えば、孔の前庭およびバレルまたはチャンネルの長さが既知であるならばプローブ尾部を設計することが簡単明瞭である。

10

【0121】

各アプタマー分子は、1つより多い分析物メンバーと結合することができるが、本発明の方法において分析物メンバー分子の1つだけと結合する。上記のように、プローブ全体は、典型的に、孔と接触したすぐ後に、電位に沿って孔を通して移動する。アプタマーが孔を通して移動する前に、アプタマーが1つの分析物メンバーと結合するために十分な時間がある。プローブの標的分析物メンバーが存在しないならば、アプタマーが分析物メンバーと結合することなくプローブは孔を通して移動する。プローブの標的分析物が存在するならば、孔を通るプローブの移動はわずかに遅れることがあるが、妨げられることはあり得ない。このことは、以下でより詳細に論じる。

20

【0122】

尾部は、好ましくは、重合体を含む。重合体は、孔に侵入して、孔を流れる電流に影響できる。重合体は、好ましくは、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。

【0123】

ポリヌクレオチドは、上記の任意のヌクレオチドを含んでよい。しかし、尾部中のポリヌクレオチドは、典型的に、アデノシン1リン酸(AMP)、グアノシン1リン酸(GMP)、チミジン1リン酸(TMP)、ウリジン1リン酸(UMP)、シチジン1リン酸(CMP)、サイクリックアデノシン1リン酸(cAMP)、サイクリックグアノシン1リン酸(cGMP)、デオキシアデノシン1リン酸(dAMP)、デオキシグアノシン1リン酸(dGMP)、デオキシチミジン1リン酸(dTMP)、デオキシウリジン1リン酸(dUMP)、デオキシシチジン1リン酸(dCMP)および上記の任意の改変ヌクレオチドから選択されるヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMPまたはdCMPから選択されるヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドは、好ましくは、1つまたは複数の脱塩基ヌクレオチドを含む。尾部中のポリヌクレオチドは、1本鎖または2本鎖であってよい。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)などの核酸であり得る。尾部中のポリヌクレオチドは、1本の鎖のDNAとハイブリダイズした1本の鎖のRNAを含むことができる。尾部中のポリヌクレオチドは、ペプチド核酸(PNA)、グリセロール核酸(GNA)、トレース核酸(TNA)、ロックド核酸(LNA)などの当該技術において既知の任意の合成核酸、またはヌクレオチド側鎖を有するその他の合成重合体であってよい。

30

40

【0124】

典型的に、尾部は、脱塩基リーダー配列を有し、このリーダー配列は、孔を通過する尾部の第1領域である。好ましくは、尾部は、少なくとも2つの隣接脱塩基残基、例えば3、4、5、6、7つ以上の隣接脱塩基残基を含む。

【0125】

尾部中の2本鎖ポリヌクレオチドは、典型的に、孔を通過できないが、本発明の方法において有用であり得る。例えば、尾部は、1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域を含んでよい。このような2本鎖領域の存在は、プローブが孔を

50

通って移動することを妨げないが、代わりに、領域中の鎖の1つが電位の影響の下でプローブから取り除かれるので、孔を通るプローブの移動を単純に遅らせる。このような遅れは、孔を流れる電流を測定することにより観察できる。分析物との結合が孔を通るプローブの移動を遅らせる実施形態については、上記している。従って、各尾部中に1つまたは複数の2本鎖ポリヌクレオチド領域を含めることは、尾部の集団から得ることができる可能性のあるシグナルの数を増加させ、よって、本発明の方法を用いてアッセイできる分析物メンバーの数を増加させる。2本鎖ポリヌクレオチド領域を用いて、孔のバレルまたはチャンネル中のプローブを示すので本発明に従って読み取ることができるバーコードのような尾部の特定の領域を保持してもよい。1つまたは複数の2本鎖領域は、上記のように、分析物メンバーの存在または非存在を示す少なくとも2つの領域の前または後に孔に侵入するように、尾部上に位置決めされるものであってよい。従って、好ましい実施形態では、尾部は、2本鎖ポリヌクレオチド領域とプローブを示す特異的尾部領域とを、2本鎖ポリヌクレオチドが孔を通るプローブの移動を遅らせ、かつ孔のバレルまたはチャンネル中に特異的尾部領域を保持するように含む。プローブ間(すなわち異なる型のプローブ間)の異なる特異的尾部領域は、典型的に、孔を流れる電流に対して異なる影響を有し、よって、互いに区別できる。特異的尾部領域は、好ましくは、重合体である。重合体は、上記または下記のものいずれであってもよい。このような実施形態では、特異的尾部領域は、孔に侵入し、2本鎖ポリヌクレオチド領域によりバレルまたはチャンネル中に保持される。このことにより、特異的尾部領域は、孔を流れる電流に対するその特異的影響により同定できる。短い時間の後に、2本鎖領域中の鎖の1つが取り除かれ、プローブは、電位の影響の下で孔を通過して移動する。プローブと分析物メンバーとの結合を、次いで、上記のように、(a)孔を通るプローブの移動の遅れおよび/または(b)尾部中の少なくとも2つの特異的領域の使用により測定できる。

#### 【0126】

尾部は、好ましくは、少なくとも1つの1本鎖ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域を含む。1本鎖ポリヌクレオチドは、尾部中で有用である。なぜなら、これらは、孔を通過でき、孔を流れる電流に異なる方式で影響する異なる領域に容易に分割できるからである。例えば、異なる配列を有するポリヌクレオチドの異なる領域は、典型的に、孔を流れる電流に異なる方式で影響する。尾部は、好ましくは、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、ある領域は、アダプターが1つまたは複数の分析物メンバーと結合していない場合に孔の中にあり、異なる領域は、アダプターが該分析物メンバーと結合している場合に孔の中にある。少なくとも2つの領域は、好ましくは、異なるヌクレオチドの少なくとも2つのひと続きに相当する。例えば、ポリヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドのひと続きと、脱塩基ヌクレオチドのひと続きとを含んでよい。各ひと続きは、孔を流れる電流に異なる方式で影響する。代わりに、異なるヌクレオチドの少なくとも2つのひと続きは、異なるポリヌクレオチドバーコードである。ポリヌクレオチドバーコードは、当該技術において公知である(Kozarewa, I.ら、(2011)、Methods Mol. Biol. 733、279~298頁)。バーコードは、孔を流れる電流に特異的かつ既知の様式で影響するポリヌクレオチドの特異的配列である。

#### 【0127】

尾部中のポリペプチドは、上記の任意のものを含む任意のアミノ酸を含んでよい。異なるアミノ酸配列は、孔を流れる電流に異なる方式で影響し、従って、特異的尾部は、ポリヌクレオチドについて上記のようにして設計してよい。ポリヌクレオチドについて上記の任意の実施形態は、ポリペプチドについて当てはまる(ヌクレオチドをアミノ酸で置換して)。

#### 【0128】

尾部は、PEGを含んでよい。PEGは、孔を流れる電流に特異の様式で影響する。PEGを用いて、アダプターが分析物メンバーの1つと結合しているかまたは結合していない場合に孔のバレルまたはチャンネル中に存在する尾部中のある領域を形成してよい。PE

10

20

30

40

50

G以外のものを、アプタマーが分析物メンバーとそれぞれ結合していないかまたは結合している場合に孔のパレルまたはチャンネル中に存在する尾部中の他の領域において用いてよい。

【0129】

尾部は、重合体の異なる組み合わせを含んでよい。尾部は、好ましくは、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、ある領域は、アプタマーが分析物メンバーの1つと結合していない場合に孔の中にあり、異なる領域は、アプタマーが分析物メンバーと結合している場合に孔の中にある。以下の表4は、いくつかの好ましい組み合わせについてまとめる。

【0130】

【表4】

	ある領域	異なる領域
1	ポリヌクレオチド	異なるポリヌクレオチド
2	ポリペプチド	異なるポリペプチド
3	ポリヌクレオチド	ポリペプチド
4	ポリペプチド	ポリヌクレオチド
5	PEG	ポリヌクレオチド
6	ポリヌクレオチド	PEG
7	PEG	ポリペプチド
8	ポリペプチド	PEG

【0131】

尾部は、任意の長さであってよい。尾部は、好ましくは、約10から約60まで、約20から約50までまたは約30から約40までのヌクレオチドの長さなどの約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。

【0132】

尾部は、実施例において用いる任意のポリヌクレオチドを含んでよい。特に、尾部は、好ましくは、配列番号7から23のいずれかの残基1から30を含む。プローブのパネルは、好ましくは、配列番号7から23の残基1から30に相当する尾部の集団を含む。

【0133】

示差的電流

各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、孔を流れる電流に示差的な様式で影響する。言い換えると、プローブは、孔を流れる電流に、異なるプローブが孔を流れる電流に影響する方式とは区別または識別できる様式で影響する。このことにより、本発明に従って各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)の正体を測定できる。プローブと分析物メンバーとの結合を、次いで、上記のようにして測定できる。各プローブの正体および各プローブと分析物メンバーとの結合を測定できるので、各分析物メンバーの存在または非存在を決定できる。

【0134】

各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、好ましくは、プローブが分析物メンバーの1つと結合している場合に孔を流れる電流に示差的な様式で影響する。言い換えると、分析物メンバーとプローブとの結合は、好ましくは、孔を流れる電流に、異なるプローブが分析物メンバーと結合している場合に異なるプローブが孔を流れる電流に影響する方式とは区別または識別できる様式で影響する。異なるプローブは、同じ分析物メンバ

10

20

30

40

50

ーと結合してよい。

【0135】

示差的な様式は、孔を流れる電流が受ける影響の程度、すなわち、プローブが結合する場合の孔を流れる電流の量の変化および/またはプローブの結合により電流が影響される時間(「滞留時間」)に関することがある。電流混乱の値は、滞留時間よりも大きい値である。なぜなら、前者は、より示差的なサインを与え、滞留時間は、より広い分布を有するからである。この示差的な様式は、孔を流れる電流の変動が受ける影響の程度に関することがある。変動は、分析物メンバーとプローブとの結合の結果として増加または減少することがある。対照実験を行って、プローブが分析物メンバーの1つと結合する場合に異なるプローブが孔を流れる電流に対して異なる影響を有することを確認してよい。このよ

10

【0136】

プローブ間の示差性は、それらの長さの差により達成できる。より長いプローブは、孔を流れる電流に対してより長い時間影響し、すなわち滞留時間がより長い。より短いプローブは、孔を流れる電流に対してより短い時間影響し、すなわち滞留時間がより短い。

【0137】

プローブ間の示差性は、それらのアプタマーおよび/または尾部の差により達成できる。例えば、異なるアプタマーは、分析物と異なる程度で結合し、すなわち、異なる結合定数を有する。分析物メンバーとより強く結合するアプタマーは、プローブの孔を通る移動をより長く妨げ、このことは、孔を流れる電流を測定することにより同定できる。逆もまた真であり、すなわち、分析物メンバーとより弱く結合するアプタマーは、プローブの孔を通る移動をより短い時間妨げ、このことは、孔を流れる電流を測定することにより同定できる。

20

【0138】

上記の好ましい実施形態では、尾部の特異的領域が、アプタマーが分析物メンバーの1つと結合している場合または尾部中の2本鎖ポリヌクレオチド領域が孔に侵入する場合に、孔のパレルまたはチャンネルに短時間保持される。異なる重合体の存在などの異なるプロ

30

【0139】

各プローブ(すなわちそれぞれの型のプローブ)は、また、好ましくは、孔を流れる電流に、そのアプタマーが分析物メンバーの1つと結合していない場合に示差的な様式で影響する。言い換えると、分析物メンバーの非存在下では、プローブは、孔を流れる電流に、異なるプローブの分析物メンバーが非存在である場合に異なるプローブが孔を流れる電流に影響する方式とは区別または識別できる様式で影響する。異なるプローブは、同じ分

40

【0140】

プローブ間のこの好ましい「非存在」示差性は、プローブの長さおよび/または尾部の差により達成できる。上記のように、プローブ全体は、分析物メンバーの非存在下で孔を

50

鎖ポリヌクレオチド領域が孔に侵入する場合、尾部の特異的領域は、孔のバレルまたはチャンネル中に一時的に保持される。異なる重合体または同じ型の重合体の異なる配列の存在などの異なるプローブ間のこのような特異的領域の差は、プローブ間の示差性の原因となることができる。上記のように、尾部は、2本鎖ポリヌクレオチドの1つまたは複数の領域を含むことができる。このことにより、異なるプローブを区別できる。例えば、異なる尾部は、異なる数のこのような領域および/または異なる長さのこのような領域を含むことができる。

#### 【0141】

装置および条件

電気的測定は、Stoddart, D. S.ら、(2009)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106、7702~7707頁、Lieberman KRら、J Am Chem Soc. 2010 ; 132(50) : 17961~72頁および国際出願WO - 2000 / 28312に記載されるような標準的な1チャンネル記録装置を用いて行ってよい。代わりに、電気的測定は、多重チャンネル系、例えば国際出願WO - 2009 / 077734および国際出願WO - 2011 / 067559に記載されるようなものを用いて行ってよい。

10

#### 【0142】

本方法は、孔が膜に挿入されている膜/孔系を調べるために適切な任意の装置を用いて行ってよい。本方法は、膜貫通孔検知のために適切な任意の装置を用いて行ってよい。例えば、装置は、水溶液を含むチャンバと、チャンバを2つの区画に分けるバリアとを含む。バリアは、孔を含有する膜が形成される開口を有する。

20

#### 【0143】

本方法は、国際出願第PCT / GB08 / 000562号(WO2008 / 102120)に記載される装置を用いて行ってよい。

#### 【0144】

本方法は、孔を流れる電流を測定するステップを含む。よって、装置は、電位を印加して、膜および孔を横切る電気的シグナルを測定できる電気回路も含んでよい。本方法は、パッチクランプまたはボルテージクランプを用いて行ってよい。本方法は、好ましくは、ボルテージクランプの使用を含む。

#### 【0145】

本方法は、各アレイが128、256、512、1024以上のウェルを含むシリコンベースのウェルのアレイ上で行ってよい。

30

#### 【0146】

本発明の方法は、孔を流れる電流の測定を含んでよい。膜貫通孔を通るイオン電流を測定するために適切な条件は、当該技術において既知であり、実施例に開示される。本方法は、典型的に、膜および孔を横切って印加される電圧を用いて行う。用いる電圧は、典型的に、+2Vから-2Vまで、典型的に-400mVから+400mVまでである。用いる電圧は、好ましくは、-400mV、-300mV、-200mV、-150mV、-100mV、-50mV、-20mVおよび0mVから選択される下限と、+10mV、+20mV、+50mV、+100mV、+150mV、+200mV、+300mVおよび+400mVから独立して選択される上限とを有する範囲内にある。用いる電圧は、より好ましくは、100mVから240mVまでの範囲、最も好ましくは120mVから220mVの範囲にある。印加する電位を増加することにより、孔による異なるヌクレオチド間の差別を増加できる。

40

#### 【0147】

本方法は、典型的に、金属塩、例えばアルカリ金属塩、ハロゲン化物塩、例えば塩化物塩、例えばアルカリ金属塩化物塩などの任意の電荷担体の存在下で行われる。電荷担体は、イオン性の液体または有機塩、例えば塩化テトラメチルアンモニウム、塩化トリメチルフェニルアンモニウム、塩化フェニルトリメチルアンモニウムまたは塩化1-エチル-3-メチルイミダゾリウムを含んでよい。上記の例示的な装置では、塩は、チャンバ中の水溶液中に存在する。塩化カリウム(KCl)、塩化ナトリウム(NaCl)または塩化セ

50

シウム (CsCl) を典型的に用いる。KCl が好ましい。塩濃度は、飽和であってよい。塩濃度は、3 M 以下であってよく、典型的に 0.1 から 2.5 M まで、0.3 から 1.9 M まで、0.5 から 1.8 M まで、0.7 から 1.7 M まで、0.9 から 1.6 M までまたは 1 M から 1.4 M までである。塩濃度は、好ましくは、150 mM から 1 M までである。本方法は、好ましくは、少なくとも 0.4 M、少なくとも 0.5 M、少なくとも 0.6 M、少なくとも 0.8 M、少なくとも 1.0 M、少なくとも 1.5 M、少なくとも 2.0 M、少なくとも 2.5 M または少なくとも 3.0 M などの少なくとも 0.3 M の塩濃度を用いて行われる。高い塩濃度は、高いシグナル対ノイズ比をもたらす、通常の電流変動のバックグラウンドに対して結合/非結合を示す電流を同定できるようにする。

#### 【0148】

本方法は、典型的に、緩衝剤の存在下で行われる。上記の例示的な装置では、緩衝剤は、チャンバ中の水溶液中に存在する。任意の緩衝剤を、本発明の方法において用いてよい。典型的に、緩衝剤は、HEPES である。別の適切な緩衝剤は、Tris-HCl 緩衝剤である。本方法は、典型的に、4.0 から 12.0 まで、4.5 から 10.0 まで、5.0 から 9.0 まで、5.5 から 8.8 まで、6.0 から 8.7 までまたは 7.0 から 8.8 までまたは 7.5 から 8.5 までの pH で行われる。用いる pH は、好ましくは、約 7.5 である。

#### 【0149】

本方法は、0 から 100 まで、15 から 95 まで、16 から 90 まで、17 から 85 まで、18 から 80 まで、19 から 70 までまたは 20 から 60 までで行ってよい。本方法は、典型的に、室温で行われる。本方法は、場合によって、約 37 などの酵素機能を支持する温度にて行われる。

#### 【0150】

試料およびプローブのパネルは、膜のいずれの側で孔と接触させてもよい。試料およびプローブのパネルは、典型的に、膜の同じ側で孔と接触させる。

#### 【0151】

試料およびプローブのパネルは、任意の順序で孔と接触させてよい。試料を孔と接触させた後にパネルと接触させるか、またはパネルと同時に接触させることが好ましい。試料を孔と接触させる前にパネルを孔と接触させるならば、分析物メンバーとの結合のために十分なプローブが利用可能に残っていること（かつ全てが孔を通して膜を横切ってしまうこと）を確実にすることが必須である。

#### 【0152】

濃度を測定する方法

本発明の方法は、好ましくは、1 つまたは複数の分析物メンバー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ステップをさらに含む。このことは、全般的に、検量線を参照することにより、平衡定数を用いることによりまたは対照データを参照することにより、試料中に存在する分析物メンバーの濃度を決定するための助けとなる。濃度を算出する方法は、当該技術において公知である。

#### 【0153】

本発明は、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濃度を決定する方法であって、

(i) 上記の本発明の方法を行うステップと、

(ii) 試料中に存在することが示された 1 つ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

を含む方法も提供する。ステップ (i) は、好ましくは、1 つまたは複数の分析物メンバー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含む。対照または参照データは、既知の濃度の分析

10

20

30

40

50

物メンバーを用いてアッセイを校正する対照実験を行うことにより作製できる。このことについては、実施例 2 に記載する。

【0154】

パネルおよびキット

本発明は、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も提供する。パネルは、2 つ以上のプローブを含み、

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

各プローブは、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は、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。本発明の方法に関して上記の任意の実施形態は、本発明のパネルに対して等しく当てはまる。パネル中の各プローブは、好ましくはプローブが膜にカップリングされることを可能にする化学基をさらに含む。化学基は、好ましくは、コレステロールである。

10

【0155】

本発明は、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も提供する。キットは、( a ) 本発明のプローブのパネルと、( b ) 膜貫通孔とを含む。本発明の方法に関して上記の任意の実施形態は、キットに対して等しく当てはまる。

20

【0156】

キットは、脂質 2 重層などの両親媒性の層を形成するために必要なリン脂質などの膜の成分をさらに含んでよい。

【0157】

本発明のキットは、上記の任意の実施形態を行うことを可能にする 1 つまたは複数のその他の試薬または器具をさらに含んでよい。このような試薬または器具は、以下の 1 つまたは複数を含む：適切な緩衝剤（複数可）（水溶液）、対象から試料を得るための手段（例えば器または針を含む器具）、ポリヌクレオチドを増幅および/もしくは発現するための手段、上で定義する膜またはボルテージもしくはパッチクランプ装置。試薬は、流体試料が試薬を懸濁するように乾燥状態でキットに存在してよい。キットは、場合によって、キットを本発明の方法において用いることを可能にするための指示書またはどの患者に対して方法を用いてよいかに関する詳細を含んでもよい。キットは、場合によって、ヌクレオチドを含んでよい。

30

【0158】

装置

本発明は、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装置も提供する。装置は、複数の孔と、本発明のプローブのパネルとを含む。装置は、好ましくは、本発明の方法を行うための指示書をさらに含む。装置は、アレイまたはチップなどのポリヌクレオチド分析のための任意の従来の装置であってよい。本発明の方法に関して上記の任意の実施形態は、本発明の装置に対して等しく当てはまる。

40

【0159】

装置は、好ましくは、本発明の方法を行うために設定される。

【0160】

装置は、好ましくは、膜と複数の孔とを支持でき、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 つの貯蔵器と、

50

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、流体システムは、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。装置は、国際出願第PCT/GB08/004127号(WO2009/077734として公開)、第PCT/GB10/000789号(WO2010/122293として公開)、国際出願第PCT/GB10/002206号(未公開)または国際出願第PCT/US99/25679号(WO00/28312として公開)に記載されるもののいずれであってもよい。

【0161】

以下の実施例は、本発明を説明する。

【実施例1】

【0162】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、タンパク質トロンビンの存在を検出できるかを説明する。

【0163】

材料および方法

電氣的測定は、銀めっきした(WO2009/077734)標準的な128ウェルシリコンチップ(フォーマット直径75 $\mu$ m、深さ20 $\mu$ mおよびピッチ250 $\mu$ m)を用いて得た。チップは、最初に、20mLのエタノール、次いで20mLのdH<sub>2</sub>O、次いで20mLのエタノールを用いて洗浄した後にCF4プラズマ処理した。用いたチップを、次いで、浸漬被覆により前処理し、真空シールして4にて貯蔵した。使用前に、チップを少なくとも20分間室温まで温めた。

【0164】

2重層は、1M KCl、10mM Tris、pH7.5に溶解した3.6mg/mLの1,2-ジフィタノイル-グリセロ-3-ホスホコリン脂質(DPhPC、Avanti Polar Lipids、AL、USA)の一連のプラグを、チップを横切って0.45 $\mu$ L/sにて通過させることにより形成した。最初に、脂質プラグ(250 $\mu$ L)をチップを横切って流し、次いで100 $\mu$ Lの空気のプラグを流した。155 $\mu$ Lおよび150 $\mu$ Lの脂質溶液のさらに2回のプラグと、その間の100 $\mu$ Lの空気のプラグとを、次いで、チップ全体に通過させた。2重層形成の後に、チャンバに3mLの緩衝剤を3 $\mu$ L/sの流速でフラッシュした。2重層形成の電氣的記録は、10kHzにて、1.0pFの積算キャパシタンスを用いて行った。

【0165】

生物学的ナノポアの溶液は、1M KCl、25mM Tris pH7.5中のHL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)(Stoddart, D. S.ら、(2009)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106、7702~7707頁)(1/80,000に希釈した1 $\mu$ M)を用いて調製した。+180mVの保持電位を印加し、溶液をチップ全体に流した。10%の占有率(12の単一孔)が達成されるまで、孔が2重層に侵入することを可能にした。標本抽出率を次いで7kHzに低減し、電位をゼロに低減し、積算キャパシタンスを1.0pFに維持した。

【0166】

正の保持電位の期間と、電位を印加しない休止期間とを循環する制御プログラムを5分間運転した。制御プログラムは、0mVの電位を10秒間印加した後に、+170mVの電位をさらに50秒間印加し、このサイクルを20回まで反復した。

【0167】

5分後に、スクリプトを停止し、1M KCl、10mM Tris pH7.5中の5A15x10A\_\_TBA(配列番号7、1.25 $\mu$ M)をチャンバにピペットを用いて入れた。制御プログラムを、次いで、合計15分間運転した。この後に、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で最小限で5分間一緒にブレインキュベートした5A

10

20

30

40

50

15 × 10 A\_\_TBA (1.25 μM) およびトロンピン (1 μM) (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) をチャンバに流し、制御プログラムをさらに15分間運転した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0168】

考察

上記の方法を用いて、トロンピンの存在および非存在下で特徴的なブロックレベルを検出可能であった。プローブ5A15 × 10 A\_\_TBA (配列番号7) の添加により、レベル1にて1つのブロックレベルのみが観察された (図2aを参照されたい)。これに対して、プローブ5A15 × 10 A\_\_TBAをトロンピンとプレインキュベートした場合に、さらなるレベル (レベル2; 図2b) も検出された。トロンピンとプローブ5A15 × 10 A\_\_TBAとの結合により、平均電流より高い流れが測定され、このことは、脱塩基領域 (x) が - バレル内にあることを示した。2つのレベル間の差は、30.5 pAであった (図2b)。同じ実験を、配列番号8~18を用いて行った (8 = 11 × 19 A\_\_TBA、9 = 13 × 17 A\_\_TBA、10 = 15 × 15 A\_\_TBA、11 = 17 × 13 A\_\_TBA、12 = 19 × 11 A\_\_TBA、13 = 21 × 9 A\_\_TBA、14 = 23 × 7 A\_\_TBA、15 = 25 × 5 A\_\_TBA、16 = 27 × 3 A\_\_TBA、17 = 29 × 1 A\_\_TBAおよび18 = 30 × 0 A\_\_TBA)。

【実施例2】

【0169】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、溶液中のタンパク質トロンピンの濃度を検出できるかを説明する。

【0170】

材料および方法

電氣的測定は、銀めっきした (WO2009/077734) 標準的な128ウェルシリコンチップ (フォーマット直径75 μm、深さ20 μmおよびピッチ250 μm) を用いて得た。トロンピンの濃度の決定を可能にする実験を行うために、同じ実験構成手順を、実施例1に記載するようにして行い (ナノポア HL - (E111N/K147N) <sub>7</sub> (配列番号2) および緩衝剤1M KCl、10mM Tris pH7.5を用いる)、同じ初期制御プログラム (0mVにて10秒、170mVにて50秒、20回まで反復) を5分間運転した。

【0171】

5分後に、スクリプトを停止し、1M KCl、10mM Tris pH7.5中の5A15 × 10 A\_\_TBA (1.25 μM) をチャンバにピペットを用いて入れた。制御プログラムを、次いで、合計15分間運転した。この後に、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で少なくとも5分間一緒にプレインキュベートした5A15 × 10 A\_\_TBA (配列番号7、1.25 μM) およびトロンピン (100 nM) (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) をチャンバに流し、制御プログラムをさらに15分間運転した。チップの上の全容積の溶液を、次いで、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で最小限で5分間プレインキュベートした5A15 × 10 A\_\_TBA (1.25 μM) およびトロンピン (250 nM) の溶液で置き換え、制御プログラムをさらに15分間運転した。このプロセスを、500 nM、750 nMおよび1250 nMの濃度のトロンピンについて反復した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0172】

考察

上記の方法を用いて、プローブ5A15 × 10 A\_\_TBA (配列番号7) と結合するトロンピンに相当する事象の頻度を測定することが可能であった (図2を参照されたい)。このデータを次いで用いて、トロンピンの濃度対遮断事象の総数 (結合と未結合とを組み合わせたもの) と比較したトロンピン結合事象の比率の校正プロットを作成した。図3を参照されたい。これらの校正プロットを次いで用いて、トロンピンの未知試料の濃度を決

10

20

30

40

50

定できる。

【実施例 3】

【0173】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、著しくより低い濃度のトロンピン結合プローブを利用して、タンパク質トロンピンの存在を検出できるかを説明する。

【0174】

材料および方法

電氣的測定は、銀めっきした(WO2009/077734)標準的な128ウェルシリコンチップ(フォーマット直径75 $\mu$ m、深さ20 $\mu$ mおよびピッチ250 $\mu$ m)を用いて得た。より低い濃度のコレステロールタグ付加プローブ(コレステロールTEGを3'端に有する配列番号19)を用いるトロンピンの検出を可能にする実験を行うために、同じ実験構成手順を、実施例1に記載するようにして行い(ナノポア HL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)および緩衝剤1M KCl、10mM Tris pH7.5を用いる)、初期制御プログラム(0mVにて10秒、170mVにて50秒、20回まで反復)を5分間運転した。

10

【0175】

異なるアプタマーをより低い濃度で用いた以外は実施例1と同じ手順ステップに従った(アプタマーのみの運転=1M KCl、10mM Tris pH7.5中の15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEG(100pM)、ならびにアプタマープラストロンピンの運転=15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEG(100pM)およびトロンピン(100nM)(Cat No. T6884、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)。

20

【0176】

考察

上記の方法を用いて、著しくより低い濃度のプローブ15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEG(コレステロールTEGを3'端に有する配列番号19)を用いて、トロンピンの存在および非存在下で特徴的なブロックレベルを検出可能であった。上記の例では、プローブ15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEGを用いてレベル1を、そしてプローブ15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEGをトロンピンとプレインキュベートした場合にレベル1および2を観察できた(図4)。ステップレベルの変化が、100pM濃度だけのコレステロールタグ付加プローブ15x15A\_\_TBA\_\_3'CholTEGを用いて観察された。この濃度は、実施例2で試験したもののよりもかなり低い。

30

【実施例 4】

【0177】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、それぞれ独自の示差的なステップレベルシグナルを生じるいくつかの異なるトロンピン結合プローブを利用して、タンパク質トロンピンの存在を検出できるかを説明する。

【0178】

材料および方法

電氣的測定は、銀めっきした(WO2009/077734)標準的な128ウェルシリコンチップ(フォーマット直径75 $\mu$ m、深さ20 $\mu$ mおよびピッチ250 $\mu$ m)を用いて得た。多様な異なるプローブを用いてトロンピンの検出を可能にする実験を行うために、同じ実験構成手順を、実施例1に記載するようにして行い(ナノポア HL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)および緩衝剤1M KCl、10mM Tris pH7.5を用いる)、同じ初期制御プログラム(0mVにて10秒、170mVにて50秒、20回まで反復)を5分間運転した。

40

【0179】

5分後に、スクリプトを停止し、1M KCl、10mM Tris pH7.5中のプローブ5A15x10A\_\_TBA(配列番号7、310nM)、19x11A\_\_TBA(配列番号12、310nM)、17x13A\_\_TBA(配列番号11、310nM)お

50

よび15×15A\_\_TBA(配列番号10、310nM)をチャンバにピペットを用いて入れた。制御プログラムを、次いで、合計20分間運転した。この後に、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で最小限で5分間全て一緒にプレインキュベートした分析物5A15×10A\_\_TBA(310nM)、19×11A\_\_TBA(310nM)、17×13A\_\_TBA(310nM)および15×15A\_\_TBA(310nM)ならびにトロンピン(1.25μM)(Cat No. T6884、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)をチャンバに流し、制御プログラムをさらに20分間運転した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0180】

考察

上記の方法を用いて、トロンピンの存在下および非存在下の両方で用いたプローブのそれぞれについての示差的ステップレベルを検出することが可能であった(図5)。この実験は、観察されるステップレベルが、プローブ尾部配列に特異的であり、よって、複数のプローブ尾部を用いて1つより多いタンパク質を検出できたことを示す。

【実施例5】

【0181】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、溶液中の血小板由来増殖因子(PDGF)を検出できるかを説明する。

【0182】

材料および方法

電氣的測定は、1,2-ジフィタノイル-グリセロ-3-ホスホコリン脂質(Avanti Polar Lipids)2重層中に挿入された単一HL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)ナノポアから得た。2重層を、20μm厚のPTFEフィルム(カスタムDelrinチャンバ中)中の直径およそ100μmの開口を横切ってMontal-Mueller技術により形成して、2つの1mL緩衝溶液(1M KCl、10mM Tris pH7.5)を分けた。単一チャンネル電流を、1440Aデジタイザを備えるAxopatch 200B増幅器(Molecular Devices)で測定した。Ag/AgCl電極を緩衝溶液に接続して、シス区画(ナノポア、プローブおよびPDGFの両方が添加された)をAxopatchヘッドステージの接地と接続し、トランス区画をヘッドステージの活性電極と接続した。

【0183】

2重層中の単一孔を達成した後に、+180mVの印加電位にて対照を5分間運転した。スクリプトを次いで停止し、1M KCl、10mM Tris pH7.5緩衝剤中のプローブ17×8A\_\_PDGF(配列番号20、0.5μM)を電気生理学的チャンバのシス区画に加え、実験を20分間運転した。長い遮断事象(>15s)が検出された場合、電位を-180mVに即座に切り替えて、遮断している分析物を手動で排出した。スクリプトを次いで停止し、1M KCl、10mM Tris pH7.5緩衝剤中で最小限で5分間一緒にプレインキュベートしたプローブ17×8A\_\_PDGF(0.5μM)およびPDGF(1μM)(Biorbyt、Cat No: orb80544、Cambridge、UK)をシス区画に次いで加えて、実験をさらに20分間運転した。長い遮断事象は、ここでもまた、印加電位を即座に切り替えることにより排除した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0184】

考察

上記の方法を用いて、PDGFの存在下および非存在下で特徴的なステップレベルを検出可能であった。プローブ17×8A\_\_PDGF(配列番号20)を採用して、レベル1にてブロックレベルが観察された(図6aを参照されたい)。これに対して、17×8A\_\_PDGFとプレインキュベートしたPDGFを実験溶液に加えた場合に(レベル2)も検出された(図6bを参照されたい)。図7aおよび7bは、別のプローブ25×\_\_PDGF(配列番号21)を用いた場合に、PDGFの存在下および非存在下で生じるステッ

10

20

30

40

50

プレベルを示す。

【実施例 6】

【0185】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、溶液中の PDGF の濃度を検出できるかを説明する。

【0186】

材料および方法

電氣的測定は、銀めっきした (WO 2009/077734) 標準的な 128 ウェルシリコンチップ (フォーマット直径 75  $\mu\text{m}$ 、深さ 20  $\mu\text{m}$  およびピッチ 250  $\mu\text{m}$ ) を用いて得た。PDGF の濃度の決定を可能にする実験を行うために、実験構成手順を、実施例 1 に記載するようにして行い (ナノポア HL - (E111N/K147N)<sub>7</sub> (NN) (配列番号 2) および緩衝剤 1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 を用いる)、同じ初期制御プログラム (0 mV にて 10 秒、170 mV にて 50 秒、20 回まで反復) を 5 分間運転した。

【0187】

5 分後に、スクリプトを停止し、1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 中の 25 x PDGF (配列番号 21、0.5  $\mu\text{M}$ ) をチャンバにピペットを用いて入れた。制御プログラムを、次いで、合計 10 分間運転した。この後に、1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 中で最小限で 5 分間一緒にプレインキュベートした 25 x PDGF (0.5  $\mu\text{M}$ ) および PDGF (10 nM) (Biorbyt, Cat No: orb80544, Cambridge, UK) をチャンバに流し、制御プログラムを 10 分間運転した。チップの上の全容積の溶液を、次いで、1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 中で最小限で 5 分間一緒にプレインキュベートした 25 x PDGF (0.5  $\mu\text{M}$ ) および PDGF (33 nM) の溶液で置き換え、制御プログラムをさらに 10 分間運転した。このプロセスを、100 nM、330 nM および 1  $\mu\text{M}$  の濃度の PDGF について反復した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0188】

考察

上記の方法を用いて、プローブ 25 x PDGF (配列番号 21、図 7a および b を参照されたい) と結合する PDGF に相当する事象の頻度を測定することが可能であった。このデータを次いで用いて、PDGF の濃度対遮断事象の総数 (PDGF 結合と未結合とを組み合わせたもの) と比較した場合の PDGF 結合事象のみの比率の校正プロットを作成した。図 8 を参照されたい。この校正プロットを次いで用いて、PDGF の未知試料の濃度を決定できる。

【実施例 7】

【0189】

本実施例は、タンパク質ナノポアをどのようにして用いて、溶液中の ATP の存在を検出できるかを説明する。

【0190】

材料および方法

電氣的実験は、脂質 2 重層に挿入された単一孔 (ナノポア HL - (E111N/K147N)<sub>7</sub> (NN) (配列番号 2) および緩衝剤 1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 を用いる) を達成するために実施例 5 に記載するようにして設定し、次いで、+180 mV の印加電位にて対照を 5 分間運転した。PDGF の代わりに ATP を検出するために異なるアプタマーを用いた以外は、実施例 5 と同じ手順ステップを行った。アプタマーのみの運転について、本実施例で用いたアプタマーは、1 M KCl、10 mM Tris pH 7.5 中の 25 x ATP (配列番号 22、0.5  $\mu\text{M}$ ) であり、アプタマープラス ATP の運転について、以下の濃度の試薬を用いた: 25 x ATP (配列番号 22、0.5  $\mu\text{M}$ ) および ATP (10 mM) (Cat No: A6559, Sigma-Aldrich, Dorset, UK)。

## 【0191】

## 考察

上記の方法を用いて、ATPの存在下および非存在下で特徴的なブロックレベルを検出可能であった。プローブ25x\_\_ATP(配列番号22)を採用して、レベル1にてブロックが観察された(図9aを参照されたい)。これに対して、プローブ25x\_\_ATPをATPとブレインキュベートした場合に、さらなるレベル(レベル2;図9b)も検出された。ATPの場合、プローブ転位により生じる事象は非常に短く、結合したATPに相当する事象は著しく長い(図9b)。図10aおよび10bは、プローブ17x8A\_\_ATP(配列番号23)を用いた場合に、ATPの存在下および非存在下で生じるステップレベルを示す。

10

## 【実施例8】

## 【0192】

本実施例は、タンパク質ナノポアをどのようにして用いて、溶液中のATPの濃度を検出できるかを説明する。

## 【0193】

## 材料および方法

電気的実験は、脂質2重層に挿入された単一孔(ナノポアHL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)および緩衝剤1M KCl、10mM Tris pH7.5を用いる)を達成するために実施例5に記載するようにして設定し、次いで、+180mVの印加電位にて対照を5分間運転した。スクリプトを次いで停止し、1M KCl、10mM TRIS pH7.5緩衝剤中のプローブ17x8A\_\_ATP(配列番号23、0.5μM)を電気生理学的チャンバのシス区画に加え、実験を20分間運転した。長い遮断事象(>15s)が検出された場合、電位を-180mVに即座に切り替えて、遮断している分析物を手動で排出した。スクリプトを次いで停止し、1M KCl、10mM TRIS pH7.5緩衝剤中で最小限で5分間一緒にブレインキュベートしたプローブ17x8A\_\_ATP(0.5μM)およびATP(1μM)(Cat No: A6559、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)をシス区画に次いで加えて、実験をさらに10分間運転した。このプロセスを、3.3μM、10μMおよび100μMの濃度のATPについて反復した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

20

## 【0194】

## 考察

上記の方法を用いて、プローブ17x8A\_\_ATP(配列番号23、図10aおよびbを参照されたい)と結合するATPに相当する事象の頻度を測定することが可能であった。このデータを次いで用いて、ATPの濃度対遮断事象の総数(ATP結合と未結合とを組み合わせたもの)と比較した場合のATP結合事象の比率の校正プロットを作成した。図11を参照されたい。この校正プロットを次いで用いて、ATPの未知試料の濃度を決定できる。マイクロモル範囲においてKd値を有するのでより高い濃度のATPを加えることが必要であった以外は、同様の事象比率の増加が、トロンピンと同様にATPについて観察された(図11)。

30

## 【実施例9】

## 【0195】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、溶液中の1つより多い分析物(例えばATP、PDFGおよびトロンピン)の存在を検出できるかを説明する。

40

## 【0196】

## 材料および方法

電気的実験は、脂質2重層に挿入された単一孔(ナノポアHL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)および緩衝剤1M KCl、25mM Tris pH7.5を用いる)を達成するために実施例5に記載するようにして設定し、次いで、制御プログラム(0mVにて10秒、+180mVにて50秒、20回まで反復)を5分間運転した。スクリプトを次いで停止し、1M KCl、25mM TRIS pH7.5

50

緩衝剤中のプローブ15×15A\_\_TBA(配列番号10、166nM)、17×8A\_\_PDGF(配列番号20、166nM)および17×8A\_\_ATP(配列番号23、166nM)を電気生理学的チャンバのシス区画に加え、制御プログラムを10分間運転した。ATP(10mM)(Cat No:A6559、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)を次いでシス区画に加え、制御プログラムをさらに10分間運転した。このプロセスを、1μM、PDGF(Biorbyt、Cat No:orb80544、Cambridge、UK)および0.5μMトロンピン(Cat No:T6884、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)について反復した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

【0197】

10

考察

上記の方法を用いて、3つの分析物全てについて溶液中に存在する場合に特徴的なステップレベル変化を検出可能であった。個別に試験した場合に分析物のそれぞれについて観察された3つ全てのステップシグナルを、上記の実験においてみる事ができた(図12を参照されたい)。ATPおよびPDGFはともに、トロンピンよりも短い結合事象を生じるが、このことは、これらの分析物を用いて4重鎖構造が欠如していることによる可能性がある。よって、本方法を用いて、未知の混合物中の3つの分析物のいずれも検出可能である。

【実施例10】

【0198】

20

本実施例は、いくつかの濃度のトロンピンについて決定された実験的事象比率と、理論的に算出された事象比率とをどのようにして比較できるかを説明する。

【0199】

材料および方法 - 実験データ取得

電気的実験は、脂質2重層に挿入された単一孔(ナノポア HL-(E111N/K147N)<sub>7</sub>(NN)(配列番号2)および緩衝剤1M KCl、10mM Tris pH7.5を用いる)を達成するために実施例5に記載するようにして設定し、次いで、制御プログラム(0mVにて10秒、+180mVにて50秒、20回まで反復)を5分間運転した。この後に、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で少なくとも5分間一緒にプレインキュベートした5A15×10A\_\_TBA(配列番号7、1.25μM)およびトロンピン(10nM)(Cat No:T6884、Sigma-Aldrich、Dorset、UK)をチャンバに流し、制御プログラムをさらに15分間運転した。チップの上の全容積の溶液を、次いで、1M KCl、10mM Tris pH7.5中で最小限で5分間プレインキュベートした5A15×10A\_\_TBA(1.25μM)およびトロンピン(33nM)の溶液で置き換え、制御プログラムをさらに15分間運転した。このプロセスを、100nM、330nMおよび1000nMの濃度のトロンピンについて反復した。実験の最後に、制御プログラムを停止した。

30

【0200】

理論的算出

解離定数は、以下の等式を用いて算出できる：

40

【0201】

【数1】

$$K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$$

(式中、[P] = タンパク質のモル平衡濃度、[L] = アプタマーのモル平衡濃度および[C] = タンパク質 - アプタマー複合体のモル平衡濃度)

【0202】

トロンピンとそのアプタマーとの結合についての $K_d$ は、およそ50nMであることが

50

知られている。PおよびLの開始濃度の値がわかっており、これらを用いて、以下の等式を解くことによりモル平衡濃度を算出できる（式中、 $x$  = タンパク質 - アプタマー複合体のモル数）。

【0203】

【数2】

$$K_d = \frac{([P_{\text{開始}}] - x) \cdot ([L_{\text{開始}}] - x)}{x}$$

上記の2次方程式は、PおよびLのいくつかの開始濃度について並べ替えて解く（ $x$ の値を決定するため）ことができる。これらの値を、次いでプロットして、トロンビン濃度に対する事象比率の理論的校正プロットを得ることができる。図13の校正プロットは、理論的に算出された値（黒の線で示す）および実験で観察された値（灰色のバーチャートで示す）を示す。理論的値が、実験で決定された値と密接に一致することがグラフから明らかである。

10

【実施例11】

【0204】

本実施例は、ナノポアをどのようにして用いて、タンパク質ストレプトアビジンの存在を検出できるかを説明する。

【0205】

20

材料および方法

電気的測定は、各ウェル構造中に白金電極を有する標準的な128ウェルシリコンチップ（フォーマット直径75  $\mu\text{m}$ 、深さ20  $\mu\text{m}$ およびピッチ250  $\mu\text{m}$ ）を用いて得た。プローブを用いるストレプトアビジンの検出を可能にする実験を行うために、同じ実験構成手順を、実施例1に記載するようにして行い（ナノポア HL - (E111N/K147N)  $\gamma$  (NN) (配列番号2) および緩衝剤625 mM NaCl、100 mM HEPES、75 mM フェロシアン化カリウム、25 mM フェリシアン化カリウム、pH 8.0を用いる）、同じ初期制御プログラム（0 mVにて10秒、170 mVにて50秒、20回まで反復）を5分間運転した。

【0206】

30

異なるアプタマーを用いた以外は、実施例1と同じ手順ステップを行った（アプタマーのみの運転 = 625 mM NaCl、100 mM HEPES、75 mM フェロシアン化カリウム、25 mM フェリシアン化カリウム、pH 8.0中のStreptプローブ1（配列番号24、1.0  $\mu\text{M}$ ）、およびアプタマープラスストレプトアビジンの運転 = streptプローブ1（配列番号24、1.0  $\mu\text{M}$ ）およびストレプトアビジン（5.0 nM）（Sigma Aldrich））。

【0207】

考察

上記の方法を用いて、ストレプトアビジンの存在下（図14b）および非存在下（図14a）で特徴的なブロックレベルを検出可能であった。streptプローブ1（配列番号24）の添加により、レベル1のブロックレベルだけが観察された（図14aを参照されたい）。これに対して、streptプローブ1をストレプトアビジンとプレインキュベートした場合に、さらなるレベル（レベル2；図14b）も検出された。図15は、ストレプトアビジンの存在下（2）および非存在下（1）でアプタマー配列streptプローブ1（配列番号24）について観察される異なるブロックレベルの拡大図を示す（ $y$ 軸 = 電流（pA）および $x$ 軸 = (a) および (b) についての時間（s））。これは、表示の目的のために、Besselフィルタにかけた。

40

【実施例12】

【0208】

本実施例は、ナノポアがどのようにして、K2 EDTA (Harlan Scien

50

t i f i c、コード - S . B - 0 0 0 9 ) 中に 2 0 % ウサギ全血を含有する試料中でタンパク質トロンピン、PDGF および ATP の存在を検出できるかを説明する。

【 0 2 0 9 】

材料および方法

電氣的測定は、白金めっきした ( W O 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 ) 標準的な 1 2 8 ウェルシリコンチップ ( フォーマット直径 7 5 μ m、深さ 2 0 μ m およびピッチ 2 5 0 μ m ) を用いて得る。K 2 E D T A ( H a r l a n S c i e n t i f i c、コード - S . B - 0 0 0 9 ) 中に 2 0 % ウサギ全血を含有する試料中でタンパク質トロンピン、PDGF および ATP の存在の検出を可能にする実験を行うために、同じ実験構成手順を、実施例 1 に記載するようにして行い ( ナノポア H L - ( E 1 1 1 N / K 1 4 7 N ) <sub>7</sub> ( N N ) および緩衝剤 6 2 5 m M K C l、1 0 0 m M H E P E S、7 5 m M フェロシアン化カリウム、2 5 m M フェリシアン化カリウム p H 8 . 0 を用いる )、同じ初期制御プログラム ( 0 m V にて 1 0 秒、1 7 0 m V にて 5 0 秒、2 0 回まで反復 ) を 3 分間運転する。

10

【 0 2 1 0 】

3 分後に、スクリプトを停止し、K 2 E D T A ( H a r l a n S c i e n t i f i c、コード - S . B - 0 0 0 9 ) 8 0 % 緩衝剤 ( 6 2 5 m M K C l、1 0 0 m M H E P E S、7 5 m M フェロシアン化カリウム、2 5 m M フェリシアン化カリウム p H 8 . 0 ) 中の 2 0 % ウサギ全血中でチャンバに加える前に最小限で 5 分間一緒にプレインキュベートした 2 7 x 3 A \_ \_ T B A ( 配列番号 1 6、1 2 5 n M )、1 7 x 8 A \_ \_ P D G F ( 配列番号 2 0、1 2 5 n M ) および 2 5 x \_ \_ A T P ( 配列番号 2 2、1 2 5 n M )、トロンピン ( 1 μ M ) ( C a t N o . T 6 8 8 4、S i g m a - A l d r i c h、D o r s e t、U K )、P D G F ( 1 μ M ) および A T P ( 1 0 m M ) をチャンバに流し、制御プログラムを運転する。実験の最後に、制御プログラムを停止する。

20

【 0 2 1 1 】

考察

上記の方法を用いて、K 2 E D T A ( H a r l a n S c i e n t i f i c、コード - S . B - 0 0 0 9 ) 8 0 % 緩衝液中の 2 0 % 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。

30

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ダマーと、( i i ) 孔に侵入でき、プローブ中のアダ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、

40

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、そのアダ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。

50

[ 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ダマーを含む、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ダマーを含む、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ダマーを含む、上記 [ 1 ] に記載の方法。

10

[ 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、アダ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、アダ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。

20

[ 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。

[ 10 ]

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、アダ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、アダ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。

30

[ 11 ]

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 [ 10 ] に記載の方法。

[ 12 ]

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、アダ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、アダ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。

[ 13 ]

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 [ 12 ] のいずれか一項に記載の方法。

40

[ 14 ]

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 [ 13 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 15 ]

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。

[ 16 ]

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

[ 17 ]

50

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。

10

[ 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。

20

[ 2 4 ]

群が、約 4 から約 1 0 0 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。

30

[ 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。

40

[ 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 smegmati

50

s) 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ターリポタンパク質 ( 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 % の同一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 % の同一性を有し、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 5 0 % の同一性を有し、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 つ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

10

20

30

40

50

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。

10

**【符号の説明】**

**【 0 2 1 2 】**

配列番号1は、 - 溶血素 - E 1 1 1 N / K 1 4 7 N ( - H L - N N ; ( Stoddart, D. S.ら、(2009)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106、7702 ~ 7707頁 ) の1つのサブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

20

配列番号2は、 - H L - N N の1つのサブユニットのアミノ酸配列を示す。

配列番号3は、 - 溶血素の L u k F サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

配列番号4は、 - 溶血素の L u k F サブユニットのアミノ酸配列を示す。

配列番号5は、 - 溶血素の H l g 2 サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

配列番号6は、 - 溶血素の H l g 2 サブユニットのアミノ酸配列を示す。

配列番号7から24は、実施例において用いた配列を示す。

【 図 1 】

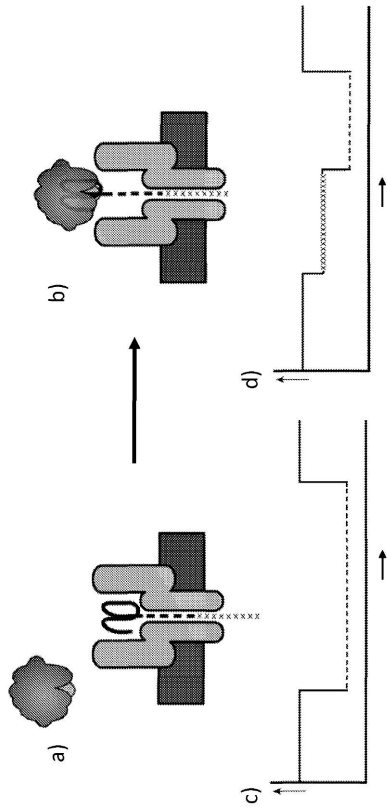


Fig 1

【 図 2 】

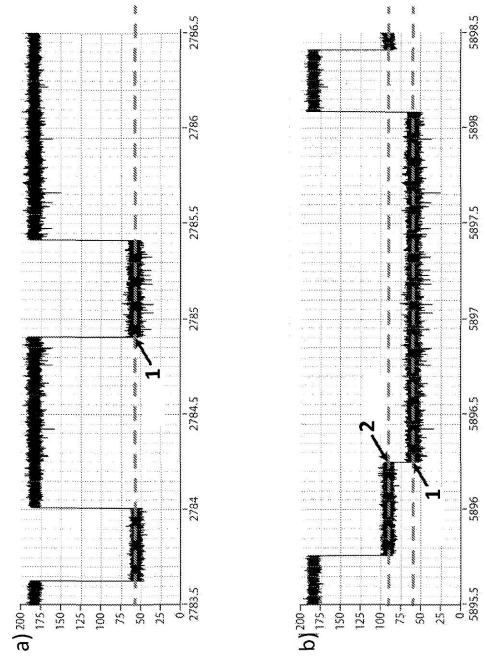


Fig 2

【 図 3 】

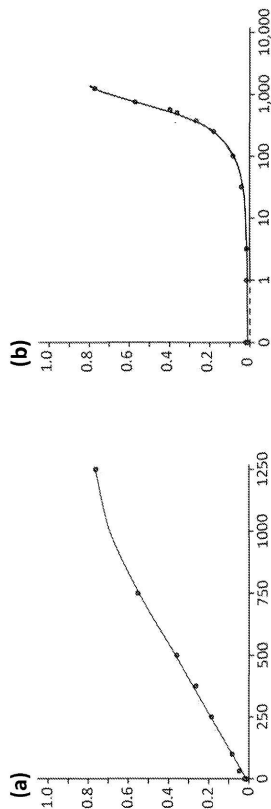


Fig 3

【 図 4 】

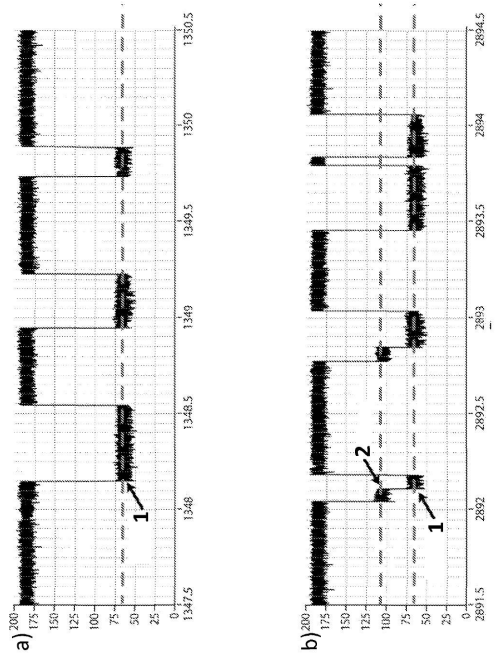


Fig 4

【 図 5 】

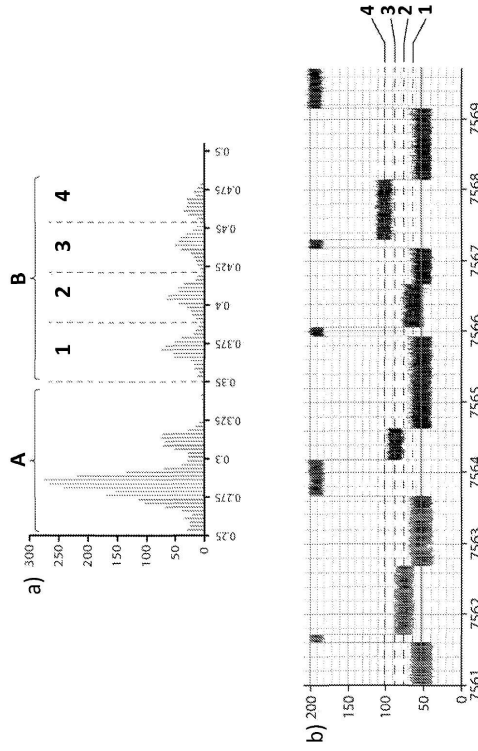


Fig 5

【 図 6 】

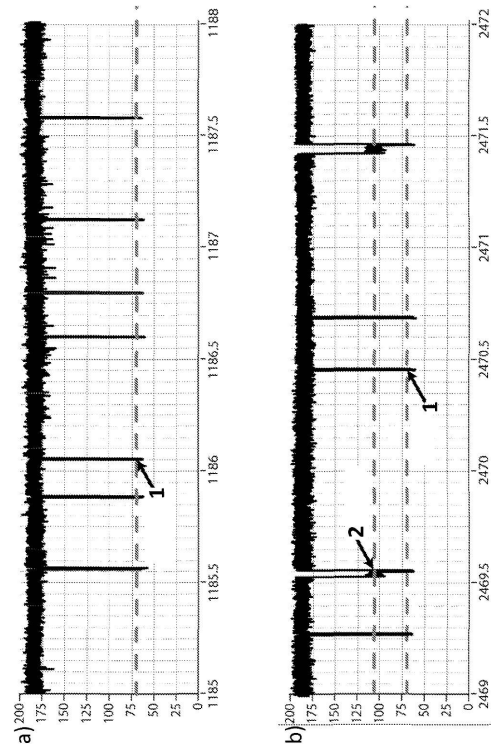


Fig 6

【 図 7 】

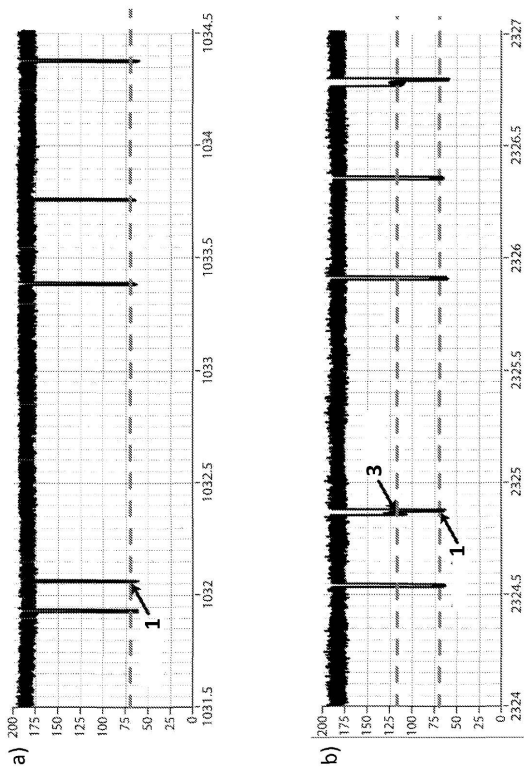


Fig 7

【 図 8 】

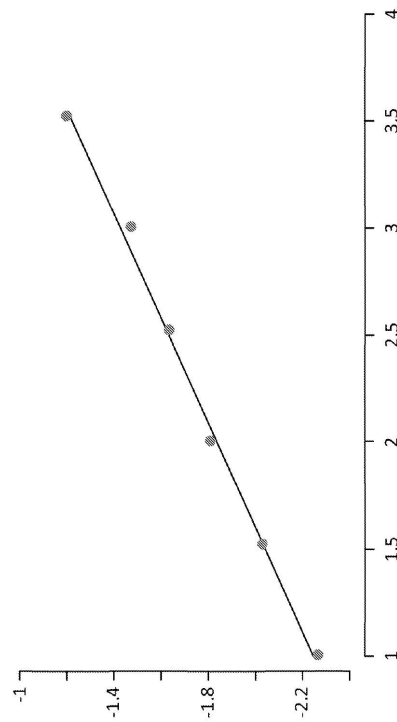


Fig 8

【 図 9 】

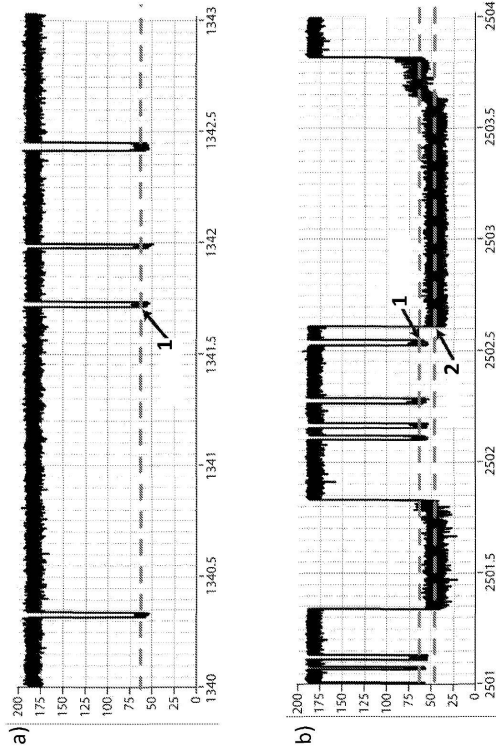


Fig 9

【 図 10 】

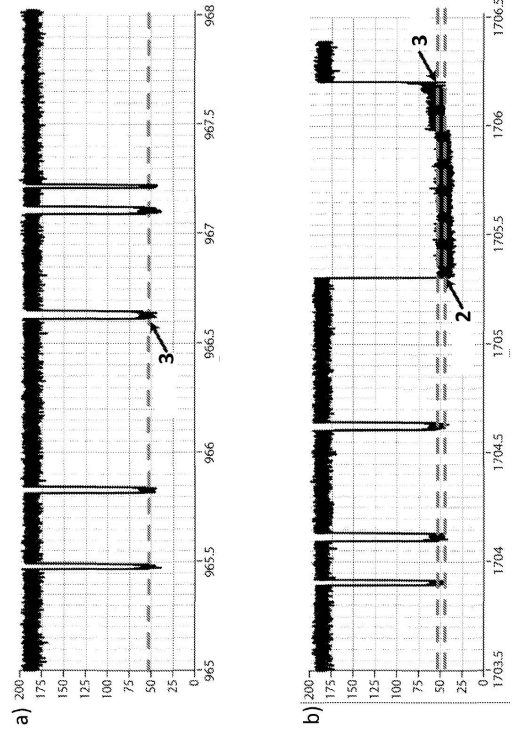


Fig 10

【 図 11 】

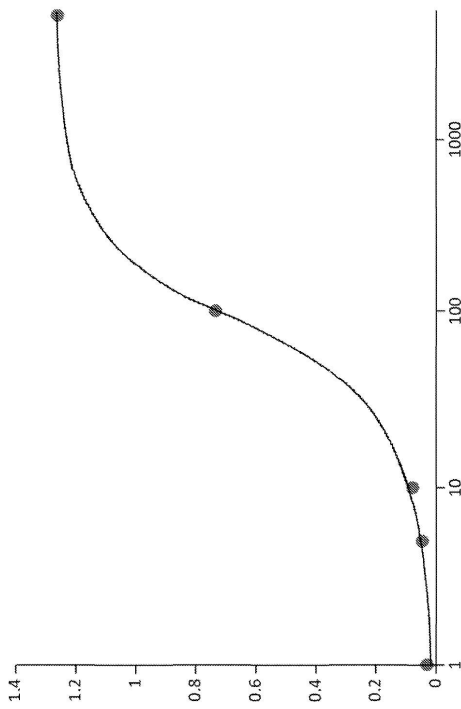


Fig 11

【 図 12 】

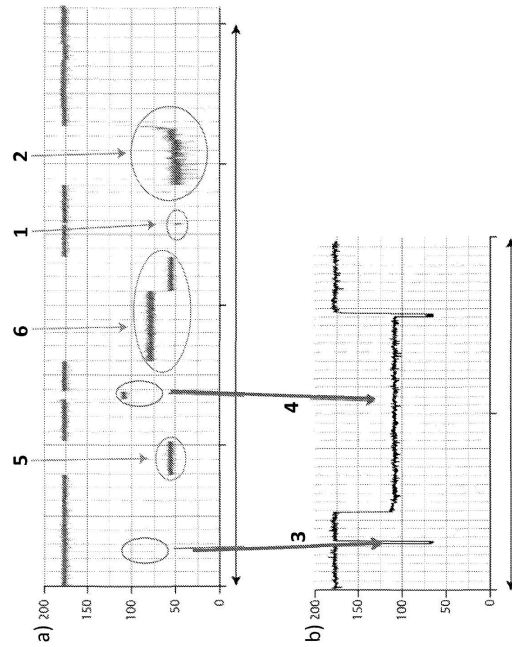


Fig 12

【 13 】

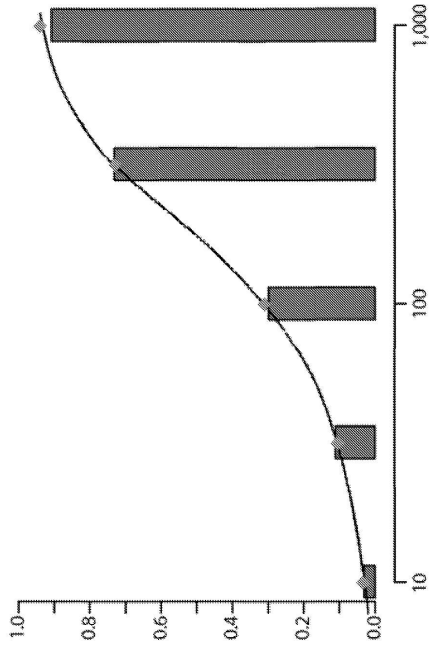


Fig 13

【 14 】

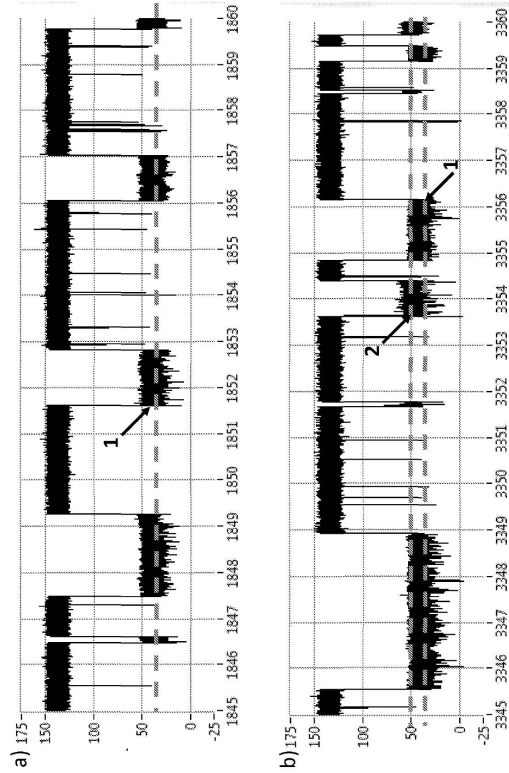


Fig 14

【 15 】

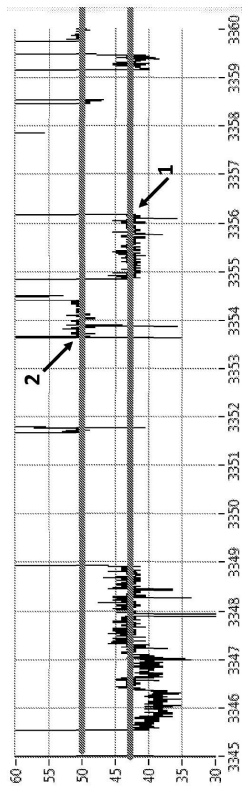


Fig 15

【 16 】

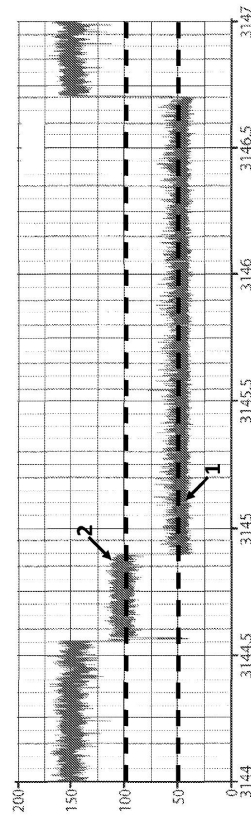


Fig 16

【図 17】

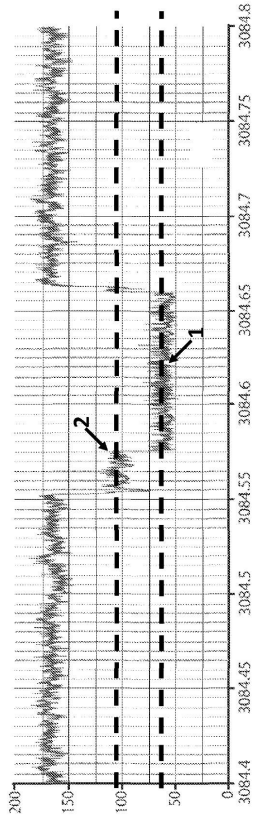


Fig 17

【図 18】

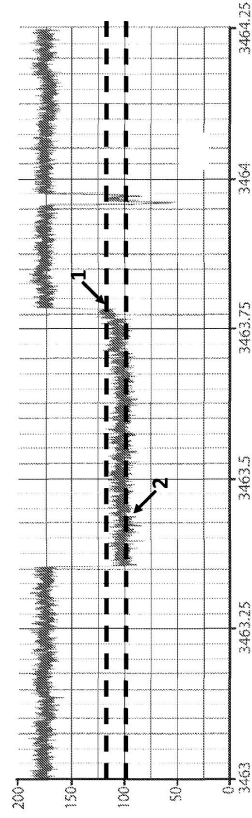


Fig 18

【配列表】

0006275052000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 ターナー, ダニエル ジョン  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンس パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 フォーダム, ダニエル ジョージ  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ジル, ロジャー チャールズ  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ブラウン, クライブ ギャビン  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 レイド, スチュアート  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 クラーク, ジェームス アンソニー  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ホワイト, ジェームス  
イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーエー, オックスフォード サイエンс パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 国際公開第2012/009578 (WO, A1)  
米国特許第06246231 (US, B1)  
特表2010-524436 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/00  
C12Q 1/68  
G01N 33/48-98  
C12N 15/00  
C A p l u s / M E D L I N E ( S T N )

专利名称(译)	适体方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6275052B2</a>	公开(公告)日	2018-02-07
申请号	JP2014557118	申请日	2013-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	牛津楠路珀尔科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津Nanoporu科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	牛津Nanoporu科技有限公司		
[标]发明人	ターナーダニエルジョン フォーダムダニエルジョージ ジルロジャーチャールズ ブラウクラライブギャビン レイドスチュアート クラークジェームスアンソニー ホワイトジェームス		
发明人	ターナー,ダニエル ジョン フォーダム,ダニエル ジョージ ジル,ロジャー チャールズ ブラウン,クライブ ギャビン レイド,スチュアート クラーク,ジェームス アンソニー ホワイト,ジェームス		
IPC分类号	G01N27/00 G01N33/536 C12Q1/68 C12N15/115		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N2333/705 C12N15/115 G01N33/54386 G01N2333/36 G01N2333/49 G01N2333/96463		
FI分类号	G01N27/00.Z G01N33/536.Z C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.H		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	61/599240 2012-02-15 US		
其他公开文献	JP2015508893A5 JP2015508893A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种在样品中确定一组两种或更多种分析物的一种或多种分析物成分的存在或不存在的新方法。因此，本发明涉及用于确定一组多种分析物中每种分析物的存在或不存在的多重测定。该测定使用适体和跨膜孔。

(45) 発行日 平成30年2月7日 (2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日 (2018.1.19)

(5) Int. Cl.		F I	
GO 1 N	27/00 (2006.01)	GO 1 N	27/00 Z
GO 1 N	33/536 (2006.01)	GO 1 N	33/536 Z
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A A
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/00 H

請求項の数 18 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2014-557118 (P2014-557118)	(73) 特許権者	511252899
(86) (22) 出願日	平成25年2月14日 (2013.2.14)		オックスフォード ナノボール テクノロ
(65) 公表番号	特表2015-508893 (P2015-508893A)		ジーズ リミテッド
(43) 公表日	平成27年3月23日 (2015.3.23)		イギリス国 オックスフォードシャー オ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2013/050348		ーエックス4 4ジーエー, オックスフォ
(87) 国際公開番号	W02013/121201		ード, オックスフォード サイエンス パ
(87) 国際公開日	平成25年8月22日 (2013.8.22)		ーク, ロバート ロビンソン アベニュー
審査請求日	平成28年2月10日 (2016.2.10)		4, エドマンド カートライト ハウス
(31) 優先権主張番号	61/599,240	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成24年2月15日 (2012.2.15)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アブターマ法