



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월25일
 (11) 등록번호 10-1679869
 (24) 등록일자 2016년11월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C40B 20/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7024838
- (22) 출원일자(국제) 2009년04월03일
 심사청구일자 2014년04월02일
- (85) 번역문제출일자 2010년11월04일
- (65) 공개번호 10-2010-0131517
- (43) 공개일자 2010년12월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/002122
- (87) 국제공개번호 WO 2009/123762
 국제공개일자 2009년10월08일
- (30) 우선권주장
 61/072,985 2008년04월05일 미국(US)
 61/141,579 2008년12월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 EP01566635 A1*
 WO1999039829 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 싱글 셀 테크놀로지, 아이엔씨.
 미국, 캘리포니아 95138, 산 호세, 5941 옵티컬 코트
- (72) 발명자
 첸, 춘-난
 미국, 캘리포니아 95129, 산 호세, 1064 할란 드라이브
 보울비, 제임스, 오.
 미국, 캘리포니아 95129, 산 호세, 1285 브렛무르웨이
 조르겐센, 리차드, 알렉
 미국, 캘리포니아 95124, 산 호세, 2894 러스틱 드라이브
- (74) 대리인
 허용록

전체 청구항 수 : 총 13 항

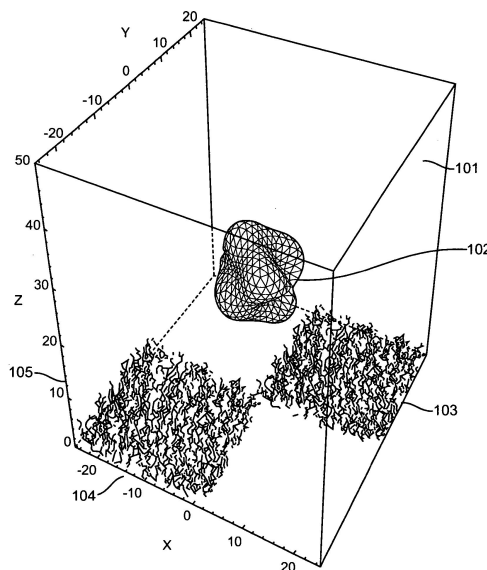
심사관 : 윤준호

(54) 발명의 명칭 **생물학적 활성제의 생산을 위한 단일 세포의 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 단백질, 핵산, 또는 단백질과 그 단백질을 암호화하는 핵산 등 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제의 생산을 위해서 단일 세포를 스크리닝하기 위한 방법, 장치 및 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

복수의 개별 세포를 복수의 개별 웰에 배치하는 단계로, 각 세포가 하나 이상의 단백질을 생산하는, 단계;

웰 안의 상기 하나 이상의 단백질을 하나 이상의 단백질 결합제를 포함하는 제1 표면과 접촉시키는 단계로, 상기 단백질 결합제는 하나 이상의 단백질을 선택적으로 결합하고 상기 제1 표면은 개별 웰과 관련될 수 있는 어드레스 지정 영역을 포함하는, 단계;

상기 하나 이상의 단백질의 하나 이상의 특성 및 제1 표면의 특정 어드레스 지정 영역에 대한 하나 이상의 특성을 확인하여 특정 관심 웰을 식별하는 단계;

웰 안의 세포를 용해하는 단계;

용해된 세포를 제2 표면과 접촉시키는 단계;

용해된 세포로부터의 핵산과, 제2 표면에 결합된 올리고뉴클레오티드 태그 (tag)을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 혼성화하는 단계로, 상기 제2 표면은 개별 웰과 관련될 수 있는 영역을 포함하며 각 영역에서 상기 올리고뉴클레오티드 태그는 상이한, 단계;

혼성화된 핵산을 제2 표면상의 영역에 특이적인 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 복제 핵산으로 변환하는 단계;

태그된(tagged) 복제 핵산을 모으는 단계;

초고속 대량 핵산 서열화(ultra high throughput nucleic acid sequencing)를 사용하여 상기 태그된 복제 핵산을 서열화하는 단계; 및

복제 핵산 서열을 단백질의 특성과 연계시키는 특정 웰과, 복제 핵산 서열을 연계시키기 위하여 올리고뉴클레오티드 태그 서열을 활용하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 세포로부터 생산된 단백질에 관한 단백질 및 핵산 서열 정보를 획득하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

세포 집단으로부터 복수의 개별 세포를 복수의 개별 웰에 배치하는 단계로, 상기 세포는 하나 이상의 단백질을 생산하는, 단계;

제1 표면에 결합된 하나 이상의 단백질 결합제를 사용하여 단백질을 접촉시키고 단리하는 단계;

웰 안의 세포를 용해하는 단계;

용해된 세포를 제2 표면과 접촉시키는 단계;

용해된 세포로부터의 핵산과, 제2 표면에 결합된 올리고뉴클레오티드 태그 (tag)을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 혼성화하는 단계로, 상기 제2 표면은 개별 웰과 관련될 수 있는 영역을 포함하며 각 영역에서 상기 올리고뉴클레오티드 태그는 상이한, 단계;

혼성화된 핵산을 제2 표면상의 영역에 특이적인 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 복제 핵산으로 변환하는 단계;

태그된(tagged) 복제 핵산을 모으는 단계;

초고속 대량 핵산 서열화(ultra high throughput nucleic acid sequencing)를 사용하여 상기 태그된 복제 핵산을 서열화하는 단계; 및

핵산 서열을 단백질과 관련시키는 특정 웰과, 복제 핵산 서열을 연계시키기 위하여 올리고뉴클레오티드 태그 서열을 활용하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 세포로부터 생산된 단백질에 관한 단백질 및 핵산 서열 정보를 획득하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

상기 용해된 세포로부터의 핵산은 mRNA이고, 상기 복제 핵산은 cDNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

세포는 항체 생산 세포(antibody producing cells)이고, 단백질을 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

상기 항체 생산 세포는 B 세포 또는 형질 세포(plasma cell)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

하나 이상의 단백질 결합체는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L, 단백질 A/G 또는 항-IgG Fc γ 아류(subclass)-특이적 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

1,000개 이상의 개별 세포들이 1cm^2 당 100개 이상의 웰의 웰 밀도를 갖는 웰 트레이 중 상응하는 개수의 개별 웰 내에 배치되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

10,000개 이상의 개별 세포들은 상응하는 개수의 개별 웰 내에 배치되고, 제1 및 제2 표면상에 상응하는 개수의 어드레스 지정 영역이 존재하고; 그리고 상기 웰은 $100\text{ 마이크로웰}/\text{cm}^2$ 초과 밀도로 제작된 마이크로웰이고, 이때 각각의 마이크로웰은 1 피코리터 내지 500 나노리터 사이의 부피를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 1 항 또는 제 15 항에 있어서,

단백질은 항체이고, 상기 택된 복제 핵산을 서열화하는 단계는 항체의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열을 획득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

항체에 관한 메타데이터를 생성하기 위하여 상기 뉴클레오티드 서열을 사용(employing)하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 29

제 28 항에 있어서,

상기 메타데이터는 상기 뉴클레오티드 서열에 기초한 상기 항체의 결합 특성을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 메타데이터는 상기 세포 집단에서 상기 뉴클레오티드의 발생 빈도에 기초한, 상기 세포 집단에서 상기 항체의 발생 빈도를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

복수의 세포를 복수의 웰에 배치하는 단계;

세포가 항체를 생산할 수 있는 조건하에서 웰 내의 세포가 존재하도록 두는 단계;

웰에 관련될 수 있는 영역을 포함하는 제1 표면과 웰 내의 항체를 접촉시키는 단계로, 상기 제1 표면은 항체 결합제를 포함하는 단계;

제1 표면상의 영역에 결합된 항체와 하나 이상의 항체 결합제를 접촉시키는 단계;

제1 표면의 영역 상의 항체에 대한 하나 이상의 항체 결합제의 결합에 관한 결합 정보를 결정하는 단계;

웰 내의 세포를 용해하는 단계;

용해된 세포와 제2 표면을 접촉시키는 단계;

용해된 세포로부터의 핵산과, 제2 표면에 독특한 태그(unique tag)을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 혼성화하는 단계;

혼성화된 핵산을 복제 핵산으로 변환하는 단계;

용해된 세포로부터의 핵산의 핵산 복제물에 올리고뉴클레오티드 태그를 포함시키는 단계로, 각각의 올리고뉴클레오티드 태그는 단일 웰과 독특하게 관련되는 단계;

복수의 웰로부터 핵산 복제물들을 모으는 단계;

초고속 대량 DNA 서열 기술(ultra high throughput DNA technology)을 사용하여 모은 핵산을 서열화하는 단계; 및

항체로부터의 결합 정보와 뉴클레오티드 서열을 관련시키기 위하여, 웰과 뉴클레오티드 서열이 관련되도록 올리고뉴클레오티드 태그 서열을 사용하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 세포로부터 생산된 단백질에 관한 단백질 및 핵산 서열 정보를 획득하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 단백질, 핵산, 또는 단백질과 그 단백질을 암호화하는 핵산 등 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제의 생산을 위해 단일 세포를 스크리닝하기 위한 방법, 장치 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하나 이상의 생물학적 활성제의 생산을 위해서는 단일 세포 또는 세포 소집단을 스크리닝하는 것이 대체로 바람직하다. 이러한 정보를 사용하여 생물학적 활성제, 예를 들어 소분자, 단백질, 또는 siRNA와 같은 약물 후보에

노출된 후의 세포의 상태나 활성을 결정함으로써 세포에 대한 이러한 생물학적 활성제들의 효과를 판단할 수 있다. 또한, 이러한 정보는 생물학적 활성제의 특정 변이형, 예를 들어 SNP나 항체를 발현하는 세포를 확인하는데도 유용할 수 있다. 또한, 이러한 정보는 관심 있는 생물학적 활성제, 예를 들어 항체를 암호화하는 핵산 서열을 확인하는데도 유용할 수 있으며, 이로써 복수의 세포에서 이 뉴클레오티드 서열의 빈도를 활용하여, 이들이 생성한 단백질의 거동이나 그에 따른 표현형을 예측하거나 모델링할 수 있다. 본원의 방법, 장치 및 키트는 이러한 활용 및 유사한 활용에 관한 것이다.

발명의 내용

[0003] 본 발명은 단백질, 핵산, 또는 단백질과 그 단백질을 암호화하는 핵산 등 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제를 생산하기 위해 단일 세포를 스크리닝하기 위한 방법, 장치 및 키트에 관한 것이다.

[0004] 본 방법을 실시하는데 있어서, 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제를 생산하는 세포가 개별 웰에 분리된다. 웰에서 하나 이상의 생물학적 활성제를 생산하도록 세포가 방치되고, 이어서 웰 안의 하나 이상의 생물학적 활성제가 고상 표면에 결합된 하나 이상의 결합제와 접촉된다. 결합제(들)는 웰 안의 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제와 결합하며, 그 다음에 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제와 결합제 또는 표적 결합 단백질의 결합에 기초하여 웰에 존재하는 세포에 관한 정보, 예를 들어 웰의 세포에서 신호화 경로가 활성/비활성인지의 여부에 대한 정보가 결정된다. 다음에, 이 정보가 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과 연계되고, 이로써 관심의 특정 웰이 확인될 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서는 생물학적 활성제가 웰에 제공되며, 이로써 웰에 존재하는 세포의 상태 및/또는 활성에 영향을 미친다.

[0005] 본 발명의 일부 양태에서, 본 방법은 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제, 예를 들어 관심 있는 단백질을 포함하는 하나 이상의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 획득하는 단계, 및 관심 있는 생물학적 활성제의 결합 특성에 대한 정보와 관심 있는 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(들)을 상관시키는 단계를 더 포함한다.

[0006] 본 발명의 일부 양태에서, 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제를 암호화하는 유일한 뉴클레오티드 서열이 획득된다. 이들 양태에서, 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제를 생산하는 세포가 개별 웰에 분리되고, 하나 이상의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 획득된다. 다음에, 이 데이터를 사용하여 관심의 생물학적 활성제에 대한 메타데이터, 예를 들어 생물학적 활성제(들)의 결합 특성, 또는 관심의 생물학적 활성제가 스크리닝된 세포 집단에 나타나는 빈도가 얻어질 수 있다.

[0007] 이와 같이, 본 발명은 세포 집단을 분석하여 그 집단의 평균 측정값을 보고하는 것이 아니라 다수의 세포를 개별적으로 분석하는 효과적인 방법을 제공한다. 세포가 분리되고 소형 마이크로웰에서 가공되는데, 이때 마이크로웰 사이에서 분자들의 확산은 지연되거나 차단된다. 추가하여, 각 마이크로웰은 작은 치수로 인하여 mRNA 혼성화나 단백질 포착 등에서 신속한 반응 속도를 조장한다. 또한, 고상 기관 위에 포착된 단백질은 기관 위에 어레이를 형성하며, 이 경우 고상 기관 위에서 접촉하고 있는 동안, 또는 포착된 모든 단백질이나 복합체에 공통된 표지된 친화성 리간드와 접촉했을 때 단백질의 동력학적 특성이 일괄하여 분석될 수 있다.

[0008] 본 발명의 이러한 목적 및 다른 목적, 이점 및 특징들이 아래 더 충분히 설명된 본 발명의 방법 및 구체예에 대한 상세한 내용을 읽음으로써 이 분야의 통상의 기술자에게 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 본 발명은 첨부된 도면과 함께 이후의 상세한 설명을 읽음으로써 가장 잘 이해된다. 통상의 관례대로 도면의 여러 특징구조들에는 크기 비례가 적용되지 않았다. 반대로 여러 특징구조들의 치수는 명확성을 위해서 임의로 확대 또는 축소되었다. 다음 도면들이 도면에 포함된다.

도 1은 마이크로웰에서 포착된 B 세포 또는 혈장 세포를 도식화하여 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 멀티-웰 시스템과 함께 사용가능한 방법의 순서도이다.

도 3은 mRNA 포착 및 택이 붙은 cDNA로의 후속 전환을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 4는 항체-생산 세포로부터 mRNA를 포착하기 위한 2개의 올리고뉴클레오티드 프로브의 특징을 나타내며, 하나는 마우스 중쇄 용이교(위)(서열번호: 1), 하나는 마우스 경쇄 용이교(아래)(서열번호: 2). 401과 406은 엔도뉴클레아제 XhoI에 의해 마이크로어레이로부터 합성된 cDNA를 절단하는데 사용된 인식 부위이다. 402와 406은 PCR 증폭에 사용될 수 있는 프라이머 서열이다. 403과 408은 PCR 프라이머와 Ns(404 및 409)로 표시된 오차-보

정 해밍 코드를 함유하는 특유한 14-뉴클레오타이드 택의 구별을 강화하기 위한 랜드마크 디뉴클레오타이드이다. 405는 이소타입 1, 2a 및 2b를 포함하는 마우스 중쇄 mRNA 불변 영역에 상보하는 올리고이다. 이에 더하여, 410은 마우스 카파 경쇄 mRNA에 상보하는 올리고이다. 스페이서와 6개의 테옥시아데노신 잔기가 존재하며, 이로써 마이크로어레이 표면에서 먼 곳의 올리고가 포착되어 포착 효율이 나아진다.

도 5는 본 발명의 시스템과 함께 사용가능한 멀티-웰 트레이 구성요소(1)의 구체예의 도해이다. 이 웰은 열을 따라 색인 또는 어드레스 1-12(2)를 포함하고, 행을 따라 색인 또는 어드레스 A-H(3)를 포함하며, 종래의 96-웰 트레이를 제공한다.

도 6은 본 발명과 함께 사용가능한 멀티-웰 트레이 상부 구성요소의 도해이다. 상부(4)는 베이스 프레임(5)으로 이루어지고, 상부 위에 다수의 영역(6)을 포함한다. 각 영역(6)은 도 5의 멀티-웰 트레이(1)와 마찬가지로 색인에 의해 어드레스가 부여된다. 도 5의 트레이와 마찬가지로 영역들은 열을 따라 1-12까지 번호가 매겨지고, 행을 따라 A-H로 지정된다. 예를 들어, 도 7의 상부 구성요소와 정확히 정렬시키기 위해 부분(14-17)이 잘라내 진다.

도 7은 도 6의 상부 구성요소와 함께 사용가능한 멀티-웰 트레이 구성요소의 제 2 구체예의 도해이다. 이 트레이는 복수의 웰(9)을 포함하는 프레임(8)으로 이루어진다. 이 트레이는 각 코너에 위쪽으로 연장된 노치(10, 11, 12 및 13)를 포함한다. 노치(10-13)는 도 6에 도시된 상부의 잘라낸 부분(14, 15, 16 및 17) 안에 꼭 맞는다. 이 방식으로, 상부와 트레이가 서로 정확하게 정렬될 수 있다.

도 8은 도 6에 도시된 상부의 제 2 구체예의 도해이며, 상부는 각 영역에 돌기를 포함한다. 트레이 상부(20)는 프레임(21)과 도 5의 웰(3)에 상응하는 각 영역 상의 돌기(22)로 이루어진다. 이 도면에 묘사된 구체예에서는 각 영역이 단일 돌기를 포함한다. 그러나, 이 영역은 2개, 3개, 4개 또는 어떤 더 많은 수의 돌기를 포함할 수도 있다.

도 9는 트레이와 트레이 상부를 정렬시키기 위한 특정한 구성요소들을 나타낸 본 발명의 시스템의 분해도이다.

도 10은 상이한 디자인과 구성을 가진 마이크로웰(601-608)의 도해이며, 이들은 시야가 모든 마이크로-웰을 포함하지 못할 경우 국한하여 어드레스를 부여할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0010]

[0011] 본원에서 사용되었을 때, 생물학적 활성제는 생물학적 시스템에서 활성을 지니는 어떤 제제이다. 생물학적 활성제의 예로는 소분자 화합물; 폴리펩티드, 예를 들어 단백질; siRNA; 및 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 복수의 이러한 생물학적 활성제는, 예를 들어 2 이상의 이러한 활성제; 어떤 경우 3 이상의 활성제; 5 이상의 활성제; 10 이상의 활성제; 20 이상의 활성제; 50 이상의 활성제; 100 이상의 활성제; 500 이상의 활성제; 1000 이상의 활성제; 5000 이상의 활성제; 10,000 이상의 활성제; 30,000 이상의 활성제; 100,000 이상의 활성제; 또는 1,000,000 이상의 이러한 활성제를 포함할 것이다.

[0012]

[0013] 본원에서 사용되었을 때, 용어 "택(들)"은 그 기원의 물리적 위치를 확인할 수 있는 부분을 말한다. 일부 구체예에서, 택은 올리고뉴클레오타이드 택(들)일 수 있으며, 이때 올리고뉴클레오타이드의 서열이 그 기원의 물리적 위치를 확인하기 위한 택으로서 작용한다.

[0013]

본원에서 사용되었을 때, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 천연 또는 변형된 모노머나 결합들의 선형 올리고머를 포함하며, 여기에는 테옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 이들의 아노머 형태, 펩티드 핵산(PNA) 등이 포함되고, 이들은 왓슨-크릭 타입 염기쌍, 염기 적층, 후그스틴 또는 역 후그스틴 타입 염기쌍 등과 같은 규칙적인 패턴의 모노머-모노머 상호작용에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로 모노머는 포스포디에스테르 결합 또는 그것의 유사형에 의해 연결되어, 수 모노머 단위, 예를 들어 3-4개에서 수십 모노머 단위, 예를 들어 40-60개까지의 크기 범위에서 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 올리고뉴클레오타이드가 "ATGCTG"와 같이 연속 문자로 표시될 때는, 다른 주지사항이 없다면 이 뉴클레오타이드가 좌측에서 우측 방향으로 5'-.3'의 순서라는 것과, "A"는 테옥시아데노신, "C"는 테옥시시티딘, "G"는 테옥시구아노신 그리고 "T"는 티미딘을 표시한다는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 4개의 천연 뉴클레오타이드를 포함하지만, 비-천연 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수도 있다. 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 가진 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있는 경우, 예를 들어 효소에 의한 가공이 필요한 경우, 일반적으로 천연 뉴클레오타이드로 구성된 올리고뉴클레오타이드가 요구된다는 것이 이 분야의 통상의 기술자에게 자명하다.

- [0014] 듀플렉스에 대한 언급에서 "완벽히 매치된"은 그 듀플렉스를 구성하는 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드 가닥이 각 가닥의 모든 뉴클레오티드가 다른 가닥의 뉴클레오티드와 왓슨-크릭 염기쌍을 형성하도록 서로 이중 가닥 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 또한, 이 용어는 사용될 수 있는 데옥시이노신, 2-아미노퓨린 염기를 가진 뉴클레오시드 등과 같은 뉴클레오시드 유사체의 페어링을 함축한다. 트리플렉스에 대한 언급에서, 이 용어는 트리플렉스가 완벽히 매치된 듀플렉스와 제 3 가닥으로 구성된다는 의미이며, 여기서 모든 뉴클레오티드는 완벽히 매치된 듀플렉스의 염기쌍과 후그스틴 또는 역 후그스틴 회합을 이룬다. 반대로, 택과 올리고뉴클레오티드 간의 듀플렉스에서 "미스매치"는 듀플렉스 또는 트리플렉스에서 뉴클레오티드의 쌍 또는 3개 쌍이 왓슨-크릭 및/또는 후그스틴 및/또는 역 후그스틴 결합을 이루는데 실패한 것을 의미한다.
- [0015] 본원에서 사용되었을 때, "뉴클레오시드"는 T-데옥시 및 2'-히드록실 형태를 포함한 천연 뉴클레오시드를 포함하며, 이들은 예를 들어 Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed.(Freeman, San Francisco, 1992)에 설명된다. 뉴클레오시드에 대한 언급에서 "유사체"는, 예를 들어 Scheit, Nucleotide Analogs(John Wiley, New York, 1980); Uhlman and Peyman, Chemical Reviews 90:543-584 (1990) 등에 설명된 변형된 염기 부분 및/또는 변형된 당 부분을 갖는 합성 뉴클레오시드를 포함하며, 유일한 조건은 이들이 특이적 혼성화를 할 수 있어야 한다는 것이다. 이러한 유사체는 결합 특성의 증진, 복잡성의 감소, 특이성의 증가 등의 목적을 위하여 설계된 합성 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0016] 용어 "뉴클레오티드 서열"과 "핵산 서열"은 본원에서 호환하여 사용되며, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 설명한다. 마찬가지로, 용어 "서열 결정", "뉴클레오티드 서열을 결정하는" 및 "핵산 서열을 결정하는"은 호환하여 사용되며, 폴리뉴클레오티드를 구성하는 핵산 또는 뉴클레오티드의 서열을 결정하는 것을 설명하고, 여기에는 폴리뉴클레오티드의 부분 서열뿐만 아니라 전체 서열의 결정이 포함된다. 즉, 이 용어는 서열 비교, 핑거프린팅, 및 표적 폴리뉴클레오티드에 대한 정보와 유사한 수준의 정보, 그리고 뉴클레오시드, 일반적으로 표적 폴리뉴클레오티드에 있는 각 뉴클레오시드의 명확한 식별과 순서결정을 포함한다. 또한, 이 용어는 표적 뉴클레오티드에 존재하는 4개 타입의 뉴클레오티드 중 1개, 2개 또는 3개의 식별, 순서결정, 및 위치의 결정을 포함한다.
- [0017] 본원에서 사용되었을 때, "에피토프"는 면역 시스템, 특히 항체, B 세포, 또는 T 세포에 의해서 인식되는 거대 분자의 일부분이다. 에피토프는 일반적으로 비-자기 단백질로부터 유래하여야 한다고 생각되지만, 인식될 수 있는 숙주 유래의 서열도 에피토프로서 분류된다. 항체나 B 세포에 의해서 인식되는 대부분의 에피토프는 항원 분자의 3차원 표면 특징구조라고 생각될 수 있으며, 이들 특징구조는 항체와 정확하게 합치하여 결합한다.
- [0018] 본원에서 사용되었을 때, "혼성화"는 세포 RNA 또는 단일 가닥 DNA가 실질적인 서열 상동성을 가진 올리고뉴클레오티드와 상호작용하는 과정을 말하며, 이로써 상기 서열 상보성 영역에서 듀플렉스가 형성된다.
- [0019] 본원에서 사용되었을 때, "마이크로웰"은 1 피코리터에서 500 나노리터 사이의 부피를 가진 서브 밀리미터 구조를 말한다. 마이크로웰은 전형적으로 평면 기판 위에 조밀하게 채워질 수 있는 모양으로 구성되는데, 즉 삼각형, 사각형, 또는 육각형의 모양이다. 마이크로웰은 일반적으로 상부에 있는 한 표면을 제거함으로써 개방되거나, 또는 상기 상부를 다른 표면과 접촉되게 함으로써 폐쇄될 수 있다. 마이크로웰은 균질한 재료로 구성되거나 또는 상이한 재료로 구성될 수 있는데, 이런 재료로는, 제한은 아니지만, 유리, 포토레지스트 또는 폴리디메틸실록산(PDMS)을 포함한다.
- [0020] 본원에서 사용되었을 때, "파라토프"는 항원의 에피토프를 인식하는 항체의 부분을 말한다.
- [0021] 본원에서 사용되었을 때, "phOX"는 화학식 $C_{14}H_{12}N_2O_4$ 로 표시되는 4-[(Z)-(5-옥소-2-페닐-1,3-옥사졸-4(5H)-일리덴)메틸]아미노}부타노산을 말한다.
- [0022] 본원에서 사용되었을 때, "로타머"는 저에너지 측쇄 입체형태를 말한다. 로타머의 빌드-라이브러리를 사용하여 구조를 결정하거나 모델링하여 가장 가능성 있는 측쇄 입체형태에 접근할 수 있으며, 이로써 시간이 절약되고 더욱 정확한 구조를 얻을 수 있다. 이것은 물론 로타머가 실제로 정확한 저에너지 입체형태일 경우에만 국한된다. 라이브러리는 많은 방법으로 이런 퀄리티의 문제를 다루는데, 이들은 초고 해상도 구조(1.8Å 이상)만을 사용하고, 다수의 필터에 의해 위치가 의심되는 측쇄를 제거하고, 관찰된 입체형태들의 평균 이외의 다른 방식을 사용하고(이것은 많은 이점을 가진다), 그리고 불합치 입체형태를 조직적으로 제거하기 위한 노력을 기울인다.
- [0023] 본원에서 사용되었을 때, "돌연변이"는 생물체의 유전자 물질의 뉴클레오티드 서열에 대한 변화이다. 돌연변이는 세포분열 동안 유전자 물질에 나타나는 오차를 카피함으로써, 자외선 또는 이온화 선에의 노출에 의해, 화학

적 돌연변이유발인자에 의해, 또는 바이러스에 의해 야기될 수 있거나, 또는 과돌연변이 등의 과정 동안 세포 제어하에 의도적으로 발생할 수 있다. 다세포 생물에서 돌연변이는 자손들에게 전해질 수 있는 점라인 돌연변이와 "체세포 돌연변이"로 세분될 수 있으며, 본원에서 사용되었을 때 "체세포 돌연변이"는 동물에서 자손에게 전달될 수 없다. B 세포는 친화성 성숙 과정 동안 체세포 돌연변이를 겪는다.

[0024] 생물학적 기능의 수행을 가능하게 하려면 단백질은 하나 이상의 특정한 공간적 입체형태로 폴딩되어야 하며, 이것은 수소 결합, 이온 상호작용, 반데르발스 힘 및 소수성 패키징과 같은 많은 수의 비공유 상호작용에 의해 유발된다. 본원에서 사용되었을 때, "구조"는 단백질 구조의 4가지 구별되는 양태를 말하는데, a) 1차 구조는 펩티드 사슬의 아미노산 서열이고, b) 2차 구조는 국소적으로 한정된 상당히 규칙적인 하위-구조들(알파 나선 및 베타 시트의 가닥)로서, 이것은 한 단일 단백질 분자에 많은 상이한 2차 모티프들이 존재할 수 있음을 의미하며, c) 3차 구조는 단일 단백질 분자의 3차원 구조로서, 2차 구조의 공간적 배열이며, d) 4차 구조는 몇 개의 단백질 분자나 폴리펩티드 사슬의 복합체로서, 이 맥락에서는 일반적으로 단백질 서브유닛이라고 불리며, 더 큰 조립체 또는 단백질 복합체의 일부로서 기능한다.

[0025] 본원에서 사용되었을 때, 단백질은 선형 사슬로 배열되어 인접 아미노산 잔기의 카르복실기와 아미노기의 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산들로 이루어진 유기 화합물이다. 단백질은 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩티드 사슬 또는 아미노산으로 이루어진 다수의 폴리펩티드 사슬, 예를 들어 이황화 결합에 의해 함께 결합된 다수의 폴리펩티드, 예를 들어 항체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되었을 때, "단백질 복합체"는 단백질-단백질 상호작용에 의해서 형성된 둘 이상의 회합된 일군의 단백질이다. 단백질 복합체는 4차 구조의 형태이다. 시간 경과에 따라 안정한 단백질 복합체를 본원에서 "시스 단백질 복합체"라고 한다. 일시적인 단백질 복합체는 본원에서 "트랜스 단백질 복합체"라고 한다. 본 발명은 시스 및 트랜스 단백질 복합체 모두에 관한 것이다.

[0026] 본원에서 사용되었을 때, "동역학적 특성(kinetic properties)"은 반응 속도 k_{off} , k_{on} , 및 시스 및/또는 트랜스 단백질 복합체 사이의 반응 속도의 비 K_D 를 말한다. 2성분 단백질 복합체의 경우, 해리 상수 K_D 는 살아 있는 시스템에 매우 근접한 상태인 등온, 등압 과정에서 획득할 수 있는 일을 설명하는 깁스 자유 에너지와 단순 관련된다.

[0027] 본원에서 사용되었을 때, "표적 결합 단백질" 또는 "표적 단백질"은 관심 있는 생물학적 활성제가 결합하는 단백질이다. 표적 결합 단백질은 관심의 생물학적 활성제와 전형적으로 결합하는 단백질일 수 있으며, 예를 들어 사이토카인(이 경우 관심의 생물학적 활성제는 수용체이다), 또는 항원(이 경우 관심의 생물학적 활성제는 항체이다)이 있다. 또는 달리, 표적 결합 단백질은 관심의 생물학적 활성제와 전형적으로 결합하지 않는 단백질일 수 있는데, 예를 들어 대조군 사이토카인이 있다.

[0028] 본원에서 사용되었을 때, "결합제" 또는 "포착제"는 생물학적 활성제를 고정시키는데 사용된 분자이다. 포착제는 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, 단백질, 소분자, 펩티드, 앵타머 등일 수 있으며, 이들은 각자의 천연 또는 인공 리간드에 대한 친화성을 가진다.

[0029] 본원에서 사용되었을 때, 고상 표면 또는 고상 표면은 어떤 종류의 표면이나 지지체이다. 그것은 유리, 플라스틱, 니트로셀룰로오스, 불화 폴리비닐리덴, 또는 그외 다른 매우 비-반응성인 재료로 제조될 수 있다. 결합제/포착제가 부착될 수 있으며, 이 경우 결합제/포착제는 고상 표면을 코팅할 수 있거나, 또는 고상 표면 위의 상이한 위치들에 함유될 수 있는데, 예를 들어 스폿 형태로 부착되거나, 또는 패드 형태로 국소화되거나, 또는 선형으로 형성될 수 있다.

[0030] 용어 "모노클론 항체"는 상이한 항체들의 혼합물로부터 선택된 항체를 말한다. 동일한 특이성을 가진 모든 모노클론 항체는 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 본원에서 사용되었을 때, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 그것의 단편(Fab, F(ab'), Fv, scFv)과도 상호작용한다는 의미로 이해된다.

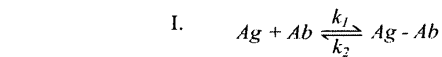
[0031] 본원에서 사용되었을 때, "리간드"는 생물학적 목적을 제공하기 위해 생체분자와 결합하여 복합체를 형성할 수 있는 물질이다.

[0032] 용어 "B 세포"는 본원에서 골수에서 발생하고 고도로 분화되어 면역글로불린과 항체를 만드는 면역세포를 의미하는데 사용된다. B 세포는 골수 유래의 림프구이며, 체액성 면역을 제공한다. B 세포는 용액 중의 항원 분자를 인식하고, 원형질 세포로 성숙된다. 따라서, 용어 "B 세포"가 본원에서 사용될 때, 그것은 원형질 세포와 같은 B 세포 유래의 세포를 포함하도록 의도된다.

[0033] 용어 "원형질 세포(plasma cell)"는 특정 항원에 대한 반응에서 B 림프구로부터 발생한 세포를 의미하도록 의도된다. 원형질 세포는 골수와 혈액에서 발견된다. 또한, 원형질 세포는 원형질 B 세포나 형질세포라고도 부를 수 있으며, 다량의 항체를 분비하는 면역 시스템 내의 세포이다. 원형질 세포는 CD4+ 림프구에 의한 자극시 B 세포로부터 분화된다. 원형질 세포는 일종의 백혈구로서, 항체를 생산하고, 항원-특이적 B 세포로부터 유래된다. 본 명세서 전체에서 용어 "B 세포"는 "원형질 세포"를 포함하도록, 그리고 "원형질 세포"는 "B 세포"를 포함하도록 의도된다. 일반적으로 둘 모두 관심 있는 항체를 생산하는 세포를 말하는 용어들을 포함하도록 의도된다.

[0034] 생물학적 활성제는 주어진 표적 생물학적 활성제, 예를 들어 단백질에 대한 "결합 친화성"을 특징으로 한다. 예를 들어, 항체는 결합 부위나 에피토프에 대한 친화성을 특징으로 한다. 모든 항체는 아미노산들의 특정한 3차원 구조로 이루어지며, 이것은 에피토프 또는 항원이라고 하는 또 다른 구조와 결합한다.

[0035] 항체와 그것의 항원의 결합은 간단한 2분자 가역 반응이다. 항체를 Ab로 항원을 Ag로 표시한다면 이 반응은 표준 동력학 이론에 의해 분석될 수 있다. 단일 결합 부위를 가정하면, 이 반응은 다음과 같이 식 I로 표시된다:



[0036]

[0037] 여기서 Ag-Ab는 결합된 복합체이다. 정방향 및 역방향 결합 반응은 각각 속도 상수 k1 및 k2로 표시된다. 항원에 대한 항체의 "결합 친화성"은 평형 상태에서 복합체화된 반응물과 자유 반응물의 비에 의해 측정된다. 평형 상태에서 반응물들의 농도가 낮을수록 항원에 대한 항체의 결합 친화성은 높아진다. 면역학 분야에서, 결합 친화성은 "친화성 상수"로 표시되며, 이것은 기호 "K"로 표시되거나, 또는 때로는 "Ka"라고도 한다. "K"는 다음과 같이 식 II로서 정의된다:

II.
$$K = \frac{[Ag - Ab]}{[Ag][Ab]} = \frac{k_1}{k_2}$$

[0038]

[0039] 여기서 괄호는 몰/리터 또는 리터/몰의 농도를 나타낸다.

[0040] "K"라고도 하는 "친화성 상수"인 결합 친화성 Ka의 전형적인 값은 전형적인 항체에 대해서 약 10⁵ 내지 약 10¹¹ 리터/몰의 범위이다. Ka는 용액에 존재하는 항체의 결합 부위의 반을 항원으로 채우는데 필요한 자유 항원의 농도이다. 리터/몰로 측정된 경우, 더 높은 Ka(예를 들어, 10¹¹)나 더 높은 친화성 상수는 더 큰 용매 부피, 더 많이 희석된 자유 항원 농도를 나타내며, 즉 항체가 에피토프에 대해 높은 결합 친화성을 가진다는 것을 시사한다.

[0041] Ka가 몰/리터로 측정된 경우, 낮은 Ka(예를 들어, 10⁻¹¹)는 항체 결합 부위를 반을 채우는데 낮은 농도의 자유 항원 용액이 필요하다는 것을 나타내며, 즉 높은 결합 친화성을 시사한다.

[0042] 평형 상태가 달성되면 Ka를 측정할 수 있다. 더 구체적으로, 항원에 결합된 항체[Ag-Ab]의 농도가 항체[Ab]의 농도와 동일할 때 Ka가 측정된다. 따라서, [Ab]로 나눈 [Ag-Ab]의 값이 1이다. 이것을 알면 상기 식 II을 풀어서 다음과 같이 식 III을 만들 수 있다:

III.
$$K = \frac{1}{[Ag]}$$

[0043]

[0044] 식 III에서 K의 단위는 리터/몰이다. 리터/몰 단위의 전형적인 값은 약 10⁵ 내지 약 10¹¹ 리터/몰의 범위이다.

[0045] 상기 식의 역함수는 K = [Ag]이고, 여기서 K의 단위는 몰/리터이며, 전형적인 값은 10⁻¹¹ 내지 10⁻⁵ 몰/리터의 범위이다.

[0046] 상기 서술은 전형적인 결합 친화성이 6 차수 크기에 걸쳐 변할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 어떤 유용한 항체는 역시 유용하다고 생각되는 다른 항체의 결합 친화성과 비교하여 100,000배 더 큰 결합 친화성을 가질 수 있다.

[0047] 상기 서술에 기초하여 항원에 대한 항체의 결합 특성은 면역학 분야에 잘 정의된 용어 및 방법을 이용하여 정의

될 수 있음이 이해될 것이다. 항체의 결합 친화성 또는 "K"는 정확히 결정될 수 있다.

- [0048] 이 분야의 통상의 기술자는 고도의 결합 친화성이 반드시 높은 효과의 약물을 말하지는 않는다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 약물 후보를 얻을 때, 넓은 범위의 결합 친화성을 나타내는 후보들을 시험하여, 이들이 원하는 생화학적/생리학적 반응을 획득하는지를 결정한다. 결합 친화성이 중요하기는 하지만, 높은 결합 친화성을 가진 어떤 약물 후보들은 효과적인 약물이 아니며, 낮은 결합 친화성을 가진 어떤 약물 후보들이 효과적인 약물이다.
- [0049] 용어 "메타데이터"는 "다른 데이터에 대한 데이터"를 설명하기 위해 사용된다. 메타데이터의 항목은 개별 데이터, 또는 내용 항목, 또는 복수의 내용 항목과 계층 레벨을 포함하는 데이터 집합, 예를 들어 데이터베이스 도표를 설명할 수 있다. 본원에서 사용되었을 때, 메타데이터는 본 발명을 이용하는 과정에서 취득된 다른 데이터에 대한 정보를 제공하거나, 또는 그것을 문서화하기 위한 한정적인 데이터이다. 예를 들어, 메타데이터는 데이터 요소나 속성에 대한 데이터(명칭, 크기, 데이터 타입 등)에 대한 데이터 및 기록이나 데이터 구조에 대한 데이터(길이, 필드, 칼럼 등) 및 데이터에 대한 데이터(위치된 장소, 관련된 방법, 소유자 등)를 문서화한다. 메타데이터는 내용, 품질 및 조건에 대한 설명적 정보, 또는 데이터의 특징을 포함할 수 있다. 예를 들어, 메타데이터는 세포 집단에서 특정 항체가 나타나는 빈도에 대한 데이터일 수 있으며, 이것은 집단에 속한 복수의 개별 세포에 의해 발현되는 항체의 서열에 대한 데이터를 취득함으로써 결정된다.
- [0050] 본 발명에서, 단백질, 핵산, 또는 단백질과 그것을 암호화하는 핵산 등 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성체의 생산을 위해 단일 세포를 스크리닝하기 위한 방법, 장치 및 키트가 제공된다.
- [0051] 본 발명을 더 설명하기 전에, 본 발명이 설명된 특정 방법과 장치에 한정되지 않으며, 당연히 변할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 제한하려는 의도가 아니라 단지 특정 구체예를 설명하기 위한 목적을 가지며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항들에 의해서만 제한된다는 것이 이해되어야 한다.
- [0052] 수치 범위가 제공된 경우, 달리 문맥상 명시되지 않는다면, 그 범위의 상한과 하한 사이에서 하한 단위의 1/10 까지 각 중간값도 또한 구체적으로 개시된다는 것이 이해된다. 제시된 범위 내의 어떤 제시된 값이나 중간값과 그 제시된 범위의 어떤 다른 제시된 값이나 중간값 사이에 있는 각각의 더 작은 범위도 본 발명에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한과 하한은 그 범위 내에 독립적으로 포함되거나 배제될 수 있으며, 더 작은 범위 내에 두 한계 중 어느 하나가 포함되거나, 둘 모두 포함되거나, 또는 둘 모두 포함되지 않는 경우의 각 범위 역시 제시된 범위 내의 어떤 구체적으로 배제된 한계에 종속되어 본 발명에 포함된다. 제시된 범위가 두 한계 중 하나 또는 둘 다 포함하는 경우, 이들 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제한 범위도 본 발명에 포함된다.
- [0053] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어들은 본 발명이 속한 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 설명된 것들과 유사하거나 동등한 어떤 방법 및 재료라도 본 발명의 실시나 시험에서 사용될 수 있으며, 일부 가능하며 바람직한 방법과 재료들을 이제 설명된다. 본원에서 언급된 모든 간행물은 그 간행물의 인용과 관련된 방법 및/또는 재료를 개시하고 설명하기 위한 참고로서 본원에 포함된다. 본 출원은 2009년 4월 3일자로 동시에 제출된 다른 두 출원과 관련되고, 이 두 출원은 대리인 문서번호 SCTI-0001과 SCTI-0002를 가지며, 그 전문이 본원에 참고로서 포함된다. 본 명세서의 내용은 모순되는 범위에 있어서 참고로 포함된 간행물의 어떤 내용을 대신한다는 것이 이해된다.
- [0054] 본원과 첨부된 청구항들에서 사용되었을 때, 단수형 "한", "어떤" 및 "그"는 문맥상 달리 명시되지 않는다면 복수의 언급을 포함한다는 것이 주지되어야 한다. 따라서, 예를 들어 "어떤 세포 또는 서열"의 언급은 복수의 이러한 세포들 또는 서열들을 포함할 수 있고, "그 웰 또는 어드레스"의 언급은 하나 이상의 웰 또는 어드레스들과 이 분야의 통상의 기술자에게 공지된 그것의 등가물들을 포함할 수 있다.
- [0055] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 제출일 전의 내용만이 제공된다. 어떤 것도 선행 발명에 의하여 본 발명이 이러한 간행물보다 선행할 자격이 없다는 것을 용인하는 것으로서 이해되어서는 안 된다. 또한, 제공된 간행물의 간행일은 실제 간행일과 다를 수 있으며, 이것은 개별적으로 확인될 필요가 있을 수 있다.
- [0056] 상기 요약된 대로, 관심 있는 생물학적 활성체의 생산을 위해 단일 세포를 스크리닝하고, 선택적으로 이러한 생물학적 활성체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 획득하기 위한 방법, 장치, 및 키트가 제공된다. 본 발명을 더 설명하면서, 방법이 먼저 설명되고, 이어서 상기 방법을 실시하는데 사용하기 위한 장치 및 키트가 검토된다.

[0057] **항체 구체에**

[0058] 본 발명의 방법의 한 구체에는 복수의 분리된 세포들로부터 정보를 획득하는 방법을 포함한다. 이 정보는 다수의 세포를 개별 웰에 배치함으로써 다수의 세포로부터 동시에 획득될 수 있다. 단일 웰에 단일 세포가 포함되도록 시도한다. 그러나, 수백, 수천 또는 심지어 수만 개의 세포와 웰을 수반하는 방법을 수행할 경우, 일부 웰은 세포를 포함하지 않을 수 있고, 다른 웰은 하나를 넘는 세포를 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 방법은 동물을 면역화하고 그 동물로부터 항체를 생산하는 세포를 추출하는 것에서 시작할 수 있다. 그러나, 그 과정은 이미 추출된 세포를 웰 트레이의 웰에 배치하는 것에서 시작할 수 있다. 이 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 방법이 여러 상이한 방식으로 수행될 수 있다는 것을 인정할 것이다. 한 구체예에서, 마이크로웰로 이루어진 웰 트레이가 사용된다. 마이크로웰은 세포가 항체를 생산하는 제한된 시간 기간 동안 단일 세포와 그 세포를 부양하기 위한 액체 영양물을 수용할 만한 충분한 부피를 가진다. 이 분야의 통상의 기술자는 각 마이크로웰에 단일 세포를 배치하는 것이 바람직하다는 것을 인정할 것이다. 그러나, 과정이 실제로 수행될 경우, 일부 웰은 세포를 함유하지 않을 것이고, 일부 웰은 둘 이상의 세포를 함유할 수 있다. 이것은 본 발명의 효능을 제한할 수 있지만, 본 발명은 아주 적은 퍼센트의 마이크로웰만이 단일 세포를 함유하는 경우에도, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 50% 이상의 **세포**만이 단일 세포를 함유하고, 나머지 웰은 세포를 함유하지 않거나 복수의 세포, 즉 2 이상의 세포를 함유하는 경우에도 수행될 수 있다. 매우 높은 퍼센트, 즉 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상의 웰이 단일 세포 및 오직 단일 세포만을 함유한다면 바람직하다. 이것은 모든 웰의 활용을 가능하게 하며, 구체적으로 웰에서 생산된 항체를 단일 세포와 관련시키는 것이 가능해진다. 또한, 이 분야의 통상의 기술자는 모든 세포가 항체를 생산하는 것이 바람직하지만, 일부 세포는 항체를 생산하지 않거나, 또는 검출되기에 충분하지 않은 양의 항체를 생산할 수 있다는 것을 인정할 것이다. 본 발명은 비교적 소수의 세포가 실제로 항체를 생산하는 경우에도 수행될 수 있다. 높은 퍼센트의 항체 생산 세포, 예를 들어 웰에 배치된 세포의 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 항체(또는 다른 생물학적 활성 분자)를 생산하는 것이 바람직하지만, 예를 들어 웰에서 단지 1%, 5%, 10% 또는 50%의 세포만이 실제로 검출가능한 양으로 항체(또는 다른 생물학적 활성 분자)를 생산할 수 있다. 항체를 생산하는 단일 세포를 함유하는 웰이 많을수록 본 발명의 방법의 효능은 높아진다.

[0060] 표면의 각 영역 또는 부위는 항체 결합체와 같은 결합체, 예를 들어 해당 영역에서 표면과 결합된 단백질 A를 갖는 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명은 비교적 적은 퍼센트의 부위가 표면에 결합된 단백질 결합체를 갖는 경우에도 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 표면의 부위 중 단지 1%, 5%, 10%, 50% 이상에만 결합체가 결합되어도 작동할 수 있다. 높은 퍼센트, 즉 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 바람직하게는 100%의 부위가 웰 또는 마이크로웰에 상응하는 영역에 결합된 결합체를 갖는 것이 바람직하다. 유사한 방식으로, 마이크로웰은 그 표면에, 관심의 항체나 다른 단백질의 일부분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열과 특이적으로 결합하는 서열 같은, 폴리뉴클레오티드 서열이 결합되어 있을 수 있다. 모든 마이크로웰의 표면에 폴리뉴클레오티드가 결합된 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명은 아주 소수의 웰, 예를 들어 1%, 5%, 10% 이상의 마이크로웰의 표면에 폴리뉴클레오티드가 결합된 경우에도 작동할 수 있다. 본 발명의 이 구체예를 이용할 경우, 높은 퍼센트의 마이크로웰, 예를 들어 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 더 바람직하게는 100%의 마이크로웰이 표면에 결합된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0061] 세포는 항체를 생산하는 B 세포 또는 원형질 세포와 같은 세포이고, 웰에서 생산되는 항체는 표면에 결합된 단백질 A와 같은 결합체와 접촉되며, 이 표면은 멤브레인일 수 있다. 표면은 복수의 어드레스 지정 영역을 가질 수 있거나, 또는 개별 웰과 특이적으로 관련될 수 있는 영역을 포함할 것이다. 웰은 웰 트레이에 존재할 수 있으며, 웰 트레이의 웰 밀도는 cm^2 당 100개 이상의 웰 또는 cm^2 당 1,000개 이상이고, 웰은 검출가능한 마커를 포함할 수 있으며, 이 검출가능한 마커에 의해 특정 웰의 상대적인 위치를 결정할 수 있고, 마커는 마커 세포, 또는 염료, 뉴클레오티드 서열, 방사선 활성 표지 또는 퀀텀 도트를 포함할 수 있는 일군의 마커일 수 있다.

[0062] 웰 안의 항체가 결합체와 접촉된 후에, 표면에 결합된 항체와 항원의 결합에 관한 결합 정보를 결정하기 위한 과정이 수행되며, 항원은 바람직하게는 특정한 기지 항원이고, 이로써 해당 항원에 대한 항체의 결합 친화성 같은 정보를 결정할 수 있다. 다음에, 표면의 특정 부위에 관한 결합 정보가 항체가 획득되었던 특정 웰과 연계된다. 따라서, 다수의 상이한 항체와 관련된 다수의 상이한 웰로부터 정보를 동시에 획득하고, 항체와 항체가 획득된 웰을 연계시키는 것이 가능하다.

[0063] 관심의 표면 부위 상의 특정 항체들을 결정하고, 이들과 관심의 웰을 연계시킨 후에, 특정 웰로부터 특정한 폴

리뉴클레오티드 정보를 획득하는 것이 가능하며, 이 정보는 일반적으로 관심의 특정 웰로부터 획득된 메신저 RNA에 관한 서열 정보이다. 메신저 RNA는 웰 안의 메신저 RNA를 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 서열과 같은 항체를 암호화하는 서열에 선택적으로 결합하는 서열과 결합시킴으로써 획득될 수 있다.

[0064] 획득된 메신저 RNA는 cDNA로 전환될 수 있다. cDNA는 관심의 특정 웰에 특이적인 택을 함유할 수 있다. 택을 사용하여 관심의 특정 항체에 관한 결합 정보를 관심의 특정 웰로부터의 메신저 RNA와 연계시킬 수 있다. 본 발명을 도면을 참고하여 아래 더 상세히 설명한다.

[0065] **일반화된 구체예**

[0066] 본 방법을 실시하는데 있어서, 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제를 생산하는 세포가 개별 웰에 분리된다. 일부 구체예에서, 세포는 모든 웰에서 실질적으로 동일하며, 예를 들어 배양된 셀라인으로부터의 세포, 일차 세포 제제로부터의 세포 또는 가공된 세포이다. 다른 구체예에서, 세포는 각 웰에서 상이한데, 즉 이들은 상이한 기원을 가지거나, 또는 서로 간에 특유한 유전자 차이가 있을 수 있으며, 예를 들어 원형질 세포, 또는 같은 인간 피험자로부터의 상이한 종류의 세포, 또는 상이한 인간 피험자로부터의 동일한 종류의 세포이다. 일부 구체예에서, 웰 당 오직 1개의 세포만이 배치된다. 다른 구체예에서, 웰 당 복수의 세포가 배치된다. 전형적으로, 2 이상의 세포를 함유하는 마이크로웰의 수를 단일 세포를 함유하는 마이크로웰의 수로 나눈 비는 20% 미만이다.

[0067] 웰에서 하나 이상의 생물학적 활성제를 생산하도록 세포가 방치되고, 이어서 웰 안의 하나 이상의 생물학적 활성제가 고상 표면에 부착된 하나 이상의 결합체와 접촉된다. 일부 구체예에서, 고상 표면에 부착되는 결합체는 모든 웰에서 동일하다. 일부 구체예에서, 고상 표면에 부착되는 결합체는 다른 웰마다 상이하다. 결합체의 예로는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L, 단백질 A/G, 항-IgG Fc γ 하위부류-특이적 항체, 및 상기 세포에 의해 생산된 상기 적어도 하나의 생물학적 활성제에 대한 표적 단백질을 포함한다. 이들 결합체가 부착되는 고상 표면은 유리, 플라스틱, 니트로셀룰로오스, 불화 폴리비닐리덴, 또는 그외 다른 매우 비-반응성인 재료로 제조될 수 있으며, 어드레스 지정 영역들로 이루어지고, 각 어드레스는 관심 있는 생물학적 활성제를 생산하는 세포를 함유하는 개별 웰 중 하나와 특이적으로 관련된다.

[0068] 고상 표면의 결합체(들)는 웰의 세포에 의해 생산된 관심의 하나 이상의 생물학적 활성제(들)와 특이적으로 결합하고, 이로써 관심의 생물학적 활성제(들)를 "포착"한다. 다음에, 관심의 하나 이상의 생물학적 활성제와 결합체의 결합에 기초하여 세포에 관한 정보가 결정될 수 있다. 예를 들어, 고상 표면의 결합체와의 결합의 존재 또는 부재에 의해서 웰 안에 생물학적 활성제가 존재하는지 또는 부재하는지가 결정될 수 있으며, 이때 해당 생물학적 활성제의 존재/부재는 웰의 세포에서 신호화 경로가 활성화/비활성화되었는지의 여부를 시사한다. 또는 달리, 관심 있는 포착된 하나 이상의 생물학적 활성제와 후속하여 제공되는 표적 결합 단백질의 결합에 기초하여 세포에 관한 정보가 결정될 수 있다. 예를 들어, 표적 단백질에 대한 포착된 생물학적 활성제의 결합 친화성이 고상 표면에 포착된 상태의 생물학적 활성제를 사용한 친화성 연구에 의해서 결정될 수 있으며, 이때 표적 단백질에 대한 포착된 생물학적 활성제의 특징한 친화성은 그 생물학적 활성제를 생산한 세포가 관심 있는 세포임을 시사한다. 다음에, 이 정보가 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과 연계되고, 이로써 관심의 특정 웰이 확인될 수 있다.

[0069] 관심의 세포를 포함하는 웰과 정합되도록 고상 표면의 영역에 어드레스를 부여하고, 결합체와의 결합을 알고 있어서 실험 샘플과 비교될 수 있는 생물학적 활성제를 제공하기 위해, 조사중인 세포 집단에 기지의 마크가 표시된 생물학적 활성 복합체와 함께 마커 세포를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 마커 세포는 항체, 예를 들어 하이브리도마를 선택적으로 발현할 수 있는 세포이다. 이러한 계통들은 기탁되어 있으며, 문헌에 설명되어 있어 쉽게 획득된다. 이들 세포는 상이한 형광단을 가진 항원으로 염색되어서 마이크로웰에서 확인될 수 있거나, 또는 추적될 수 있는 형광 택을 발현하도록 유전자 조작된다. 마찬가지로, 항체도 고상 표면에 포착되고, 상이한 염료를 가진 적합한 항원으로 염색되어 고상 표면에서 항체의 위치를 확인할 수 있다. 이와 같이, 마이크로어레이 슬라이드 상의 마커 위치가 고상 표면의 영역들에 어드레스를 부여하기 위한 랜드마크로서 사용될 수 있다. 다음에, 고상 표면에 포착된 다른 세포들의 생물학적 활성제가 마커 세포와 그들이 생산한 항체에 대한 이들의 상대적인 위치에 기초하여 매핑될 수 있다.

[0070] 일부 구체예에서, 생물학적 활성제가 웰의 세포에 제공되는데, 예를 들어 소분자 화합물, siRNA, 단백질, 또는 올리고뉴클레오티드가 있다. 일부 구체예에서, 이런 제공된 생물학적 활성제는 모든 웰에서 동일하다.

따라서, 제공된 하나의 활성제가 복수의 세포 타입 또는 복수의 신호화 경로에 대한 영향에 대해 분석될 수 있다. 다른 구체예에서, 이런 제공된 생물학적 활성제는 각 웰마다 상이하다. 따라서, 제공된 복수의 생물학적 활성제가 단일 세포 타입 또는 단일 신호화 경로에 대한 영향에 대해 분석될 수 있다.

[0071] 본 발명의 어떤 양태에서, 본 방법은 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제, 예를 들어 한 폴리펩티드, 또는 관심 있는 생물학적 활성제가 폴리펩티드의 복합체일 경우 다수의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 획득하는 단계, 및 관심의 생물학적 활성제의 결합 특성에 대한 정보와 관심의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 상관시키는 단계를 더 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 세포로부터 mRNA를 획득하고, mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 서열화(sequencing)함으로써 획득될 수 있다.

[0072] 일부 구체예에서, 선택된 웰에서 관심의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 획득된다. 다른 구체예에서, 모든 웰에서 모든 세포에 의해 생산된 관심의 생물학적 활성제의 뉴클레오티드 서열이 동시에 결정된다. 이들 구체예에서, 웰-특이적 택, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 택이 웰에 제공되며, 적어도 하나의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 획득하는 단계는 합성된 그대로의 cDNA에 웰-특이적 택을 결합시키는 단계, cDNA들을 모두 모으는 단계, 및 초고 처리량 DNA 서열화 기술에 의해서 모아진 cDNA들을 서열화하는 단계를 포함하며, 이로써 각 기원 세포에 존재하는 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 웰에 세포를 배치하기 전에 웰에 제공될 수 있다. 또는 달리, 올리고뉴클레오티드는 웰에 세포를 배치하는 것과 동시에 또는 배치한 후에 웰에 제공될 수 있다. 전형적으로, 올리고뉴클레오티드는 웰에 세포를 배치하기 전에 마이크로웰의 내부 표면에 부착된다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 10개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 15개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 20개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 25개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 30개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 40개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 50개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 60개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 70개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 80개 뉴클레오티드 길이, 적어도 약 90개 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 전형적으로 생물학적 활성제를 코딩하는 mRNA에 상보하는 100개 미만의 뉴클레오티드를 가진다. 올리고뉴클레오티드는 동일한 마이크로웰 안의 모든 동일한 올리고뉴클레오티드에 공통적인 하나 이상의 특유한 택을 함유할 수 있다.

[0073] 서열화 과정 동안, 마이크로웰 식별 택은 DNA 서열 형태의 디지털 택으로 전환되고, 이후 이것을 사용하여 뉴클레오티드 서열과 특정 웰을 연계시키고(단백질의 복합체, 예를 들어 항체의 중쇄와 경쇄처럼 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성제가 웰로부터 서열화되는 경우에는 서로를 연계시킨다), 이로써 멤브레인의 특정 어드레스를 가진 영역과도 연계시킬 수 있다. 따라서, 관심 있는 생물학적 활성제의 결합 특성에 대한 정보가 관심의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상관될 수 있다.

[0074] 상기 서술한 대로, 관심의 세포를 포함하는 웰과 정합되도록 고상 표면의 영역들에 어드레스를 부여하고, 결합제와의 결합이 알려져 있어서 실험 샘플과 비교될 수 있는 생물학적 활성제를 제공하기 위해, 조사중인 세포 집단에 기지의 마크가 표시된 생물학적 활성제와 함께 마커 세포를 포함시키는 것이 바람직할 수 있으며, 예를 들어 중쇄와 경쇄의 서열 정보가 모두 기지의 항체를 선택적으로 발현할 수 있는 하이브리도마 셀라인이 있다. 이들 세포는 상이한 형광단으로 표시된 항원으로 염색되거나, 또는 형광 마커를 발현하도록 유전자 조작될 수 있으며, 이로써 마이크로웰에서 확인될 수 있다. 마찬가지로, 어레이 상에 포착된 항체도 역시 상이한 염료를 가진 적합한 항체로 염색되어 고상 표면에서의 위치가 확인될 수 있다. 마지막으로, 마커 세포의 mRNA가 가공되어 서열화됨으로써, 디지털 택이 더해진 DNA 서열에 의해 포착 마이크로어레이 슬라이드 상의 마커 세포의 위치가 명확하게 확인될 것이다. 이와 같이, 마이크로어레이 슬라이드 상의 마커 세포의 위치가 고상 표면의 것들과 매칭될 수 있다. 어레이에 존재하는 다른 세포들의 mRNA와 단백질은 마커 세포, 이들의 mRNA 및 항체에 대한 이들의 상대적인 위치에 기초하여 매칭될 수 있다. 또한, 이들 마커 세포를 사용하여 기준이 되는 결합 친화성을 제공할 수 있고, 이에 의해서 복수의 생물학적 활성제의 결합 친화성이 비교될 수 있다.

[0075] 본 발명의 어떤 양태에서, 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열만이 획득된다. 이들 양태에서, 이 데이터는 관심의 생물학적 활성제에 대한 메타데이터를 획득하는데 사용된다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열에 기초하여, 생물학적 활성제(들)의 결합 특성에 대한 메타데이터가 획득될 수 있고, 이상적인 생물학적 활성제가 예측될 수 있다. 유사하게, 관심의 생물학적 활성제가 집단 내 세포에 의해 발현되는 빈도에 대한 메타데이터가 획득될 수 있으며, 이것을 사용하여 그 생물학적 활성제에 대한 생물체의 선호도를 예측할 수 있다.

[0076] 본 발명의 어떤 양태에서, 세포에 의한 관심의 생물학적 활성제의 생산이나 제공된 생물학적 활성제의 존재에 의해 영향받을 수 있는 다른 세포 특성들이 측정될 수 있다. 이러한 세포 특성은, 예를 들어 세포 형태, 막 전

위, 표면 마커 발현, 분비, 또는 세포내 마커 발현을 포함할 수 있다. 이러한 특성은 웰에 부착된 세포의 컴퓨터 이미지를 캡처하고, 모양, 색, 불투명도 및 크기 등의 여러 변수들에 대해 이들 이미지를 분석함으로써 측정될 수 있다. 다음에, 이런 변수들이 각 웰의 위치를 활용하여 세포에 의해 생산된 생물학적 활성제의 결합 친화성 및/또는 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 연계된다.

[0077] 본 발명은 세포 집단을 분석하여 집단의 평균 측정값을 기록하는 것이 아니라 다수의 세포를 개별적으로 분석하는 효과적인 방법을 제공한다. 본 방법을 사용하여 수백, 수천, 수만, 수십만, 수백만 또는 그 이상의 세포를 동시에 스크리닝할 수 있다. 본 방법은 a) 친화성과 관련하여 관심의 생물학적 활성제들의 순위를 매기거나, b) DNA 서열 데이터를 필터링하여 고려 대상으로부터 오염된 세포나 무관한 세포를 제거하거나, c) 생산된 생물학적 활성제의 양에 기초하여 세포의 타입을 분류하거나, 또는 d) 세포가 관심의 유사한 생물학적 활성제들을 생산하는 빈도를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 용도는 약물 스크리닝의 분야에 있다. 이러한 경우, 세포 신호화 경로를 조정하기 위해 스크리닝될 수 있는 복수의 생물학적 활성제, 예를 들어 소분자 화합물, 항체, 또는 siRNA가 멀티-웰 장치의 복수의 마이크로웰에 제공되며, 이때 각 마이크로웰은 상이한 생물학적 활성제를 포함한다. 실질적으로 유사한 세포가 각 웰에 제공되고, 관심의 생물학적 활성제, 예를 들어 단백질을 생산하도록 방치되며, 이것의 발현에 따라 스크리닝 중인 생물학적 활성제의 효능이 예측될 것이다. 웰에서 세포에 의해 생산되는 관심의 생물학적 활성제는 결합제, 예를 들어 생물학적 활성제와 결합한다고 알려져 있는 단백질과 접촉되고, 이어서 이것이 고상 표면, 예를 들어 멀티-웰 장치의 뚜껑에 부착된다. 세포가 관심의 생물학적 활성제를 생산한다면 그것은 어드레스 지정된 위치에 있는 결합제에 의해 포착된다. 다음에, ELISA 또는 다른 이러한 결합 분석에 의해 고상 표면이 생물학적 활성제의 존재에 대해 분석된다. 다음에, 생물학적 활성제의 존재/부재에 대한 정보가 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과 연계되고, 계속해서 멀티-웰 플레이트의 웰과 연계된다. 이로써, 복수의 생물학적 활성제가 스크리닝되고, 세포 신호화 경로를 조정하는데 있어서의 그들의 효능이 결정될 수 있다.

[0079] 또한, 본 발명의 용도는 네트워크 약리학의 분야에도 있다. 이러한 경우, 하나 이상의 생물학적 활성제, 예를 들어 소분자 화합물, 항체, 또는 siRNA가 스크리닝되어 복수의 세포 신호화 경로에 대한 그것의 효과가 결정될 수 있다. 예를 들어, 단일 생물학적 활성제가 멀티-웰 장치의 복수의 마이크로웰에 제공된다. 실질적으로 유사한 세포가 각 웰에 제공되고, 관심의 생물학적 활성제, 예를 들어 단백질을 생산하도록 방치되며, 이것의 생산에 따라 복수의 신호화 경로에 대한 생물학적 활성제의 영향이 예측될 것이다. 웰에서 세포에 의해 생산된 관심의 생물학적 활성제는 생물학적 활성제와 결합한다고 알려져 있는 복수의 결합제, 예를 들어 단백질과 접촉되고, 이어서 이것이 고상 표면, 예를 들어 멀티-웰 장치의 뚜껑에 스폿 형태로 부착되며, 이때 각 결합제는 웰과 연계된 고상 표면의 영역에 스폿 형태로 부착된다. 세포가 관심의 생물학적 활성제를 생산한다면 관심의 생물학적 활성제는 어드레스 지정된 위치에 있는 결합제에 의해 포착된다. 다음에, 고상 표면이 세포에 의해 생산된 생물학적 활성제의 존재/부재에 대해 분석되는데, 예를 들어 마이크로어레이 스캐너에서 멀티-스펙트럼 형광 검출을 사용하여 상이한 결합제들(예를 들어, 각각 상이한 색의 형광단으로 표지된다)이 확인되고, 각 결합제에서 포착된 생물학적 활성제의 양을 정량한다. 다음에, 생물학적 활성제의 존재/부재에 대한 정보를 사용하여 세포 상태와 세포 신호화 경로의 활성 수준을 결정할 수 있다. 이로써, 단일 생물학적 활성제가 스크리닝되고, 복수의 세포 신호화 경로를 조정하는데 있어서의 그것의 효능이 결정될 수 있다. 네트워크를 이루고 있는 경로들에 대한 생물학적 활성제의 조합의 효과도 이 방식으로 스크리닝될 수 있음이 주지된다. 이러한 경우, 1 개를 초과하는 생물학적 활성제가 각 웰에 제공될 수 있거나, 또는 제제들이 각 웰에 개별적으로 제공된 다음, 단일 웰로 조합될 수 있다.

[0080] 또한, 본 발명의 용도는 관심의 단백질 변이체를 확인하는데도 있다. 예를 들어, 바이오마커 개발 분야에서, 질환에 대한 증가된/감소된 감수성, 또는 치료에 대한 증가된/감소된 민감성의 척도가 될 수 있는 신규의 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)을 확인하는 것이다. 이러한 경우, 생물학적 활성제, 예를 들어 단백질 및 단백질 안의 돌연변이가 전형적으로 질환에 대한 증가된/감소된 감수성 또는 치료에 대한 증가된/감소된 민감성과 연결된다. 이러한 경우, 상이한 인간 피험자로부터의 세포가 복수의 웰에 배치되고(이때 상이한 피험자로부터의 세포는 상이한 웰에 배치된다), 관심의 단백질을 생산하도록 세포가 방치된다. 웰 안의 관심의 단백질은 결합제, 예를 들어 관심의 단백질과 결합한다고 알려져 있는 단백질과 접촉되고, 이어서 이것이 고상 표면, 예를 들어 멀티-웰 장치의 뚜껑에 결합된다. 관심의 단백질이 관심의 단백질과 결합제의 결합 효능을 조정하는 돌연변이, 예를 들어 SNP를 포함하지 않는다면 관심의 단백질은 어드레스 지정된 위치에 있는 결합제에 의해 포착된다. 다음에, ELISA 또는 다른 이러한 결합 분석에 의해 고상 표면이 관심의 단백질에 대해 분석되어 고상 표면의 관심의 단백질과 결합제의 결합 효능이 결정될 수 있다. 다음에, 관심의 단백질

의 결합 효능에 대한 정보가 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과 연계되고, 계속해서 멀티-웰 플레이트의 웰과 연계된다.

[0081] 한편으로, 웰 안의 세포로부터 mRNA를 제조하고, cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 서열화함으로써 각 웰에 존재하는 관심의 단백질의 뉴클레오티드 서열이 결정된다. 각 웰에 독특한 올리고뉴클레오티드를 제공함으로써 cDNA는 일괄하여 서열화되는데, 이 올리고뉴클레오티드는 합성된 그대로의 cDNA에 결합되고, 이후 cDNA를 모아서 초고 처리량 DNA 서열화 기술에 의해 서열화하여 각 기원 세포에 존재하는 관심 있는 적어도 하나의 단백질의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 서열화 과정 동안, 마이크로웰-식별 택이 DNA 서열 형태의 디지털 택으로 전환되고, 이후 이것을 사용하여 뉴클레오티드 서열과 특정 웰을 연계시키고(단백질의 복합체, 예를 들어 항체의 중쇄와 경쇄처럼 관심 있는 하나 이상의 생물학적 활성체가 웰로부터 서열화되는 경우, 또는 단백질이 복수의 폴리펩티드로 이루어진 경우에는 서로를 연계시킨다, 예를 들어 아래 내용 참조), 이로써 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과도 연계시킬 수 있다. 따라서, 관심의 단백질의 복수의 변이체가 동시에 스크리닝될 수 있으며, 이러한 변이체의 결합 특성에 대한 정보가 이러한 자연 발생 변이체들을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상관될 수 있다. 이 정보와 질환에 대한 피험자의 감수성 및/또는 치료에 대한 피험자의 민감성에 대한 데이터의 상관관계를 이용하여 신규의 예측 및 예후 바이오마커를 확인할 수 있다.

[0082] 일부 경우에는 관심의 단백질 변이체가 단일 폴리펩티드로 이루어질 수 있다는 점이 주지되어야 한다. 다른 경우, 관심의 단백질 변이체는 정확히 동일한 세포로부터 생산된 폴리펩티드의 복합체, 즉 시스 복합체이며, 이때 폴리펩티드의 복합체화는 단백질, 예를 들어 항체에 결합 특성을 부여한다. 또 다른 경우에는, 관심의 단백질 변이체는 단백질의 복합체, 즉 트랜스 복합체일 수 있으며, 이때 단백질의 복합체화는 복합체의 1개 단백질 또는 심지어 복합체 전체에 결합 특성을 부여한다. 예를 들어, 신호전달을 담당하는 많은 세포 표면 수용체는 비공유 결합을 통해 다른 수용체와 복합체를 형성하는 능력을 지닌다. 또한, 본 발명을 사용하여 단백질 복합체를 세포별 결합 특성에 대해 시험할 수 있으며, 이로써 복합체의 형성에 영향을 미치는 스플라이스 변이체와 같은 질적인 변화를 확인할 수 있다. 예를 들어, 정상 세포와 암 세포 간의 세포별 비교가 이루어질 수 있다. 관련 단백질이 포착된 경우, 수용체의 표지된 리간드를 사용하여 유사한 분석을 수행함으로써, 세포별로 복합체의 결합 특성을 이해할 수 있을 뿐만 아니라, 세포별로 상이한 조합을 확인할 수도 있다. 이러한 모든 정보 조각들이, 세포에 의해 생산된 생물학적 활성체의 결합 특성 및 그 생물학적 활성체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(들)을 포함하는 앞서 언급된 세포의 관찰된 특성과 상관될 수 있다. 세포 및 그것의 신호전달 기전의 하이 컨텐트 분석이 수행될 수 있다.

[0083] 관심 있는 생물학적 활성체가 폴리펩티드의 복합체인 분야의 한 예로서 항체 개발 분야가 있다. 예를 들어, 본 발명을 사용하여 세포를 스크리닝함으로써, 항원에 대해 더 높은 친화성이나 항원항체 결합력을 가진 항체를 생산하는 세포를 확인할 수 있고, 이러한 항체의 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 이러한 경우, B 세포, 예를 들어 원형질 세포가 복수의 웰에 배치되는데, 이때 각 원형질 세포는 상이한 웰에 배치되어 항체를 생산하도록 방치된다. 웰 안의 세포에 의해 생산된 항체는 고상 표면, 예를 들어 멀티-웰 장치의 뚜껑과 결합한다고 알려져 있는 결합체, 예를 들어 단백질 G, 단백질 A, 단백질 L, 단백질 A/G와 접촉되고, 항체들이 예외없이 특이적으로 결합된다. 다음에, 포착된 항체가 다수의 공지된 결합 분석 중 어느 것에 의해서, 예를 들어 ELISA에 의해 분석되고, 이로써 항체의 표적 단백질, 즉 항원에 대한 친화성 및/또는 항원항체 결합력이 결정될 수 있다. 다음에, 항체의 결합 친화성에 대한 정보가 고상 표면의 특정 어드레스를 가진 영역과 연계되고, 계속해서 멀티-웰 플레이트의 웰과 연계된다.

[0084] 한편으로, 항체의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열은 웰 안의 세포로부터 RNA를 제조하고, cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 서열화함으로써 결정된다. 일괄하여 서열화하기 위해서, 각 웰에 특유한 올리고뉴클레오티드가 웰에 제공되며, 이 올리고뉴클레오티드는 합성된 그대로의 cDNA에 결합되고, 이후 cDNA를 모아서 초고 처리량 DNA 서열화 기술에 의해 서열화함으로써 각 원형질 세포에 의해 생산된 항체의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 서열화 과정 동안, 마이크로웰-식별 택이 DNA 서열 형태의 디지털 택으로 전환되고, 이것을 사용하여 중쇄와 경쇄의 뉴클레오티드 서열과 특정 웰 그리고 서로를 연계시키고, 이로써 멤브레인의 특정 어드레스를 가진 영역과도 연계시킬 수 있다. 따라서, 특정 웰 안의 특정 세포에 의해 생산된 항체의 결합 특성에 대한 정보가 이들 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상관될 수 있다. 이러한 정보를 사용하여 항체에 대한 친화성/항원항체 결합력이 보다 우수한 항체로 가공할 수 있다.

[0085] 다르게는, 본 발명을 사용하여 고상 표면 요소의 사용과 관계없이 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열을 획득할 수 있고, 이로써 항체 결합 친화성, 및 주어진 항체 서열의 발생 빈도를 분석할 수 있으며, 이것을 사용하여 면

역반응 동안의 클론 선별 현상으로 인한 해당 항체의 K_D 를 추산할 수 있다. 이 추산된 K_D 는 포착된 항체로부터 획득된 측정값과 상관될 수 있다. 이런 계통의 분석은 생체내 친화성 성숙 과정을 이해하는데 도움이 될 수 있으며, 궁극적으로는 시험관내 항체 친화성을 증가시키기 위한 더욱 효과적인 집중된 노력의 길잡이가 될 수 있다.

[0086] 주어진 항체의 중쇄와 경쇄의 조합에 이용할 수 있는 다수의 서열에 대해서, 돌연변이의 위치와 측정된 평형 상수를 이용하여 항체 상의 파라토프의 중요 아미노산 잔기를 추론하는 것이 가능하다. 본 발명은 또한 이러한 연구에도 유용한데, 본 발명에 따라서 큰 집단 중의 단일 세포에 의해 암호화된 단백질의 뉴클레오티드 서열을 획득할 수 있기 때문이다.

[0087] 중요 아미노산 잔기가 확인되면, 에피토프 및 항원 상의 잠정적 에피토프의 주변의 구조를 추론하는 것이 가능하다. 본 발명은 항체의 자유 결합 에너지와 잠정적인 단백질 폴딩을 추정한다. 각 항체에 대해 확인된 잠재적 에피토프에 대해서, 이것은 표적 항원에 대해 획득된 항체를 분류하기 위한 또 다른 기준을 제공한다. 항원 상의 상이한 에피토프들 각각에 대한 항체들의 집단을 신속히 확인할 수 있는 능력이 본 발명의 이점이다. 이것은 회수된 많은 수의 상이한 항체들에 요구되는 확인 시험의 수를 줄인다. 확인된 에피토프의 밀도가 매우 충분하다면, 항원 상의 확인된 에피토프에만 국한된 구조를 해함으로써 항원의 전체 구조를 잘 이해할 수 있다. 이런 성과 또한 전례가 없던 것이다. 이들은 모두 본 발명을 사용함으로써 다수의 항체가 빠르게 회수될 수 있다는 사실로 인한 것이다.

[0088] 최고 K_D 와 최저 K_{off} 를 가진 항체를 획득하려는 목표는 제약 개발과 부합되지만, 본 발명을 사용하여 면역화 이후의 임의의 날짜에 원형질 세포 및/또는 항원-특이적 B 세포와 같은 항체 생산 세포를 취함으로써 면역반응을 추적할 수 있다. 또한, 본 발명을 사용하여 마우스 비장으로부터 선별 없이 B 세포 집단을 증식시키거나, 또는 심지어 인간 피험자의 순환계 중의 B 세포를 증식시킴으로써 면역 시스템의 개시를 모니터링할 수도 있다. 이것은 자가면역 질환을 연구하고, 바이오마커나 잠재적 약물 표적을 개발하는데 매우 유용할 수 있다. 물론, 항체와 유사한 구조를 가진 T 세포 수용체도 면역 기능 연구를 위해 유사한 방식으로 분석될 수 있다. 결론적으로, 본 발명은 많은 잠재적 용도를 가지며, 주요한 용도는 Ig 또는 T 세포 수용체 또는 분비된 항체에 따라 재배열된 유전자와 같은, 세포 집단 내의 다형성인 유전자 조합의 분석에 있을 수 있다.

[0089] 파지 디스플레이 기술과 유사하게, 효모 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 및 포유류 디스플레이와 같은 많은 디스플레이 기술에서 본 발명을 사용하여 구성물을 스크리닝할 수 있다. 유세포분석에 의해 항원-특이적 B 세포를 선택하는 방식과 유사하게 라이브러리로부터 후보 디스플레이 클론을 풍부하게 할 수 있다. 일단 풍부하게 되면, 디스플레이 클론들은 항원-특이적 B 세포와 마찬가지로 마이크로웰에 분리되고, 매우 유사한 방식으로 가공될 수 있다. 포착 서열은 사용된 디스플레이 기술에 맞게 적절히 변화되어야 한다. 그러나, 많은 디스플레이 기술과는 달리, 디스플레이 클론에 의해서 발현된 단백질이 아래 구체에 1 또는 구체에 2에서 설명된 대로 포착될 경우, 후보들이 훨씬 더 빠르게 가공될 수 있고, 이들의 결합 특성을 일괄하여 특성화할 수 있다.

[0090] 또한, 본 발명을 사용하여 세포에 의한 단백질 변이체의 생산에 의해 영향받을 수 있는 다른 세포 특성, 예를 들어 세포 형태, 막전위, 표면 마커 발현, 분비, 또는 세포내 마커 발현을 시험할 수 있다는 것도 주지되어야 한다. 따라서, 세포별로 이러한 세포 특성을 기록한 다음, 이런 특성들을 세포에 의해 생산된 생물학적 활성제의 결합 특성 및/또는 그 생물학적 활성제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(들)과 상관시킬 수 있다. 한 예로서, 개별 세포의 형태가 세포의 중형형성 능력의 척도로서 사용될 수 있고, 그 결과를 핵산 서열화 결과와 상관시켜 단백질 변이체 또는 유전자 카피수를 평가함으로써 진단을 확인하고 잘못된 양성결과를 줄일 수 있다. 세포나 표면 결합 항체에서 형광을 측정하는 경우, 마이크로어레이 리더에서 이미지가 산출되는데, 이 경우 다양한 픽셀 강도가 특정 웰 안의 세포 표면 마커, 또는 표면 결합된 항체의 농도와 연계되어야 한다. 웰 안에 놓인 세포, 포착된 mRNA, 및 선택적으로 포착된 단백질 간의 적절한 정합을 보장하기 위해, 조사중인 세포 집단에 기지의 시스 단백질 복합체와 함께 마커 세포를 포함시키는 것이 역시 바람직할 수 있다.

[0091] 본 발명의 양태를 더 설명하면서, 이후의 설명은 원하는 친화성을 가진 특정 항원과 결합하는 항체의 발현에 대해 단일 세포를 스크리닝하고, 및/또는 이들 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 획득하는 것에 중점을 둔다. 그러나, 본 방법 및 장치는 세포의 상태 및 활성에 대한 정보를 취득하는데 사용될 수 있는 다른 생물학적 활성제에 대한 단일 세포의 스크리닝에도 사용된다.

[0092] 예를 들어, 형질세포(102)가 전체 마이크로웰을 채우고 있는 버퍼 용액 중에서 마이크로웰(101) 내부에서 현탁된다. 마이크로웰(101)은 50 마이크로 x 50 마이크로 x 50 마이크로미터의 치수를 가질 수 있다. 치수(105)는 마

이크로웰(101)의 바닥에서 위까지 0 내지 50 마이크론에서 측정된다. 한 측면에서 반대편 측면까지의 치수는 -25 마이크론에서 25 마이크론까지의 범위이다. DNA 올리고뉴클레오티드는 패드라고 불리는 연속 부위에서 마이크로웰(101)의 바닥면에 부착된다. 패드(103)는 항체의 중쇄를 코딩하는 형질세포(102)의 mRNA에 존재하는 비번이 서열에 상보하는 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 패드(104)는 항체의 경쇄를 코딩하는 형질세포(102)의 mRNA에 존재하는 비번이 서열에 상보하는 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 상기 비번이 서열이 선택됨으로써, 이들은 상기 mRNA가 형질세포(102)로부터 방출되어 마이크로웰(101)의 세포 배양 용액일 수 있는 용액으로 확산될 때 상보성 mRNA를 물리적으로 강하게 포착할 것이다. 마이크로웰(101)은 어떤 방향이든지 적절히 기능할테지만, 도 1에 도시된 목적을 위해서는, 패드(103)와 패드(104)가 마이크로웰(101)의 바닥에 부착된다.

[0093] 이후의 특정 구체예에서, 세포에 의해 생산되는 관심의 생물학적 활성제는 항원에 대한 면역반응으로서 숙주에서 세포에 의해 생산된 항체이다. 구체예 1 및 구체예 2에서, 각 원형질 세포에 의해 생산된 각 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 결정되고, 각 원형질 세포에 의해 생산된 항체가 포착되어 원형질 세포가 각기 놓여 있는 마이크로웰과 정합되어 어드레스 지정 어레이를 형성한다. 형광 표지된 항원 제제가 가변 농도로 사용되어, 각 스폿에 포착된 항체에 신호를 보냄으로써 해리 상수(K_{off})와 평형 상수(K_D)가 모두 측정된다. 관련된 상수들이 K_{off} 와 K_D 로부터 유도된다. 이러한 동력학적 결합 특성은 본 발명을 사용하여 획득된 항체들의 순위를 매기는데 매우 유용한데, 다수의 항체가 회수되므로 이들을 분류하는 수단이 있는 것은 바람직하다. 또한, 유세포분석을 이용한 항원-특이적 B 세포가 풍부하게 되는 것이 불충분한 경우, 이들 측정값은 오염원인 비-B 세포나 비-항원-특이적 B 세포로부터 유래하는 데이터를 필터링하는데 사용된다.

[0094] 구체예 3 및 구체예 4에서, 이 생물학적 시스템을 사용하여, 시스 단백질 복합체를 이루는 2개의 구성성분 거대분자의 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 결정하기 위해서 본 발명이 사용될 수 있는 방식이 예시되며, 여기서 각 구성성분, 즉 중쇄 및 경쇄의 2개의 카피가 복수의 공유 결합에 의해 함께 고정된다. 이 경우, 면역반응 동안 생성된 각 원형질 세포에 존재하는 각 항체의 경쇄 및 중쇄에는 다형성의 차이가 있다. 본 발명을 실시함으로써 항체의 중쇄 및 경쇄 1차 구조의 조합이 분석된 각 원형질 세포에 대해 결정될 수 있다. 이러한 조합에 의해 항체의 정교한 특이성이 확보되므로, 1차 구조, 즉 아미노산 서열을 알면 항체의 중쇄와 경쇄 조합의 1차 구조에 대한 지식을 기초하여 적합한 구성물을 합성하고, 이러한 구성물을 궁극적으로는 항체를 제공하는 적합한 발현 시스템에 도입함으로써 항체를 유전자 조작할 수 있으며, 이것은 연구, 진단 및 치료를 포함한 여러 분야에서 다양한 용도를 가진다.

[0095] 마우스 항체에 중점을 두고 논의되지만, 본 발명이 체액성 면역반응을 발생시키는 능력을 가진 동물에 의해서 생산된 항체들에 적용될 수 있다는 것은 분명하다. 본 발명의 어떤 양태에서, 본 발명의 실시를 위한 전제조건은 주어진 이소타입에 맞는 항체의 중쇄 및 경쇄 mRNA의 불변 영역의 서열을 아는 것이다. 본 발명은 B 세포와 같은 항체 생산 세포로부터 직접 mRNA와 단백질을 획득하므로, 하이브리도마 세포를 생성하기 위한 세포 융합의 필요성이 분명히 없어진다.

[0096] 예시된 실시예에서는 마우스 IgG1, IgG2a 및 IgG2b 이소타입 중쇄 보존 서열과 κ 경쇄 서열만을 사용하여 마우스 항체 mRNA를 포착하고 있지만, 이것은 구체예를 제시하는 것이며, 본 발명을 제한하는 것이 아니다. 적합한 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브들의 혼합물이 부착되고, 이것을 사용하여 모든 이소타입을 포착할 수 있는 스폿 형태 마이크로어레이를 사용하는 것도 전적으로 본 발명의 범위이다.

[0097] 구체예들 중 하나에서, 연구되는 단백질 복합체는 항체의 중쇄 및 경쇄일 수 있다. 이 경우, 구조 정보와 동력학적 특성을 통합함으로써 항체 상의 파라토프뿐만 아니라 항원 상의 에피토프를 간파할 수 있다. 본 발명의 이런 활용을 예시하기 위해, 헵텐 2-페닐-5-옥사졸론(phOX)에 대한 항체를 이용한 시뮬레이션이 수행되었다.

[0098] **구체예 1**

[0099] 편평한 지지체 위에 50 마이크론($\pm 25\%$) 높이의 웰들을 부착하고 웰 내부에 올리고뉴클레오티드 패드를 결합시킴으로써 마이크로웰이 제조될 수 있다. 마이크로웰마다 단일 세포가 착상되도록 마이크로웰들 전체에 세포가 분포된다. 관심의 단백질의 부착에 적합한 물질로 코팅된 커버가 상기 마이크로웰 위에 덮인다. 예를 들어, 상부 커버 상에 항체를 고정시키기 위해서, 커버가 단백질 A 또는 단백질 L(Sigma-Aldrich, 세인트루이스, 미주리)과 같은 항체 특이적 포착제로 코팅된다.

[0100] **구체예 2**

[0101] 구체예 2에서는 관심의 단백질의 부착에 적합한 물질이 시판되는 마이크로웰 어레이 위에 코팅되는데, 시판되는 제품으로서, 예를 들어 50 마이크로 6각형 웰들을 함유하는 블랭크 PicoTiterPlate 장치(454 Life Sciences, 브랜포드, 코네티컷)가 있다. 웰마다 단일 세포가 착상되도록 상기 6각형 웰 전체에 세포가 분포된다. 예를 들어, 웰의 표면에 항체를 고정시키기 위해서, 표면이 단백질 A와 같은 항체 특이적 화합물로 코팅된다. 상기 PicoTiterPlate 위에 주문제작 올리고뉴클레오티드 어레이(NimbleGen Systems, Inc., 메디슨, 위스콘신)가 놓여서 mRNA를 포착하여 택을 붙인다.

[0102] **구체예 3**

[0103] 구체예 3에서는 편평한 지지체 위에 약 50 마이크로톤의 웰들을 부착시킴으로써 마이크로웰이 제작된다. 마이크로웰마다 단일 세포가 착상되도록 상기 마이크로웰 전체에 세포가 분포된다. 상기 제작된 마이크로웰 위에 주문제작 올리고뉴클레오티드 어레이(NimbleGen Systems, Inc., 메디슨, 위스콘신)가 놓여서 mRNA를 포착하여 택을 붙인다. 단백질은 포착되지 않는다.

[0104] **구체예 4**

[0105] 구체예 4에서는 시판되는 마이크로웰 어레이, 예를 들어 50 마이크로 6각형 웰들을 함유하는 블랭크 PicoTiterPlate 장치(454 Life Sciences, 브랜포드, 코네티컷)를 사용하여 분포된 세포를 함유시킨다. 상기 시판되는 마이크로웰 어레이 위에 주문제작 올리고뉴클레오티드 어레이(NimbleGen Systems, Inc., 메디슨, 위스콘신)가 놓여서 mRNA를 포착하여 택을 붙인다. 단백질은 포착되지 않는다.

[0106] **구체예 5**

[0107] 구체예 5에서는 2개의 평면 표면이 다공성 구조에 의해서 짧은 거리(예를 들어, 50 마이크로) 만큼 분리된다. 하나의 평면 표면 또는 둘 모두가 마이크로어레이이다. 다공성 구조는 생물학적 세포를 함유하기에 충분히 큰 홈을 함유한다(예를 들어, 50 마이크로). 다공성 구조는 하나의 평면 표면에 일시적으로 고정되고, 이로써 개방된 마이크로웰 어레이가 구성된다. 생물학적 세포가 상기 마이크로웰의 위에 전체적으로 분산되는데, 이것은 다음의 두 방법 중 하나를 따르며, 이 두 방법은 a) 확률론적 분리(이 경우 상기 세포의 농도는 세포가 상기 마이크로웰 위에 무작위로 분산될 때 일반적으로 단일 세포만이 단일 마이크로웰을 점유하도록 선택된다); 및 b) 결정론적 분리(이 경우 개별 세포는 정해진 마이크로웰로 이동하도록 유도된다)이다. 일정 시간(예를 들어, 3 분) 후, 마이크로웰 위의 세포는 증가된 세포 밀도로 인해 상기 마이크로웰로 들어가게 된다. 모든 마이크로웰에 공통되는 시약이 상기 마이크로웰 위의 영역에 도입되고, 각 마이크로웰에서 반응이 일어난다. 소분자는 단 시간(예를 들어, 10초) 내에 상기 마이크로웰 밖으로 확산될 수 있다. 다음에, 두 번째 평면 표면이 상기 마이크로웰 위에 놓여 이들이 밀봉되며, 더 장시간 동안 마이크로웰 안에서 반응이 일어나도록 방치된다. 상기 반응의 결과 상기 마이크로웰에 들어 있는 화합물질들에 의해 마이크로어레이(들)이 변형된다. 상기 마이크로어레이(들)가 변형되었다고 간주된 후, 평면 어레이들이 분리되고 다공성 구조가 제거된다. 분석 동안 상기 변형된 마이크로어레이(들)에 맞게 제작된 코드가 사용되어 마이크로웰과 측정된 결과가 연계된다. 상기 코드는 마이크로웰 상의 물리적 위치, 또는 분석된 데이터에 삽입되도록 유도되는 택일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 어레이의 경우, 상기 삽입되는 택은 특유한 DNA 서열일 수 있다.

[0108] **멀티-웰 장치**

[0109] 본 발명의 방법에서 중점적인 사항은 개별 마이크로웰에 단일 세포의 착상이다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 마이크로웰로 이루어진 멀티-웰 장치이다. 마이크로웰은 두 가지 목적으로 사용되는데, 첫째는 개별 세포들 사이에서 반응물과 산물의 확산을 억제하는 것이고, 두 번째는 핵산 혼성화나 단백질 상호작용과 같은 과정의 속도를 가속하는 것이다. 따라서, 본 발명의 멀티-웰 장치의 마이크로웰은 cm² 당 100개 마이크로웰을 초과하는 밀도로 상호연결되고, 각 마이크로웰은 1 피코리터 내지 500 나노리터의 부피를 가진다. 이 트레이는 임의의 수의 웰을 포함할 수 있으며, 바람직하게 96개 이상의 웰, 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000개 웰 이상

을 포함한다. 전형적으로, 마이크로웰은 cm^2 당 100개 웰을 초과하는 밀도로 제공된다. 웰은 이들이 단일 세포를 보유할 수 있도록 설계되고, 트레이 표면은 세포가 배치되어 트레이 표면 근처로 이동될 때 단일 세포가 각 웰 내로 이동되도록 설계된다. 추가로, 트레이는 마이크로웰이 외부 시약과 간헐적으로 접촉되도록 설계될 수 있다.

[0110] 또한, 본 방법의 어떤 구체예에서 중점적인 사항은 관심 있는 생물학적 활성제에 대한 세포의 스크리닝이다. 따라서, 본 발명의 멀티-웰 장치는 관심의 생물학적 활성제와 결합하는 제제, 예를 들어 결합제가 부착되는 고상 표면을 더 포함할 수 있다. 이 고상 표면은 멤브레인, 필라멘트, 비드, 또는 폴리스티렌이나 폴리프로필렌 시트, 예를 들어 복수의 부위로 이루어진 트레이 상부일 수 있으며, 이때 각 부위는 트레이 상의 각 웰과 특유하게 상응한다. 이 부위는 평면일 수도 있고, 더 큰 표면적을 제공하기 위해서 밖으로 돌출될 수도 있다. 트레이 상부의 부위(및 선택적 돌기)는 항체 결합제, 예를 들어 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L, 단백질 A/G, 염소 항-마우스 IgG 항체, 또는 세포에 의해 생산되는 관심 있는 적어도 하나의 생물학적 활성제에 대한 표적 결합 단백질로 코팅된다. 이 코팅은 웰 안의 세포에 의해 생산된 생물학적 활성제와 효과적이며 선택적으로 결합하는 어떤 제제를 포함할 수 있다.

[0111] 일부 구체예에서, 생물학적 활성제가 마이크로웰들에 제공될 수 있다. 예를 들어, 소분자 화합물, 단백질, siRNA 또는 올리고뉴클레오티드가 마이크로웰에 스폿 형태로 제공될 수 있다. 또한, 또는 달리, 각 웰이 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 올리고뉴클레오티드로 코팅된다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 서열화 반응에서 세포가 용해된 후 웰 안의 뉴클레오티드를 복제하기 위한 프라이머로서 작용할 수 있다.

[0112] 본 장치는 본원에 설명된 어떤 방법에 따라서 장치를 사용하기 위한 설명서를 포함하는 키트의 형태일 수 있다. 또한, 본 장치는 PCR 시약을 포함하는 시약과 함께 판매될 수 있다.

[0113] **실시예**

[0114] 다음의 실시예들은 본 발명의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 완전한 개시와 설명을 이 분야의 통상의 기술자에게 제공하기 위해서 제시되며, 본 발명자가 그들의 발명으로서 간주하고 있는 범위를 제한하려고 의도하는 것도 아니고, 아래 실험들이 수행된 모든 실험이거나 유일한 실험임을 나타내려고 의도하는 것도 아니다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 확보하기 위해 노력했지만, 어떤 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않는다면, 부는 중량부이고, 분자량은 중량평균 분자량이고, 온도는 섭씨이고, 압력은 대기압이나 대기압 근처이다.

[0115] **실시예 1: 마우스 항-HEL 항체의 증쇄와 경쇄 서열의 획득**

[0116] **마우스의 면역화**

[0117] 도 2에 관해, 일군의 BALB/c 마우스(201)를 완전 프레운드 애주번트(Sigma) 중의 암탉 리소자임(HEL, Sigma, 세인트루이스, 미주리) $50 \mu\text{g}$ 으로 복강내 면역화한다. 1차 면역화 후 6주 뒤에 마우스를 동일한 용량의 HEL로 정맥내 면역화한다. 2차 접종 후 2일 뒤에 마우스의 꼬리 정맥에서 채혈하고, 혈청 중의 HEL에 대한 다클론 항체의 존재를 ELISA 시험에 의해 결정한다. 상기 ELISA 시험에 의해 결정된 역가가 만족할 정도라면, 다음날 마우스를 죽여서 비장을 수거한다.

[0118] **항원-특이적 B 세포의 분리**

[0119] 비장을 기계 분쇄하여 비장세포의 세포 현탁액을 제조하고, 적혈구를 pH 7.4의 0.16M 염화암모늄 용액에서 용해한다. 얻어진 단일 세포 현탁액을 최적 희석비율의 FITC(Pierce Biotechnology, Inc., 록포드, 일리노이)로 표지된 HEL과 PE-Cy5 (Prozyme, 샌리앤드로, 캘리포니아)로 표지된 HEL의 조합으로 염색한다. 염색은 4°C에서 2 단계로 수행한다. 먼저, 실험적으로 결정된 최적 아포화 농도를 사용하여 세포를 1시간 동안 FITC-표지된 HEL로 염색한다. 다음에, 세포를 FACS 버퍼로 3번 세척한다. 다음에, 세포를 PE-Cy5-표지된 HEL로 염색한다. 염색 후, 세포를 5% FCS를 함유한 PBS로 2번 세척한다.

[0120] 변형된 이중 레이저 FAC-Star^{PLUS}™(BectonDickinson)를 사용하여 세포를 분석한다. CELLQuest 소프트웨어를 사용하여 파일을 획득한다. 단계(202)에서 적합한 표면 표현형을 가진 단일 B 세포를 FAC-Star^{PLUS}™에 부착된 자동 세포-디스펜싱 유닛과 Clone-Cyt 소프트웨어(BectonDickinson)를 사용하여 레퍼토리 분석을 위해 정렬한다.

RNase 억제제인 SUPERase-In가 1 U/μL 농도로 보충된 적합한 부피의 PBS에서 세포를 정렬한다. 또는 달리, 항원-특이적 B 세포는 적합한 세포 표면 마커를 확인하는 시약을 사용하는 자기-보조 세포 정렬(MACS)에 의해 분리할 수 있다. 이에 더하여, 항원-특이적 B 세포는 CellSys 101 마이크로드롭 마커(One Cell Systems, Inc., 캠브리지, 매사추세츠, 미국)나 유중수 에멀전에서 비롯된 마이크로드롭릿을 사용하는 아가로스 겔 마이크로드롭에 의해 분리할 수 있다. 또는 달리, 상기 언급된 방법들의 조합을 사용하여 항원-특이적 B 세포를 분리할 수 있다.

[0121] PicoTiterPlate를 이용한 세포 분리(단계 203)

[0122] PicoTiterPlate(PTP) 장치(454 Life Sciences, 브랜포드, 코네티컷)를 준비하고, 그 표면을 0.1M 나트륨 아세테이트 중에서 단백질 L(Pierce Biotechnology, Inc., 록포드, 일리노이)로 하룻밤 코팅한다. 표면을 1시간 동안 PBS 중의 3% BSA로 차단한다. PBS 중의 3% BSA를 제거한 후, 표면을 PBS 중의 0.1% Tween-20으로 4번 세척한다. 다음에, PTP 장치를 SUPERase-In가 보충된 PBS로 채운다. 웰에 남아 있을 수 있는 기포를 원심분리하여 제거하고, PTP 장치를 비드 부착 장치(454 Life Sciences, 브랜포드, 코네티컷)에 넣는다. 2mL 피펫을 사용하여 PTP 장치의 위에 세포를 부드럽게 배치하고, 10분간 방치하여 개별 세포가 웰 안에 들어가도록 한다. 웰 안에 들어가지 않은 세포를 커버슬립을 사용하여 PTP 장치로부터 이동시킨다. 구아니디늄 티오시아네이트 같은 무질서유발제나 NP-40 같은 디터전트를 포함하는 시판되는 세포용해액으로 세포를 용해한다(단계 204). 관심의 단백질의 포착을 원할 경우, 디터전트 NP-40이 사용되어야 한다. 단백질 A나 단백질 L과 같은 포착제로 코팅된 고상 표면을 사용하여 마이크로웰을 덮어서 용해된 단일 세포로부터 방출되는 거대분자들의 확산을 제한하고, 단백질 어레이를 형성한 고상 표면의 항체 등의 관심의 상기 단백질들을 동시에 포착한다(단계 211).

[0123] 패턴 있는 광저항성 구조 및 멤브레인의 제작

[0124] 표준 포토리소그래피 기술과 단단한 크롬 마스크를 사용하여 실리콘 웨이퍼 위에 포토레지스트로 된 원통형 기둥들의 어레이를 제작한다. 포토마스크로서 투명물질을 사용하여 50μm x 50μm x 50μm 치수이고 특징구조 간격이 50μm인 사각형 특징구조들의 어레이를 제작한다.

[0125] 엘라스토머 PDMS 멤브레인의 제작

[0126] PDMS 프레폴리머(가교 촉매와 10:1 비로 혼합)를 상기 언급된 패턴 있는 포토레지스트 특징구조의 바스-필리프 위에 60초 동안 3,000rpm으로 스핀-코팅하여 약 45μm 두께의 박막을 만든다. 이와 같이 얻어진 PDMS 멤브레인은 포토레지스트 특징구조의 치수에 의해 한정된 사각형 홈들을 지닌다. PDMS 멤브레인을 60°C에서 2시간 동안 경화시킨다. PDMS 프레폴리머의 더 두꺼운 층을 적하 방식으로 멤브레인 가장자리에 덧붙인다. 멤브레인을 60°C에서 하룻밤 둔다. 핀셋을 사용하여 멤브레인을 지지체에서 떼어내고, 지지체의 가장자리를 따라 원하는 크기로 자른다.

[0127] 단백질에 의한 비-특이적 결합을 최소화하기 위해 BSA로 홀이 있는 멤브레인 코팅하기

[0128] PDMS 멤브레인을 에탄올 몇 방울과 함께 유리 슬라이드 표면에 놓는다. BSA 버퍼 용액(1% w/v, PBS 중) 몇 방울을 멤브레인 위에 놓아서 홀을 덮는다. 이 유체는 소수성 공극을 채우기가 쉽지 않으므로, 진공(약 500 mTorr)을 30초 동안 적용하고 해제하는 것을 2번 실시하여 구멍에 포집된 공기를 배출한 다음, BSA가 표면에 흡수되도록 15분 동안 방치한다. 다음에, 유리 슬라이드 위의 PDMS 멤브레인을 PBS로 3번 헹군다. PBS의 존재하에 멤브레인을 유리 슬라이드에서 떼어내어, PBS(슬라이드 위에 멤브레인이 잘 밀봉되도록 돕는다)로 덮인 단백질 어레이 슬라이드(Full Moon BioSystems, 서니베일, 캘리포니아)로 옮긴다.

[0129] 홀이 있는 PDMS 멤브레인을 지지하기 위한 단백질 L로 코팅된 유리 슬라이드

[0130] SuperEpoxy 2 유리 슬라이드(TeleChem International, Inc., 서니베일, 캘리포니아)를 단백질 L(Pierce Biotechnology, Inc., 록포드, 일리노이)로 코팅한다. 준비된 홀이 있는 PDMS 멤브레인을 유리 슬라이드의 위에 놓고, 압력을 가해서 표면과 균일하게 접촉되도록 한다. BSA 버퍼 용액 중에서 셋업 전체를 다시 차단한다. 다시 간단한 진공을 적용하여 홀에 포집된 공기를 제거한다. 1시간 동안 차단을 수행한 후, PBS로 3번 세척한다. 이제 홀이 있는 PDMS 멤브레인을 지지하는 단백질 L로 코팅된 유리 슬라이드는 B 세포로부터 항체를 포착하는데 바로 사용될 수 있고, PDMS 멤브레인 상의 홈들이 마이크로웰을 나타낸다. 단백질 L에 더하여, 단백질 G, 단백질 A/G, 염소 항-마우스 IgG 항체 등을 사용하는 것도 가능하다.

[0131] NimbleGen HD-2 마이크로어레이 칩 상의 프로브의 일반적인 특징

[0132] NimbleGen HD-2 마이크로어레이 칩은 단일 슬라이드 상에 2백10만 개의 프로브를 가지며, 어레이 크기는 62mm x

14mm이다. 이로써, 2백10만 개의 특유한 택을 가질 가능성이 있다. 캡처, 택 부착, 그리고 후속되는 DNA 조작을 용이하게 하기 위해서, 중쇄와 경쇄 모두에 대해 프로브의 일반적인 특징들이 활용되며, 중쇄 포착 프로브에 대한 상기 일반적인 특징의 예는 XhoI 절단, 454 Life Sciences에 의한 프라이머 B, 웰 식별자 택의 시작점을 확인하기 위한 2-염기 스페이서(항상 일정하다), 14-mer 웰 식별자, 마우스 감마 중쇄 CH1 IgG1, IgG2a, 및 IgG2b 이소타입 중쇄 보존 서열 포착 프로브이다. 또한, 경쇄 포착 프로브에 대한 상기 일반적인 특징의 예는 XhoI 절단 부위, 454 Life Sciences(407)에 의한 프라이머 A, 웰 식별자 택의 시작점을 확인하기 위한 2-염기 스페이서(항상 일정하다), 14-mer 웰 식별자, 및 마우스 카파 경쇄 불변 영역 포착 프로브이다. 마이크로웰 식별자 택의 길이가 14-mer라는 것을 주지하면, 이것은 268백만 개를 넘는 가능한 서열 조합을 가지고, 이는 2백10만 개의 프로브에 필요한 것을 훨씬 초과하여 수이다. 이런 완충작용은 동일한 염기의 연속 3개 겹침 및 완전한 자기-상보성 또는 마이크로웰 식별자와 중쇄 프로브 서열, 경쇄 프로브 서열, 454 프라이머 A, 또는 454 프라이머 간의 상보성과 같은 바람직하지 않은 서열의 제거를 가능하게 한다. 이에 더하여, G+C 함유량은 40-60% 사이에서 유지되는 것이 바람직하다. 필요하다면, 해밍 코드에서 사용되는 것과 같은 패리티 코드가 오차보정을 위해 웰 식별자에 삽입될 수 있다. 면역글로불린 중쇄(서열번호: 1) 및 경쇄(서열번호: 2) 폴리펩티드에 대한 프로브의 예는 도 4에서 찾을 수 있다.

[0133] 용해된 세포로부터 방출된 mRNA의 포착과 택이 붙은 ds cDNA로의 전환 과정이 도 3에 예시된다. mRNA(301)의 표적 분자는 올리고뉴클레오티드 프로브(203)와 혼성화되고, 이것이 전형적인 마이크로어레이 슬라이드에서와 마찬가지로 비-DNA 링커(305), 454 Life Sciences의 PCR/서열화 프라이머 B(304), 웰 식별자 택(303), 중쇄 또는 경쇄 유전자로부터의 표적 mRNA에 존재하는 영역에 상보하는 포착 올리고뉴클레오티드(302)를 포함하는 고상 표면(306)에 부착된다. 역전사(307)는 역전사효소(Stratagene, 라줄라, 캘리포니아)를 사용하며, 프라이머인 포착 올리고뉴클레오티드(203)를 확장하고, 표적 mRNA 주형의 적합한 영역을 카피함으로써 5'-메틸 dCTP(309)를 통합하여 제1 가닥 cDNA(308)를 합성한다. 제2 가닥 cDNA 반응(310)은 RNaseH와 *E. coli* DNA 중합효소 I의 조합 작용에 의해 5' 단부에 있는 원 mRNA 주형의 작은 세그먼트만을 뒤에 남기면서 표적 mRNA를 치환한다. T4 DNA 중합효소를 사용한 반응(313)은 ds cDNA(314)의 5' 단부를 블런트 단부로 만든다. 라이게이션 반응(315)에서는 배향 특이적 라이게이션을 보장하기 위해 3' 돌출 단부를 가진 454 Life Sciences의 PCR/서열화 프라이머 A를 포함하는 어댑터 분자(316)가 부착된다. 과정(318)에서는 과량의 어댑터 분자가 제거되고, 과정(319)에서는 부착된 ds cDNA가 엔도뉴클레아제 XhoI(New England Biolabs, 임스위치, 메사추세츠)에 의해 고상 표면으로부터 절단되어 454 Life Sciences의 PCR/서열화 프라이머 A 및 B가 측면에 붙은 웰 식별자 택을 가진 ds cDNA 분자(320)가 방출되며, 이것은 454 서열화 작업흐름에 바로 도입될 수 있다.

[0134] mRNA 및 항체 포착(단계 205)

[0135] 동일한 부피의 1% NP-40을 PTP 장치의 한쪽에서부터 피펫팅하여 최종 NP-40 농도를 0.5%로 만든다. PTP 장치를 10초 동안 인큐베이션한다. 다음에, PTP 장치의 위를 NimbleGen HD-2 마이크로어레이 칩으로 덮고, 이것을 적합한 장치를 사용하여 확실히 고정한다. 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 다음에, 셋업 전체를 트레이에 보유된 RNase 무함유 PBS 중에서 소킹하여 마이크로어레이와 PTP 장치를 분리한다. PTP 장치를 PBS로 3번 광범하게 세척한다. 이제 단일 B 세포로부터 포착된 항체를 가진 PTP 장치는 4°C에서 보관할 수 있다. 60°C에서 10분 동안 트레이에 보유된 PBS 중에서 마이크로어레이를 소킹하여 비특이적으로 혼성화된 RNA종들을 제거한 다음, PBS로 3번 광범하게 세척한다. 이제 이 마이크로어레이를 하류 조작에 바로 사용할 수 있다.

[0136] cDNA 합성 및 어댑터 부착(도 2의 단계 206)

[0137] 마이크로어레이를 김와이프 위에서 간단히 물기를 빨아들여 건조시킨 다음, SuperScriptIII RTase(Invitrogen, 칼스배드, 캘리포니아), 적합한 버퍼 성분, 및 5'-메틸 dCTP를 제외한 dNTP를 함유하는 역전사효소(RTase) 반응 용액 30 µL를 곧바로 가한다. 커버슬립을 가하고, 마이크로어레이를 50°C, 가습 환경에 1시간 동안 둔다. DNA 중합효소 버퍼 중에서 소킹하여 커버슬립을 제거한 다음 3번 세척한다. 칩을 다시 김와이프 위에서 물기를 빨아들여 건조시킨다. *E. coli* DNA 중합효소와 RNaseH를 함유하는 적합한 버퍼 30 µL를 가하고, 이 샘플을 16°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 칩을 세척하고, 합성된 이중 가닥(ds) cDNA를 37°C에서 30분 동안 T4 DNA 중합효소로 마무리한다. 말단이 바이오틴화된 사전-아닐링된 어댑터를 가하고, 실온에서 1시간 동안 적합한 버퍼 중에서 T4 DNA 리가아제에 의해 칩 상의 블런트-단부 cDNA와 라이게이션한다. 다음에, 10mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1mM EDTA 중에서 광범하게 세척하여 과량의 어댑터를 제거한다. cDNA가 부착된 이 슬라이드는 4°C에 보관할 수 있다.

[0138] 마이크로어레이 슬라이드 상의 DNA 패드와 단백질 어레이 상의 단백질 스폿의 정합을 위한 마커 세포

- [0139] 하이브리도마 계통 TIB-228(American Type Culture Collection, 매너사스, 버지니아)은 이소타입이 IgG2b인 인간 CD14에 대한 항체를 생산한다. 중쇄 및 경쇄의 DNA 서열은 결정되어 있다(중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 GenBank 수탁 번호는 각각 AY669065 및 AY669066이다). 재조합 인간 CD14는 시판되는 것을 입수할 수 있다(Abnova, 타이페이, 대만). 본 발명을 실시할 때, 10개 내지 50개 범위의 적합한 수의 세포를 풍부하게 된 항원-특이적 B 세포와 혼합한 후, 이들을 마이크로웰에 분리해 넣을 수 있다. FITC-표지된 HEL로 염색되는 항-HEL 항체와 구별하기 위해서 CD14는 PE-Cy5로 표지할 수 있다.
- [0140] 454 Life Sciences의 기술에 의한 DNA 서열화
- [0141] NimbleGen 칩에 부착된 이중 가닥(ds) cDNA를 37°C에서 15분 동안 XhoI 엔도뉴클레아제(New England Biolabs, 입스위치, 매사추세츠)와 함께 인큐베이션함으로써 절단한다(단계 207). 스티렙타비딘 비드(MyOne beads, Invitrogen, 칼스배드, 캘리포니아)에 의해 방출된 ds cDNA를 선택적으로 포착하여 보관할 수 있다. 이러한 전략은 보관 도중의 DNA 손실을 최소화한다. 이후, 상보성 가닥을 비드로부터 용해시키고, 454 프라이머 A와 경쇄 영역 내에 적합한 프로브가 위치한 경쇄 프라이머에 의한 실시간 PCR을 사용하여 정량할 수 있다. 실시간 PCR 용의 유사한 시약들을 중쇄 ds cDNA에 대해서도 설계할 수 있다.
- [0142] 일단 ds cDNA를 정량한 후, 적합한 양을 희석하여 적합한 양의 비드와 혼합한 다음, 계속해서 단계(208)의 에멀전 PCR에 사용한다. 비드는 판매자의 권고에 따라서 가공하여 서열화한다(단계 209). 스페이서, 택, 불변 영역, 및 중쇄와 경쇄 모두의 전체 가변 영역을 포함시키면 약 415개 염기의 서열이 필요한데, 이것은 454 서열화 기술의 한계범위 내이다. 한 방향으로 관독되는 서열화는 명확한 서열 정보를 얻는데 충분하며, 이로써 항체의 중쇄 및 경쇄를 재구성할 수 있다. 이것은 프로토타입 가변 서열의 게놈 서열이 공지되어 있기 때문이다. 또한, 다른 보고된 서열에 기초하면 면역반응 동안 항체 서열에서 FR1은 대부분 돌연변이되지 않는 것 같다. 마지막으로, 항체별로 관독되는 서열의 여유는 높다. 따라서, 작업당 백만 회가 관독된다고 하는 판매자의 명세서에 기초하면, 각 B 세포에 대해 5배 범위를 적용하면, 몇 개의 마커 세포를 빼고 200,000개까지의 B 세포를 분석할 수 있다는 것이 가능하다. 또는 달리, PCR 프라이머의 3' 단부에 택 특이적 서열을 결합시킴으로써 결합 동력학 측정값에 의해 확인된 특정 웰로부터 기원하는 cDNA를 직접 증폭할 수도 있다. 서열화 작업 후, 다음의 단계들을 수행하여 서열을 분석할 수 있다(단계 210 및 213):
- [0143] a) 454 작업으로부터 서열 리스트를 획득한다;
- [0144] b) 컴퓨터로 서열을 평가하고, 각 서열에 대한 택, 스페이서, 및 불변 영역을 확인하여, 각 서열이 H 사슬 서열인지 아니면 L 사슬 서열인지 결정한다. 이에 더하여, 중쇄 불변 영역의 5' 단부를 향한 염기를 서열화하고, 그 안의 미세한 변형을 사용하여 포착된 항체의 이소타입을 결정한다;
- [0145] c) 불변 영역 서열과 스페이서를 마스크한다;
- [0146] d) 마커 세포 H 및 L 사슬 서열을 확인한다;
- [0147] e) 마커 세포 H 및 L 사슬 서열에 상응하는 택을 확인하고 시험하여, 이들이 마이크로어레이 상에서 아주 근접하여 있는지(즉, 마이크로웰 폭 미만) 결정한다. 결과가 긍정적인 경우, 이들 택으로 마이크로웰을 식별한다. 마커 세포를 함유하는 다수의 마이크로웰의 위치에 의해 각각 B 세포를 함유할 수 있는 나머지 마이크로웰들의 물리적 레이아웃이 확립될 것이다;
- [0148] f) 이 레이아웃에 기초하여 각 예상된 마이크로웰에 대해 택 기를 생성한다;
- [0149] g) 동일한 H 사슬이나 L 사슬을 가진 서열을 확인한다;
- [0150] h) 동일한 H 사슬이나 L 사슬 서열의 상응하는 택을 컴퓨터로 평가한다. 택이 동일하다면 그 H 사슬 또는 L 사슬의 기원을 확인한다;
- [0151] i) 확인된 H 사슬과 확인된 L 사슬로부터의 택을 사용하여 H 택과 L 택의 쌍을 검토함으로써, 이들이 예상된 택기에 합치되는지를 알아본다. 결과가 긍정적인 경우, 그 조합을 확인한다;
- [0152] j) 복수의 H 사슬 서열 또는 L 사슬 서열을 확인된 조합과 정렬시켜 컨센서스 서열을 획득한다. 이 컨센서스는 적합한 면역글로불린 v 유전자의 프로토타입 게놈 서열과 매치될 것이다;
- [0153] k) 쌍을 이룬 H 사슬과 L 사슬 서열 상의 모든 CDR 및 FR을 확인한다. 이에 더하여, 프로토타입과 비교하여 돌연변이된 잔기를 확인한다;

[0154] 1) 확인된 조합들을 집단화하고, 동일한 조합의 빈도를 추적하여, 이들이 클론 선별의 성과를 나타내는지를 결정한다; 그리고

[0155] m) DNA 서열을 아미노산 서열로 번역한다.

[0156] **실시예 2: 에폭시 웰의 제작**

[0157] 약 50 마이크론의 화학적으로 불활성인 구조를 구성하는 것은 이 분야의 통상의 기술자의 공통된 지식이다. 이런 구조는 본 발명에서 상기 구체에 1과 구체에 3에서 모두 사용된다. 간단히 말해서, 34mm 커버슬립(Fisher Scientific, 피츠버그, 펜실베이니아)을 아세톤, 이소프로판올, 메탄올, 탈이온수(18 Mohm)로 세척하고, 질소류에서 건조시킨다. 10분 동안 80 mTorr의 기본 압력과 120 mTorr의 산소 압력에서 120 와트 산소 플라즈마에 노출시켜 더 세정한다(Technics 500 II Asher).

[0158] 세정된 커버슬립을 스핀 코터(Laurell Technologies, 노스웨일즈, 펜실베이니아)의 진공 척에 주의 깊게 중심을 맞추어 설치하고, SU-8 50(Microchem, 뉴턴, 매사추세츠) 네가티브 포토레지스트를 중심에 가만히 디스펜스한다. 커버슬립을 10초 동안 500rpm으로 회전시키고, 다음 30초에 걸쳐 2,000rpm까지 상승시킨다. 커버슬립을 95°C에서 20분 동안 부드럽게 베이킹하고, 10분 동안 실온에서 냉각시킨다.

[0159] 아도브 포토샵을 사용하여 에멀전 마스크를 설계하고, Linotronic-Hercules 3300 dpi 프린터(7.4 마이크론 스폿 사이즈)에서 프린트한다. 이 마스크를 SU-8 필름과 접촉하도록 놓고 석영 슬라이드를 덮어 아래로 하중을 부여한 다음, Kasper 2001 Contact Mask Aligner에서 365nm, 약 200 mJ/cm²의 강도에서 1분 동안 노출시킨다. 노출된 포토레지스트를 수평 핫플레이트에서 95°C에서 2시간 동안 베이킹하고 30분 동안 PM 아세테이트 중에서 소킹한 다음, 1시간 동안 200°C에서 경화시킨다.

[0160] 코팅된 커버슬립을 멸균 증류수 중에서 하룻밤 소킹하고, 1시간 동안 UV 살균 램프 아래에서 DI 중의 70% 에탄올 중에서 살균한다. 커버슬립을 멸균수로 3번 행구고, 적어도 4시간 동안 젖은 상태로 보관하면 바로 사용할 수 있다. 4시간의 보관 시간은 웰에 남아 있는 기포를 없애기 위한 시간이다.

[0161] 50 마이크론의 치수를 선택함으로써 마이크로웰은 10-15 마이크론의 형질세포 1개를 충분히 함유하게 된다. 레이놀드 수가 미터/초 단위의 유체 속도의 56배이므로, 웰 안에서 난류는 생기지 않는다. 따라서, 일단 웰이 유체로 채워지면 기포는 들어가지 않는다.

[0162] **실시예 3: 구아니디늄 티오시아네이트(GT)를 사용한 B 세포로부터 mRNA의 방출**

[0163] 이 실시예는 상기 구체에 3 및 구체에 4에 관한 것이다. 우리는 마이크로웰 안으로 구아니디늄 티오시아네이트(GT)가 확산되고 다시 물러나는 현상을 컴퓨터로 계산한 분자 시뮬레이션으로부터 결과를 계산했다. 시뮬레이션된 GT 분자는 B 세포의 세포막을 향해 확산되고 결국에는 용해되었다. 우리는 한 전형적인 마이크로웰에 대해 20개의 이미지를 컴퓨터로 얻었으며, 각 이미지는 상이한 시간에 얻어졌다. 처음 10개 이미지들의 차이는 0.1초였고, 마지막 11개 이미지들의 차이는 1.0초였다.

[0164] 시간 t = 0초에서, 2000개 GT 분자가 상기 각 마이크로웰에 직접 곧바로 동일한 부피에 신속히 도입되었다. 이것은 매우 낮은 GT 농도(26pM)를 나타내며, 세포를 용해하는데 필요한 GT 농도(1M)보다 훨씬 낮다. 2000개의 분자만을 시각화하여 확산을 측정하는데 사용하였기 때문에, 1M GT의 작은 단편만을 리포터로 표지하여 이미지화했고, 이 리포터 분자들만을 계산에 사용했다. 시간 진행에 따라, t = 1.0초까지 400개의 GT 분자가 마이크로웰로 확산되었다. 다음에, 마이크로웰 위의 GT 분자의 수는 빠르게 감소하여 0에서 유지되었다. 마이크로웰 내부의 상기 분자들은 마이크로웰 밖으로 확산되었고, 10초 이상이 지난 후 농도는 13개 분자로 떨어졌다.

[0165] 이 시뮬레이션에서 0.5초에서 0.8초 사이에 형질세포의 세포막이 실질적으로 용해되었으며, 골지체를 둘러싼 막도 마찬가지로 용해되었다. 상기 mRNA가 GT보다 실질적으로 더 컸기 때문에, 그것은 훨씬 더 느리게 확산되었다.

[0166] 이 시뮬레이션에서 사용된 GT 분자의 수는 어떤 편리한 농도로 규모를 조정할 수 있다. 물리적 마이크로웰 위에 로딩된 농도에 맞춰서 정규화할 경우, 21%는 1.0초 내에 마이크로웰 안으로 확산될 것이고, 마이크로웰 위의 농도의 플러싱 후 10초 뒤에는 웰 내부의 농도가 0.65%로 떨어질 것이다. t = 11초에서 모든 mRNA는 아직 웰 안에 완전히 함유되어 있다. 이런 낮은 농도의 GT는 RNA와 DNA, 또는 DNA와 DNA의 혼성화를 방해하지 않는다.

11초 이후에는 마이크로웰을 밀봉하여 모든 mRNA가 계속해서 마이크로웰 내부에 유지되도록 한다.

[0167] 확산성은 스톡스-아인슈타인 관계식으로부터 계산되었다:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

[0168]

[0169] 상기 식에서, D는 확산도, k_B 는 볼츠만 상수(1.38×10^{-23} J/K), T는 실온, η 는 버퍼의 점도(8.94×10^{-4} Pa/sec), r은 GT(5.0 옹스트롬) 또는 mRNA(60 옹스트롬)의 회전 반경이다. 구체의 482 테셀레이션으로부터 선택된 무작위 방향에 길이 벡터 $\sqrt{6D\Delta t}$ 를 더하여 매 $\Delta t = 3$ 밀리세컨드마다 궤적을 다시 계산했다.

[0170] **실시예 4: 항체 파라토프 맵핑(단계 214)**

[0171] 시스- 및/또는 트랜스-단백질 복합체가 항체일 경우, 본 발명은 이전에 이용할 수 있었던 것보다 훨씬 더 많은 수의 항체에 대한 정보를 제공한다. 서열화된 태크와 원 마이크로웰을 연계시킴으로써, B 세포에 의해 생산된 mRNA 집단뿐만 아니라 이들 각각의 중쇄 및 경쇄 서열을 확인한다. 상기 서열들에 의해 각 B 세포 내부의 체세포 돌연변이를 추론할 수 있다.

[0172] 본 출원인은 21개의 경쇄 및 중쇄 항체의 공개된 서열로부터 B 세포 집단을 시뮬레이션했다. 이 서열들을 Web Antibody Modeling의 권고에 따라서 정렬했다. 각 서열을 밀스테인에 의해 측정된 각자의 해리 상수와 함께 저장했다. 또한, 본 출원인은 카피수를 계산했는데, 이것은 서열을 가진 특이적 mRNA를 함유하는 세포의 수를 나타낸다.

[0173] 독립적으로 경쇄 및 중쇄의 길이를 따라 존재하는 아미노산의 변형을 시험했다. 모든 아미노산 위치에서, 가장 높은 빈도의 아미노산과 다른 아미노산이 존재할 확률을 계산했다. 위치 i 에서 n 의 아미노산이 f 의 가장 높은

빈도로 카운트된 경우, 확률을 다음 식으로 계산했다: $p_i = 1 - \frac{f}{n}$. 가장 가변성 있는 경쇄 및 중쇄 아미노산은 파라토프에 위치할 가능성이 가장 높다. 서열 집단을 정렬할 수 있으므로, 파라토프를 추론할 수 있다.

[0174] 또한, 본 발명은 파라토프에 결합된 항원의 K_D 를 측정할 수 있고, K_D 와 아미노산 돌연변이 확률 사이의 관계를 플롯팅할 수 있다. 본 발명에서는 유의한 면역학적 활성의 증거로서 K_D -돌연변이 그래프에서 클러스터를 해석한다. 면역 시스템이 안정한 중쇄 또는 경쇄 항체 구조를 찾아내었을 때, 작은 단일-염기 돌연변이들은 단일 아미노산을 돌연변이시킴으로써 특이성을 유의하게 개선할 수 있음을 시사한다. 반대로, 낮은 K_D 를 가진 단일 클러스터는 성공적인 체세포 돌연변이의 발견을 시사한다. 본 출원인은 성공적인 체세포 돌연변이의 증거와 파라토프를 공고히 연계시키고 있다.

[0175] **실시예 5: 항원 구조 예측(단계 215)**

[0176] 컴퓨터 화학에 의해서 상당한 진전이 이루어졌지만, 아미노산 서열과 용매에 대한 약간의 지식을 이용하여 단백질 3차 구조를 컴퓨터로 추론하는 현재의 방법은 아직 도전 중에 있으며, 시간 소모적이고, 오차 경향이 있다. 그러나, 잠정적 폴딩 동안 선행 정보나 제약사항이 통합된다면 컴퓨터 처리 시간 및 정확성에 상당한 개선이 이루어질 수 있다. Web Antibody Modeling(<http://antibody.bath.ac.uk/>)은 높은 성공률로 항체 모델을 증명하고 있다. 본 발명은 본 출원인이 발견한 컴퓨터 계산된 항체 구조, 및 상기 실시예 4에서 확인된 파라토프를 사용하여 잠정적 단백질 폴딩들에 대해 실제적인 확률을 정할 수 있다.

[0177] 윈 데드-엔드 엘리미네이션(DEE) 알고리즘은 수천 개의 잠정적 단백질 폴딩을 확인한다. 최근의 개선된 기술에 의해 이 알고리즘을 보다 능률화되어, 구조적 및 통계적 필터를 제공함으로써 이 수를 약 1,000개까지 상당히 감소시켰다. 작업 시간은 약 5.5시간이다.

[0178] 본 발명은 항체 및 잠정적 단백질 폴딩의 자유 결합 에너지를 컴퓨터로 추산할 수 있다. 컴퓨터로 이 에너지를 추산하기 위해, 본 출원인은 컴퓨터에 의해 항체와 잠정적 단백질을 도킹시켰다. 이것은 모양, 전자밀도 또는 통계적 빈도를 이용하는 많은 방법에 의해서 행해진다. 대형 컴퓨터 작업 클러스터는 컴퓨터 처리 시간을 상당

히 개선한다. 대형 컴퓨터에서 전형적인 작업 시간은 도킹 당 약 8초이다.

[0179] 본 발명은 측정된 K_D 에 따라 자유 결합 에너지를 컴퓨터로 추산하여 비교하고, 가장 근접 매칭되는 단백질과 에피토프를 선택한다. 본 발명의 결과는 a) 각자의 H 및 L 사슬의 DNA 서열을 획득함에 의한 특정 항원에 대한 디지털 방식으로 불멸화된 항체들의 집단; 각 항체와 항원 사이의 상호작용에 관한 동역학 행렬; c) 각 항체의 파라토프의 컴퓨터 맵핑; d) 항원 상의 에피토프의 컴퓨터 맵핑; 및 e) a), b), c) 및 d)로부터의 정보의 조합에 의해 지원된 항원 구조의 모델링.

[0180] **실시예 6: 서열 빈도 및 FACS 형광에 의한 K_D 의 추론**

[0181] 이 실시예는 구체에 3 및 구체에 4에 관한 것이다. 각 B 세포의 표면은 동일한 막에 결합된 B 세포 수용체(BCR)를 수천 개 함유하며, 형질세포 역시 더 적은 정도로 함유한다. BCR의 일부 단편과 결합하는 기지 농도의 형광 표지된 항원에 세포를 노출시킴으로써 이들을 특이적으로 표지할 수 있으며, 상기 단편 f 는 다음 식에 의해 근사된다:

[0182]
$$f = \frac{[a]}{K_D + [a]}$$

[0183] 상기 식에서, K_D 는 해리 상수이고, $[a]$ 는 항원 농도이다.

[0184] 단편 f 는 형광 신호에 의해 추산될 수 있다. 그러나, 세포의 크기가 다양하므로 큰 오차가 도입된다. 세포 크기에 의해 상기 형광 측정값을 정규화함으로써 f 의 추산값이 상당히 개선될 수 있으며, 이때 세포 크기는 BD Biosciences(세너제이, 캘리포니아)의 것과 같은 적합한 세포 정렬기로부터 나오는 정면 산란된 F1 신호와 잘 상관된 치수이다. 상기 식을 다시 쓰면, 세포를 표지하는데 사용된 항원 농도 $[a]$ 를 알고 있으므로, 다음과 같이 정규화된 형광 신호 f 로부터 K_D 가 추산될 수 있다:

[0185]
$$K_D = \frac{[a](1-f)}{f}$$

[0186] 본 발명은 세포를 마이크로웰에 분포시키고, 특유한 핵이 붙은 올리고뉴클레오타이드 상에서 mRNA에 상보하는 DNA를 포착한다. 상기 분포 전에는 세포들이 모여 있으므로, FACS 형광에 의해 추론된 K_D 와 핵이 붙은 올리고뉴클레오타이드를 연계시키는 것은 일반적으로는 어렵다. 본 발명이 이러한 연계를 해결하는 한 방식은 특정 항체를 발현하는 B 세포의 풍부도(abundance)(또는 빈도(frequency))와 K_D 사이의 관계를 이용하는 것이다: 동일한 항체

[0187] 분자를 발현하는 B 세포의 수 n 은 K_D 의 함수
$$n = \frac{c}{K_D^3}$$
 이고, 여기서 c 는 임의의 상수이다.

[0187] 이 관계는 상기 분포된 마이크로웰로부터 관측한 서열의 수에 적용될 뿐만 아니라, FACS에서 측정된 항원 양성 세포에도 적용된다. 따라서, 상수 c 는 다음에 의해서 결정된다:

- [0188] a) 각 서열이 샘플링된 회수를 결정;
- [0189] b) 임의의 c 값을 사용하여 각 서열과 연계된 카피수를 컴퓨터로 계산;
- [0190] c) 상기 카피수의 순서로 서열을 정렬;
- [0191] d) 정면 산란된 FACS F1 신호에 의해 측면-산란된 FACS 신호 F2를 정규화하여 결합된 BCR 표면 밀도를 컴퓨터로 추산;
- [0192] e) 상기 결합된 BCR 밀도 추산값에 따라 FACS 신호를 정렬;
- [0193] f) 서열의 총수가 FACS 신호의 총수와 동일하게 되도록 변수 c 를 조정;
- [0194] g) 상기 서열과 결합된 BCR 밀도 추산값을 정렬;
- [0195] h) 각각의 상기 결합된 BCR 밀도 추산치에 대한 K_D 를 컴퓨터 계산;

[0196] i) 상기 서열과 정렬된 상기 결합된 BCR 밀도 추산값의 평균 K_0 를 각 서열과 연계.

[0197] 본 출원인은 형질세포의 FACS 정렬에 따른 정면 산란된 F1 신호로부터의 데이터를 시물레이션했다. 형광 진폭과 특정 형광 진폭에서 카운트된 세포수를 나타냈다.

[0198] 시물레이션된 F1 및 F2 신호에서 시작하여, 상기 단계 a)에서부터 i)까지로 표시된 과정을 수행했다. 본 방법에 의해 추론된 K_0 들과 문헌에 보고된 K_0 들의 비교 결과는 아주 우수했다. 측정된 K_0 와 예측된 K_0 들의 상당한 근접 매치는 본 접근법의 가치를 증명한다.

[0199] **실시예 7: 분포된 세포수의 최적화**

[0200] 본 발명은 마이크로웰이 제공된 표면 전체에 어떤 수의 세포를 분포시킨다. 짧은 시간, 예를 들어 3분 후에 상기 세포는 마이크로웰에 착상된다. 가능한 많은 마이크로웰과 그에 따라 가능한 많은 세포들을 보유하는 것과 충분한 mRNA가 택이 붙은 올리고뉴클레오티드에 의해 포착되고, b) 세포 내부의 물질이 mRNA-DNA 혼성화를 실질적으로 방해하지 않을 만큼 충분히 큰 마이크로웰을 떠나는 것 사이에 경쟁이 있다. 본 출원인은 B 세포와 같은 직경이 10-15 마이크로미터인 세포에 대해 50 마이크로미터의 웰 크기가 이것을 적절히 절충할 것이라고 예상한다. 그외 다른 세포나 상이한 화학물질에 대해서는 웰 크기가 변할 수 있다는 것은 자명하다.

[0201] 일단 마이크로웰의 크기가 정해지면 마이크로웰의 수를 결정해야 한다. 편리한 전체 어레이 치수는 현미경 커버슬립 크기인 34 x 34mm이며, 그중 24 x 24mm만을 사용하고, 그외 부분은 기계적 지지를 위해 남겨 놓는다. 이로써, 50 마이크로미터의 중심 간 간격으로 배치된 230,000개의 마이크로웰을 위한 공간이 마련된다.

[0202] 마이크로웰 전체에 세포를 분포시키기에 따라, 각 마이크로웰에 세포가 1개씩 착상되길 기대한다. 그러나, 마이크로웰 전체에 너무 많은 세포를 산포시키면 둘 이상의 세포가 동일한 웰에 착상될 수 있는 확률이 높아질 것이다. 마이크로웰 전체에 너무 적은 세포를 산포시키면 많은 마이크로웰이 세포가 착상되지 않은 채로 남을 것이다. 이 문제에 관한 통계학적 최적화가 이 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 간단히 말해서, 단일 세포가 마이크로웰 바로 위의 부피로 들어간다고 간주한다. 마이크로웰이 상기 단일 세포를 함유할 확률 p 는 $p = 1/230,000$ 이다. 2개 세포 중 1개가 웰에 존재하고, 나머지 세포는 어딘가 다른 웰에 존재하기를 원하므로, 2개의 마이크로웰이 각각 1개의 세포를 함유할 확률 $prob$ 는 이항정리 $prob = 2p(1-p)$ 를 따른다. n 개의 세포에 대해서는 $prob = np(1-p)^{n-1}$ 이다. 단일 세포 마이크로웰(싱글렛)의 수는 $prob$ 의 230K 배와 같다. 동일한 공식을 사용하면, 미점유 마이크로웰의 수는 $230K(1-p)^n$ 과 같다.

[0203] 분포된 세포의 수를 최적화하기 위해서, 멀티플렛 m 의 확률, $m = 1 - (1-p)^n - np(1-p)^{n-1}$, 즉 세포수의 함수로서 마이크로웰이 2개 이상의 세포를 수용할 확률을 컴퓨터 계산했다. 멀티플렛 확률과 세포수 사이의 커스토머리 밸런스, 및 본 출원인이 여기서 사용한 것은 5%이며, 이것은 $n = 82,000$ 개 세포일 때 발생한다.

[0204] 단일 세포가 단일 마이크로웰을 점유한 수와 마이크로웰 전체에 분포된 세포수 사이의 관계를 컴퓨터 계산했다. 예를 들어, 분포된 세포수가 82,000개일 때, 단일 세포 웰의 수는 57,400개이다.

[0205] **실시예 8: 서열수의 최적화**

[0206] 모든 마이크로웰은 Ab mRNA를 포착하기 위해 택이 붙은 올리고뉴클레오티드를 2개 함유하는데, 하나는 중쇄용이고, 하나는 경쇄용이다. 이들 두 서열을 디지털 방식으로 연계시키기 위해, 한 세포를 함유하는 각 웰로부터 적어도 하나의 분자가 서열화되어야 한다. cDNA 서열들이 방출되어 모이므로, 이 서열들을 오버샘플링하여 각 세포의 중쇄 및 경쇄로부터 적어도 하나의 서열이 서열화되도록 보장하여야 한다.

[0207] 서열 집단은 세포수의 2배이다. 특정 중쇄 서열을 선택할 확률 p 는 경쇄 서열을 선택할 확률 q 와 같다: $p = q = 1/164,000$. 특정 서열을 선택하지 않을 확률은 $r = 1 - p - q$ 이다. 두 사슬이 모두 적어도 한 번씩 서열화된 웰의 수는 다항분포 $prob = 164,000(1 - r^n - npr^{n-1} - npq^{n-1})$ 을 이용하여 컴퓨터 계산된다. 두 사슬이 모두 서열화된 웰의 수는 서열화된 샘플의 총수의 함수로서 컴퓨터 계산되었다. 좋은 적용범위를 확보하기 위한 커스토머리 오버시퀀싱 비율은 5X이다. 5 x 82,000를 사용하면, 이 서열수는 160,000개 마이크로웰로부터 2배의 서열을 제공하고, 2배 샘플링 퍼센트는 97.6%이다.

[0208] **실시예 9: 형광 감소를 이용한 k_{off} 및 k_{on} 의 측정(단계 212)**

[0209] 하이브리도마 계통(NQ2-12.4)의 K_D 는 $2.8 \times 10^{-7} \text{ molar}^{-1}$ 로 측정되었다. 측정된 항체 k_{on} 값은 $10^5 \text{ sec}^{-1} \text{ molar}^{-1}$ 근처에 모여려는 경향을 나타내고, k_{off} 는 $2.8 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 이다. $10^{-7} \text{ molar}^{-1}$ 보다 큰 K_D 는 거의 연구, 진단제 또는 치료제의 대상이 아닌데, 이들은 각각의 항원과 매우 약하게 결합하고, 항원으로부터 신속히 해리되며, 원하는 성과를 얻을 확률이 실질적으로 낮기 때문이다. 강하게 결합하는 항체가 훨씬 더 유용한데, 전형적으로 10^{-8} 미만의 K_D 를 갖는 것들이다. 본 발명은 강하게 결합하는 K_D 가 전형적으로 $< 2.8 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 의 k_{off} 값을 가지며, 따라서 형광을 사용하여 24 x 24mm 항체 어레이에서 K_D 및 k_{off} 를 측정하는 것이 용이하게 이루어질 수 있다는 사실을 이용한다. k_{on} 은 $k_{on} = k_{off}/K_D$ 로부터 컴퓨터 계산된다. 이 실시예에서, 본 발명은 $2.8 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 의 극도로 약한 경우에도 작동하며, 따라서 다른 상업적으로 관심 있는 항체들에도 작동할 것이라는 것을 알 수 있다.

[0210] 이 구체예에서는 현미경 커버슬립을 단백질 A로 코팅한다. 세포를 마이크로웰 전체에 분포시키고, 용해되면 상기 커버슬립을 마이크로웰 위에 놓는다. 이 구체예에서는 올리고뉴클레오타이드를 마이크로웰의 내부 표면에 고정시킨다. 마이크로웰에서 용해된 세포가 다수의 항체를 함유할 경우, 이들 항체는 단백질 A 근처를 향해 웰 전체로 확산되어 강하게 결합될 것이며, 이것은 이 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 대로이다. 예상된 범위의 k_{on} 과 항체 농도에 따라 일정 시간 인큐베이션한 후, 커버슬립을 제거하여 세척한 다음, 형광 표지된 항원 용액에 노출시킨다.

[0211] 본 출원인은 평형식 $Ab.Ant \leftrightarrow Ab + Ant$ 를 이용하여 NQ2-12.4와 phOX의 결합에 대한 상세한 분자 시뮬레이션을 수행했다. 본 출원인은 미결합 항체 Ab가 형광 표지된 항원의 초기 2개의 농도, 즉 $[Ant_0] = 100\text{nM}$ 및 $[Ant_0] = 200\text{nM}$ 에 노출된 후의 처음 3분을 주목했다. 미결합 항체 Ab, 결합 항체 Ab.Ant 및 자유 항원 Ant의 전개는 다음의 잘 알려진 관계식에 의해 요약된다:

[0212]
$$\frac{d[Ab.Ant]}{dt} = -k_{off}[Ab.Ant] + k_{on}[Ab][Ant] = -\frac{d[Ab]}{dt} = -\frac{d[Ant]}{dt}$$

[0213] 형광 표지된 항원은 쉽게 측정되고, 표지되지 않은 항원의 결합에 근접한다. 결합되지 않은 항원으로 시작할 경우, 3분 이상 항원 중에서 항체를 소킹한 후, 항원이 결합된 항체 부위의 단편 f 를 항체 부위의 총수로 나눈 값은 다음과 같이 평형에 점근적으로 접근한다:

[0214]
$$f = \frac{[Ab.Ant]}{[Ab.Ant] + [Ab]} = \frac{[Ab.Ant]}{[Ab_0]} = \frac{[Ant]}{K_D + [Ant]}$$

[0215] 항체의 총수를 알고 있다면, 단편 점유도 f 를 직접 측정할 수 있다. 본 출원인은 잘 제어된 광 플럭스로 형광단을 주의 깊게 여기시키고, 본 출원인의 검출기 쪽으로 산란된 광자의 수를 카운트했다. 형광 단면 및 알고 있는 광표백 확률에 기초하여 형광단의 수를 꽤 근접하게 추산할 수 있었다. 이 접근법에서 난관은 항체의 총수를 모르므로 측정된 형광단 대 총 형광단의 비를 구하여 이 비 f 를 계산할 없다는 점이다.

[0216] 본 발명은 둘 이상의 형광 진폭을 측정함으로써 이 문제를 해결한다. 형광 마이크로어레이 리더로부터의 신호는 형광단의 농도에 따른다. 일반적으로 이 관계는 대략 선형이다. 항체들의 한 고정된 부착부로부터 동일한 전체 신호를 측정하고, 알고 있는 광표백 효과에 대해 적절히 보정한다면, 단편 점유도 f 도 역시 측정된 형광과 선형 관계를 이룰 것이고, 어떤 단편 점유도 f_1 이 어떤 특정 항원 농도 $[Ant_1]$ 와 관련될 때 이것은 $meas_1 = a \cdot f_1$ 이다. 동일한 항체 부착부에 대해서, 이것은 동일한 a 에서 $meas_2$, f_2 및 $[Ant_2]$ 에 대해서 동등하게 참이다. 상기 서술된 f 에 대한 관계를 이용하여 $meas_1$, $[Ant_1]$, $meas_2$ 및 $[Ant_2]$ 의 함수로서 K_D 를 풀 수 있다:

$$K_D = \frac{meas_2 - meas_1}{\frac{meas_1}{[Ant_1]} - \frac{meas_2}{[Ant_2]}}$$

[0217]

[0218]

이 식은 2개의 항원 농도와 연계된 2개의 형광 측정값의 함수로서 쓰여졌지만, 더 많은 항원 농도와 연계된 더 많은 형광 측정값도 비선형 변수 추산 분야의 통상의 기술자 의해 쉽게 이용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

$$\alpha = \frac{meas_1}{f_1} = \frac{meas_1(K_D + [Ant_1])}{[Ant_1]}$$

[0219]

일단 K_D 가 결정되면, α 를 이용하여 α 에 대해서 푼다. 본 발명에서는 α 를 아는 것이 매우 유용하며, 그러면 측정된 신호를 단편 점유도로 전환할 수 있다. 형광 리더의 캘리브레이션에 의해 측정된 형광단의 수를 알고 있으므로, 단편 점유도에 의해 결합된 항체와 결합되지 않은 항체 모두의 총수를 알 수 있다. 이 수는 세포의 본질, 즉 세포가 형질세포인지 아니면 B 세포인지와 상당히 상관 있다. 형질 세포는 주로 이들의 B 세포 선조로부터 추가의 체세포 돌연변이를 함유한다. 형질세포의 표면에 있는 B 세포 수용체는 체세포 돌연변이 전에 생성된 것이므로 항체들이 상이할 수 있다. B 세포를 확인할 뿐만 아니라 높은 빈도의 B 세포를 확인함으로써 강하게 결합하는 항체를 더 잘 추산할 수 있다.

[0220]

상기 설명은 항원과 형광 신호 모두를 정확히 측정할 것을 요한다. 본 출원인은 [Ant]의 추산값으로서 초기 항원 농도 [Ant₀]을 사용한다. 이것은 일반적으로 [Ant₀]이 총 Ab 농도보다 실질적으로 클 경우 적합하다. [Ab]의 추산값으로서, 본 출원인은 4.4nM의 농도에 대하여 125 피코리터의 부피 중에 50 마이크론²의 면적에 걸쳐서 22 fmol cm⁻²의 항체 밀도를 사용한다. 본 출원인의 100nM 및 200nM의 초기 농도 [Ant₀]은 이것보다 실질적으로 더 크다.

[0221]

형광 측정은 바탕 노이즈를 최소화하기 위해서 [Ant₀] = 0의 용액에서 행해져야 한다. 본 출원인은 k_{off} 를 측정하는 동안 변수로서 형광 진폭을 측정한다. 항체 결합된 항원이 항원 무함유 용액에 노출됨에 따라 형광이 감소한다. 일반적으로, 커버슬립을 사용할 때 $t = 0$ 에서 [Ab.Ant]를 측정하는 것은 어려운데, 항원 무함유 용액을 커버슬립 위로 계속 흘리면서 항원 무함유 용액으로 덮인 커버슬립을 적합한 리더에 로딩하려면 유한한 양의 시간이 걸리기 때문이다. 본 발명에서는 약 1분 간격으로 항체에 결합된 형광 표지된 항원의 형광을 측정함으로써 결합된 항체 농도를 샘플링한다. 모던 마이크로어레이 리더(예를 들어, ArrayIt InnoScan 700, TeleChem International, Inc., 서니베일, 캘리포니아)는 10 마이크론 해상도로 1분에 25 x 24mm 면적을 스캔하며, 이것은 50 마이크론 항체 부착부에 아주 충분하다.

[0222]

예를 들어, NQ2-12.4에 결합된 phOX 항원은 아주 빠르게 감소하며, 샘플링을 예상할 때 형광 붕괴 시간이 가장 빠르므로, 본 발명에서 측정하기 가장 어려운 항체 중 하나이다. 더 강한 항체는 몇 차수 더 큰 붕괴 시간을 가질 것이다. 마이크로어레이 리더는 약 1분에 약 230,000개 항체 스폿을 이미지화하므로, 모든 스폿을 연속적으로 또는 즉시 이미지화하는 것은 불가능할 것이다. 본 발명은 신호가 3배 감소한 것을 샘플링한다. 전형적인 형광 측정값은 디지털 값으로 0.39초까지 736, 1.39초까지 137, 그리고 2.39초까지 26이다.

[0223]

본 시뮬레이션에서 본 출원인은 측정된 데이터 $meas$ 를 지수 붕괴에 대한 잘 알려진 식 $meas = Ae^{-k_{off}t}$ 에 대입했다. 상기 데이터와 Mathematica(Wolfram Research Inc., 샴페인, 일리노이)의 비선형 변수 추산 특징을 사용하여, A는 1427, k_{off} 는 0.028 sec⁻¹로 계산된다.

[0224]

실시예 10: NimbleGen 올리고뉴클레오티드 패드와 454 6각형 웰의 정렬

[0225]

이 실시예는 상기 구체에 2 및 구체에 4에 적용된다. NimbleGen 올리고뉴클레오티드 어레이는 13 마이크론 x 13 마이크론 크기의 지그재그형 올리고뉴클레오티드 패드를 함유한다. 지그재그 형태란, 예를 들어 교대하는 모양의 체스판을 의미하며, 검은색 사각형이 엇갈려 있다. NimbleGen 어레이와 PicoTiterPlate(PTP) 6각형 웰을 결합시키면, 일부 올리고뉴클레오티드 패드는 마이크로웰에 완전히 노출되고, 다른 것들은 마이크로웰 벽에 매립되거나 다수의 마이크로웰에 노출될 것이다. 본 발명에서 NimbleGen 올리고뉴클레오티드 어레이와 PTP 6각형 웰을 사용하여 작업하기 위해서는, 다수의 웰이 적어도 2개의 패드를 함유하고, 패드의 대부분이 노출되도록

해야 한다.

[0226] 본 출원인은 중심 간 거리가 50 마이크로미터이고, 직경, 즉 마주한 벽 사이의 거리가 44 마이크로미터인 100 x 100 6각형 웰을 구성하여 시플레이션을 수행했다. 중심 간 거리가 1 마이크로미터인 포인트 격자를 각 6각형 웰 위에 놓고, 각 6각형 내부에 포인트가 들어간 것만을 선택했다. 각 선택된 6각형 웰에 대해서, 그것을 함유한 특유한 패드 내의 포인트의 수(그것의 위치를 각 패드의 크기로 나눔으로써 계산된다)는 검증하였다. 각 포인트를 처리하여, 각 웰에 대해 그것이 함유한 패드와 각 패드 내의 포인트의 수가 목록화된 데이터베이스를 얻었다. 패드 내의 포인트의 최대 수를 알고 있으므로, 각 웰 내부의 각 패드의 단편을 컴퓨터 계산했다.

[0227] 각 웰은 적어도 6개의 패드를 함유했다. 각 웰에서 최대 단편을 가진 6개의 패드를 선택하여 10,000 x 6 어레이를 만들었다. 이것이 6개 개수의 10,000개 샘플이라고 생각하면, 6개 단편의 평균과 표준편차는, 제 1 평균은 1이고, 표준편차는 0; 제 2 평균은 0.99이고, 표준편차는 0.02; 제 3 평균은 0.93이고, 표준편차는 0.07; 제 4 평균은 0.81이고, 표준편차는 0.11; 제 5 평균은 0.51이고, 표준편차는 0.15; 그리고 제 6 평균은 0.4이고, 표준편차는 0.15이다.

[0228] 모든 웰은 적어도 하나의 완전한 패드를 함유했으며, 99%는 적어도 2개의 지그재그형 패드를 함유했다. 따라서, NimbleGen 올리고뉴클레오티드 어레이와 PTP 6각형 웰을 사용한 본 구체예에서는 분포된 세포의 99%에서 중쇄와 경쇄를 DNA 텍을 사용하여 디지털 방식으로 매치시킬 수 있다.

[0229] **실시예 11: 저 용융점 아가로스로 코팅된 유리 슬라이드**

[0230] 이 방법은 로봇형 마이크로어레이 스포터(예를 들어, SpotBot 2, TeleChem, International, 서니베일, 캘리포니아)를 이용할 때 유용하다. 1% 저 용융점 아가로스(Invitrogen Corp., 칼스바드, 캘리포니아) 용액을 정제수에 용해하고, 70°C에서 유리 슬라이드 표면 위에 붓는다(슬라이드당 2.0mL). 아가로스가 겔화되면 슬라이드를 공기 중에서 건조시킨다. 건조된 슬라이드를 마이크로어레이 스포팅 장치에 설치하고, 온수(예를 들어, 70°C)를 아가로스 위에 디스펜스한다. 아가로스를 녹이고 온수로 씻어낸다. 홀 패턴이 만들어지는데, 상기 홀은 마이크로어레이 스포터의 허용도 만큼 재현가능하다(SpotBot 2에 대해서 약 10%). 일단 상기 홀이 형성되어 세정되면, 동일한 마이크로어레이 스포터를 사용하여 다른 분자를 홀 안에 스폿 형태로 부착할 수 있다. 정렬 오차가 있다면, 아가로스는 마이크로어레이 니들에 낮은 저항성을 부여한다. 최종 결과는 온수 주사 과정에 의해서 크기가 제어된 홀과 유리에 부착된 검출 분자의 균일한 코팅이다. 유리 위에 코팅되는 분자는, 예를 들어 올리고뉴클레오티드, 단백질, 항체, 또는 포착 분자, 또는 둘 이상의 올리고뉴클레오티드, 단백질, 항체, 또는 포착 분자의 혼합물일 수 있다.

[0231] 특유한 올리고뉴클레오티드 텍의 생성과 mRNA와 PCR 프라이머에 상보하는 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드로의 통합.

[0232] mRNA에 상보하는 올리고뉴클레오티드 어레이를 제작하는 한 방법에서는 합성된 올리고뉴클레오티드를 이용한다. 이를테면 각각 특유한 텍을 가진 40,000개 이상의 올리고뉴클레오티드를 갖는 어레이를 생각하면 이것은 곤란하다. 특유한 텍을 가진 40,000개의 올리고뉴클레오티드를 생산하는 효과적인 방법은 다음을 포함한다:

- [0233] a) 포스페이티기로 종결되지 않는 200개의 특유한 올리고뉴클레오티드의 합성;
- [0234] b) 포스페이티기로 종결되는 또 다른 200개의 특유한 올리고뉴클레오티드의 합성;
- [0235] c) 단계 (a)의 올리고뉴클레오티드와 단계 (b)의 올리고뉴클레오티드의 라이게이션. 단계 (a)의 올리고뉴클레오티드는 포스페이티기가 없기 때문에 서로 라이게이션될 수 없음이 유지된다. 유사하게, 단계 (b)의 올리고뉴클레오티드는 여분의 포스페이티기 때문에 서로 라이게이션될 수 없다;
- [0236] d) 단계 (c)의 올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머의 라이게이션;
- [0237] e) 단계 (d)의 올리고뉴클레오티드와 mRNA에 상보하는 영역의 라이게이션;

[0238] 40,000개 패드의 값은 단지 예시이며, 마이크로어레이의 크기에 대한 추가의 제한을 의도하지 않는다. 저 용융점 아가로스로 코팅된 유리 슬라이드를 함께 사용한 이 실시예는 구체예 5의 비용이 적게 드는 예를 제공한다.

[0239] **실시예 12: DNA 칩과 사전제작된 웰의 정렬**

- [0240] SU-8 포토레지스트(MicroChem Corporation, 뉴턴, 매사추세츠)를 제조자의 권고에 따라서 10cm 실리콘 웨이퍼 위에 스핀-코팅했다. 50 마이크론 큐브형 마이크로웰 패턴을 제조자의 권고에 따라서 마스크 정렬기(SUSS MicroTec AG, 뮌헨 디 85748 가칭 비. 슬레이브헤이머 스트라세 90)에서 자외선에 노출시키고, SU-8 현상기(MicroChem)에서 현상했다. 제조자의 권고에 따라서 폴리디메틸실록산(Sylgard Elastomer, Ellsworth Adhesives, 저먼타운, 위스콘신)을 혼합하고 경화시킨 다음 제거했다. 레이저 칼날을 사용하여 205 x 154 마이크로웰 어레이(31,570 마이크로웰)로 잘라내어 하부 트레이(도 5)를 형성하고, 건조된 깨끗한 현미경 슬라이드 위에 놓자, 유리 슬라이드와 소수성 결합을 형성했다. 마이크로웰의 치수와 위치는 DNA 칩(385K CGH 어레이, Roche/Nimblegen, 메디슨, 위스콘신) 상의 올리고뉴클레오티드 패드의 위치 및 크기와 정확히 매치했다. 이 DNA 칩이 마이크로웰의 상부를 형성하는데(도 6), 대부분의 웰이 DNA 바로 밑에 위치되고 대부분의 웰 벽이 베어 유리와 접촉되도록 마이크로웰 위에 위치시켰다. 이렇게 작은 마이크로웰이 사용될 경우, PDMS 웰 위에 DNA 슬라이드의 배치, 정렬, 및 밀봉은 섬세한 작업이기 때문에, 마스크 정렬기나 주문제작 구축 장치와 같은 기계적인 지원이 일반적으로 필요하다.
- [0241] 이용가능한 마스크 정렬기의 한 예는 SUSS MicroTec AG(뮌헨 디 85748 가칭 비. 슬레이브헤이머 스트라세 90)의 MJB4 4인치 수동 마스크 정렬기이다. 유리 슬라이드가 4" 사각형 석영판에 마일라 테이프로 고정되고, 정렬기의 마스크 진공 척에 삽입된다. PDMS가 유사한 판에 고정되어 웨이퍼 척에 삽입된다. 광학에 의해 정렬기 상의 이용가능한 컨트롤을 움직여 두 표면을 정렬시킨다. 일단 정렬되면, PDMS를 제거하고, DNA 슬라이드와 웰들이 확실히 정렬될 때까지 과정을 계속한다. 이 시점에서 PDMS를 정렬기에 재삽입하여 두 표면(DNA와 PDMS)이 접촉하도록 배치하고, 전체 조립체를 몇 분간만 방치하여 항체 mRNA로부터 cDNA를 구성한다.
- [0242] 이 과정을 수행할 수 있지만, 다음과 같은 몇 가지 단점이 있다: 1) 정렬되는 요소들을 사람과 장비가 쉽게 접근할 수 없는 UV 보호 영역 안에 밀어 넣어야 한다; 2) 웰의 맨 위에 부착된 반드시 물기가 있는 세포 현탁액으로부터 나오는 과량의 유체를 처리할 공간이 매우 적다; 그리고 3) 정렬기에 필요하지 않은 고가의 부품들이 있다.
- [0243] 본 시스템은 소량의 유체를 함유할 수 있고, 실험자와 장비가 쉽게 접근할 수 있으며, 기능들을 줄여서 비용이 절감되도록 설계된 주문제작 정렬기와 함께 더 효과적으로 사용될 수 있다. 주문제작 정렬기(500)의 예가 도 9에 도시된다. 4개의 수직 포스트(502)가 알루미늄 베이스 플레이트(501)에 나사로 고정되어 알루미늄 테이블(503)을 지지한다. 알루미늄 테이블(503) 위에 하부 압력판(504)이 놓인다. 제 1 플라스틱 삽입체(505)와 제 2 플라스틱 삽입체(506)가 하부 압력판(504)과 상부 압력판(507) 사이에 끼워 넣어진다.
- [0244] 진공 포트(508)가 하부 압력판(504)과 플라스틱 삽입체(505)를, 그리고 상부 압력판(507)과 플라스틱 삽입체(506)를 밀접하게 접촉시킨다. 하부 트레이가 유리 현미경 슬라이드(510) 위에 배치된 마이크로웰(511)을 포함하며, 이 트레이는 추가의 진공 포트(509)에 의해서 플라스틱 삽입체(505)의 맨 윗면에 단단히 고정된다. 유사하게, 현미경 슬라이드(510)와 동일한 치수를 갖는 DNA 칩(512)이 추가의 진공 포트(513)에 의해서 플라스틱 삽입체(506)의 바닥면에 단단히 고정된다.
- [0245] 하부 진공을 해제하여, 하부 마이크로웰(511)과 유리 슬라이드(510)를 플라스틱 삽입체(509)에 대해 슬라이드 방식으로 움직여 두 축에서 주의 깊게 이동시킬 수 있다. 일단 웰(511)이 최적 정렬되면, 진공 포트(509)에 진공을 적용하여 슬라이드(510)가 움직이지 않도록 한다. 소형 컴퓨터 인터페이스 현미경(도시하지 않음)을 알루미늄 테이블(503) 아래에 배치하여 장치(500)의 위로 플랫폼드 광을 들여보내 웰 안의 세포를 이미지화한다.
- [0246] 일단 정렬되면, 플라스틱 삽입체(509) 위에 표식을 배치하여 슬라이드(510)의 위치를 기록한다. 또는 달리, 유리 슬라이드(510) 옆에 물체를 배치하여 슬라이드(510)의 위치를 기록한다. 마이크로웰(511)과 유리 슬라이드(510)를 제거하여 가공한 후, 10 마이크론의 위치 정확도 내에서 정렬 장치(500)에 재삽입할 수 있다. 10 마이크론의 정확도는 칩(512) 상의 특정 어드레스가 마이크로웰(511)의 특정 어드레스와 정확히 매치되도록 마이크로웰(511)과 DNA 칩(512)을 정확히 정렬하는데 충분한 것으로 판명되었다.

[0247] **실시예 13: 마이크로웰 설계에 숫자 코드의 삽입**

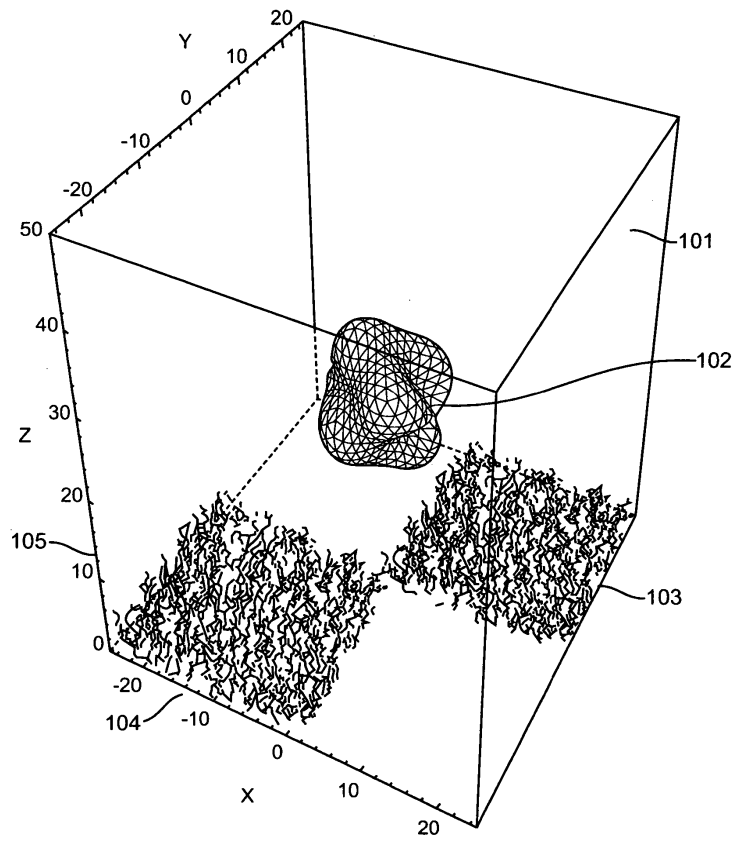
[0248] 정렬하여 처리하는 동안, 중간 파워 현미경(예를 들어, 100x) 아래에서 마이크로웰, 또는 마이크로웰 안의 세포를 시험하는 것이 주로 유용하다. 현미경의 시야는 마이크로웰을 전부 포함하기 어렵다. 따라서, 실시간으로 또는 캡처된 이미지로부터 이후에, 단일 현미경 이미지를 시험함으로써 웰에서 보이는 것을 정확히 아는 것은 어렵다. 가장자리나 코너로부터는 웰을 카운트하지 않으므로써 웰에서 보이는 것을 정확히 아는 것이 바람직할

수 있다.

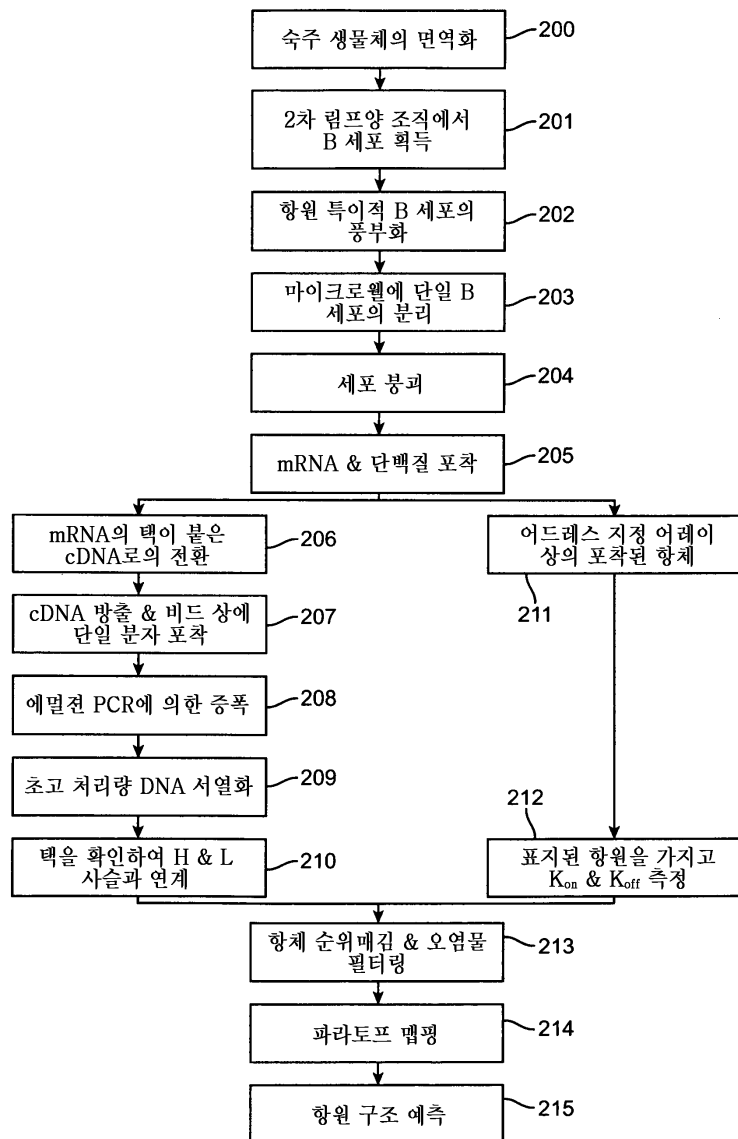
- [0249] 이 목적을 위해서, 특정한 모양(도 10)과 같은 암호화된 모양이 웰에 삽입될 수 있다. 이 모양은 다음 3가지의 제약사항을 잘 만족해야 한다: 1) 이 모양들은 에폭시 코팅된 웨이퍼가 그 모양을 쉽게 재생할 수 있고, 계속해서 에폭시 코팅된 웨이퍼로부터 취해진 PDMS 자국에서 그 모양을 알아볼 수 있을 만큼 충분히 상이해야 한다; 2) 세포가 대략 동일한 미소환경을 경험하도록 웰 부피가 웰마다 실질적으로 달라서는 안 된다; 그리고 3) 벽 두께는 PDMS 구조를 약화시킬 만큼 감소되지 않는다. 8각형의 조각들이 이들 제약사항 사이에서 좋은 균형을 이루었다. 8각형 조각들은 대칭 또는 비대칭 조각으로 분리했고, 도 10의 모양에 사용했다.
- [0250] 이 실시예에서는 4 x 4 블록의 웰을 선택했는데, 본 출원자의 실험실 현미경 아래의 시야에 이 16개의 웰을 잘 배치할 수 있었기 때문이다. 도 10에 관해, 16개 웰 블록(600)은 웰의 모양에 3개의 숫자, 즉 1) 열 번호; 2) 행 번호; 및 3) 패턴 번호를 삽입하기 위해 8각형 조각을 사용한 것의 예이다. 이 실시예에서, 최대 64개의 열과 행이 있으며, 각각은 0에서 63까지 번호가 매겨진다. 블록마다 각 열과 행에 4개의 웰이 있으므로, 이 실시예는 패턴의 모든 열 또는 행에서 최대 256개의 웰에 어드레스를 부여한다. 2진법 표시를 사용하여 열과 행 번호를 암호화한다. 컴퓨터 문헌에 잘 알려져 있는 대로, 0에서 63까지의 값을 암호화하려면 6개의 이진수가 필요하다. 대칭 웰은 열 및 행 1 및 0들을 표시하는데 사용된다. 예를 들어, 도 10에서, 웰(605)는 1이고, 웰(607)은 0이다.
- [0251] 비대칭 웰은 블록의 코너에 사용된다. 웰(601)은 시작점과 시작 방향을 제공한다. 이에 더하여, 나머지 코너(602, 603 및 604)는 키랄성을 제공하는데, 즉 그 모양이 위나 바닥으로부터 보이는 좌측과 우측 현미경 이미지에 나타난 거울 이미지와 동일하지 않다. 따라서, 특정한 조망 방향을 전제하지 않은 상태에서 어떤 웰이 어떤 블록과 결합되는지 결정하기 위한 방법이 필요하다. 시작 웰이 아닌 블록의 세 코너는 블록의 중심을 가리키는 특유한 방향을 가진다. 이러한 방향이 2개 있으므로(예를 들어, 웰 602 및 603), 이 두 방향을 사용하여 이진수 1(웰 602)과 이진수 0(웰 603)을 표시함으로써 추가적인 정보를 암호화할 수 있다. 이 실시예에서는 웰 패턴이 각각 상이하고, 치수도 약간 다르므로, 상이한 경화 온도로 인한 PDMS 수축의 변동을 수용할 수 있다. 세 코너는 8개의 상이한 값, 즉 0에서 7까지를 암호화한다.
- [0252] 도 10에는 3개 값, 즉 칼럼(3), 열(4) 및 패턴(5)을 암호화한 블록이 도시된다. 이 블록은 먼저 야구경기의 홈플레이트 모양으로 설계된 비대칭 웰(601)을 찾아냄으로써 현미경의 시야에 위치된다. 웰(601) 방향에 있는 4개의 웰에 이어서, 웰(602)이 블록의 키랄성을 결정하며, 이 경우에는 좌측에 대해 키랄성을 가진다. 웰(603 및 604)에 의해 이 키랄성이 확인된다. 이에 더하여, 하이비트에서 시작하면, 웰(604, 603 및 602)은 10진법으로 표시되는 이진수(101)를 암호화하며, 이것이 웰 패턴(5)을 나타낸다.
- [0253] 행 코드는 하이비트(606)에서 시작하여 로우비트(605)에서 끝난다: 000011, 또는 행(3). 또한, 열 코드는 하이비트(608)에서 시작하여 로우비트(607)에서 끝난다: 000100, 또는 열(4).
- [0254] 이것은 단지 예시일 뿐이다. 이 모양들은 상이한 설계 및 재료를 수용할 수 있도록 쉽게 변할 수 있으며, 블록당 웰의 수, 크기 및 상대적 배열도 변할 수 있다.
- [0255] 상기 설명 및 첨부된 도면이 이후 청구항들의 범위에 들어가지 않는 어떤 추가의 내용을 개시하는 한에서, 본 발명이 일반대중에게 권리가 주어지는 것은 아니며, 추가의 발명들을 청구하는 하나 이상의 출원을 제출할 권리는 유보된다.
- [0256] 전술한 내용은 본 발명의 원리를 예시할 뿐이다. 이 분야의 통상의 기술자라면 본원에 명백히 설명되거나 나타내지 않았지만 본 발명의 원리를 구현하며 본 발명의 사상과 범위 내에 포함되는 다양한 구성들을 고안할 수 있다는 것이 인정될 것이다. 또한, 본원에 인용된 모든 예와 조건적인 표현은 기본적으로 본 발명의 원리와 추진 중인 기술에 대해 본 발명자가 제공하는 개념을 이해하는데 있어서 독자를 돕기 위한 것이며, 이러한 구체적으로 인용된 예와 조건에 제한되지 않는 것으로 해석된다. 또한, 본 발명의 원리, 양태, 및 구체예와 이들의 특정한 실시예를 인용하는 본원에서의 모든 언급은 이들의 구조적 등가물과 기능적 등가물을 모두 포함하도록 의도된다. 추가하여, 이러한 등가물은 현재 알려진 등가물과 앞으로 개발될 등가물들, 즉 구조에 관계없이 동일한 기능을 수행하도록 개발된 어떤 요소를 모두 포함하도록 의도한다. 따라서, 본 발명의 범위는 본원에 나타내고 설명된 예시적인 구체예에 제한되지 않는다. 오히려, 본 발명의 범위와 사상은 첨부된 청구항들에 의해서 구현된다.

도면

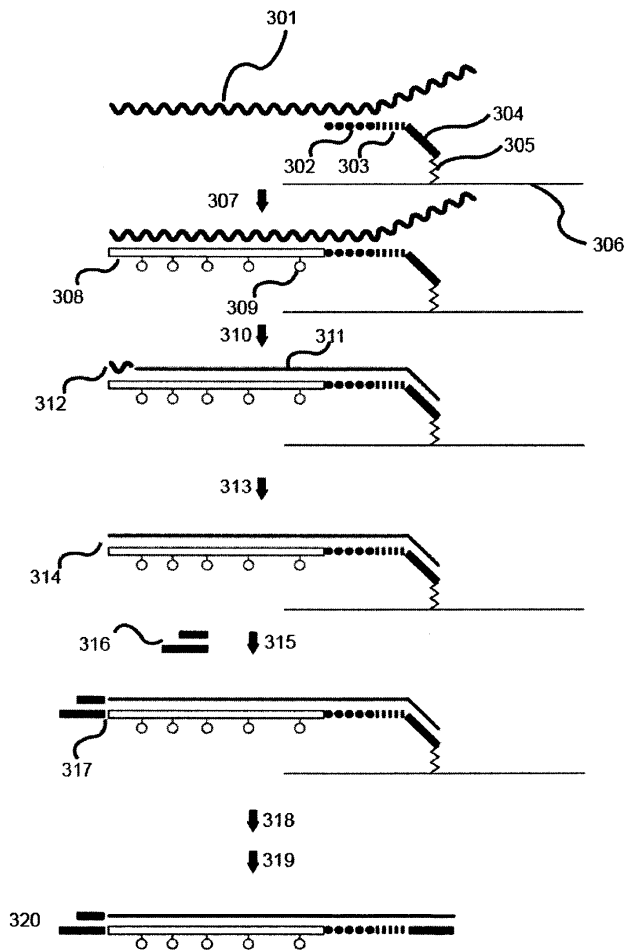
도면1



도면2

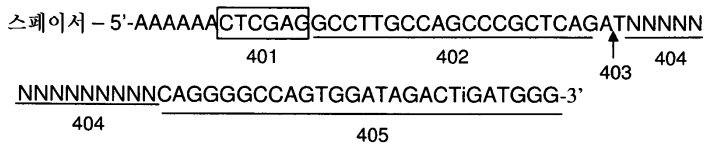


도면3

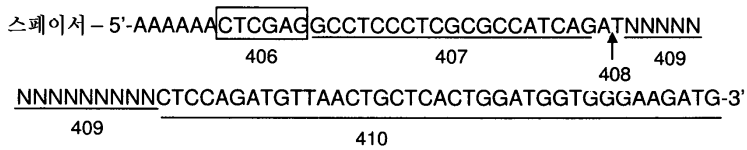


도면4

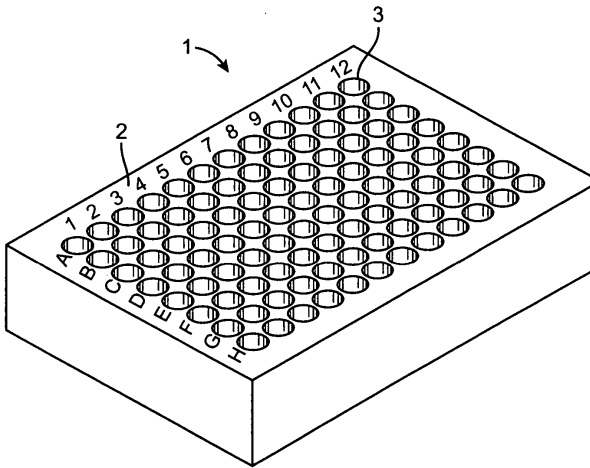
마우스 중쇄 올리고뉴클레오티드 프로브 (서열번호: 1)



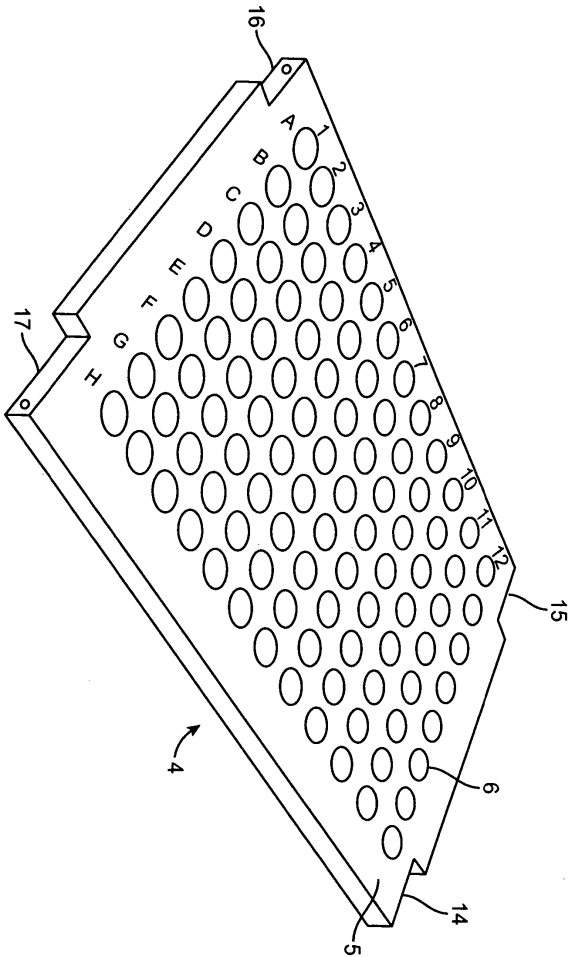
마우스 경쇄 올리고뉴클레오티드 프로브 (서열번호: 2)



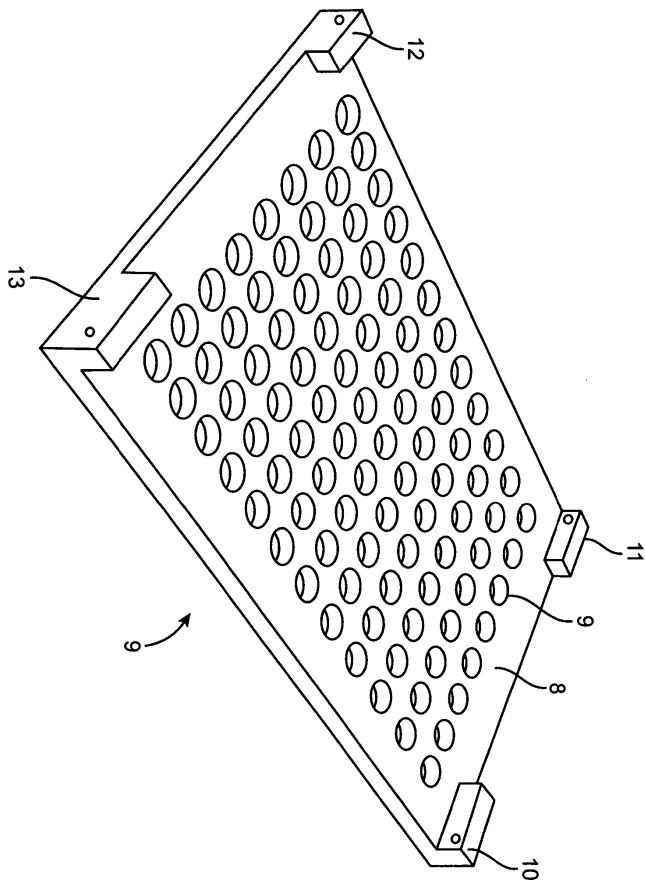
도면5



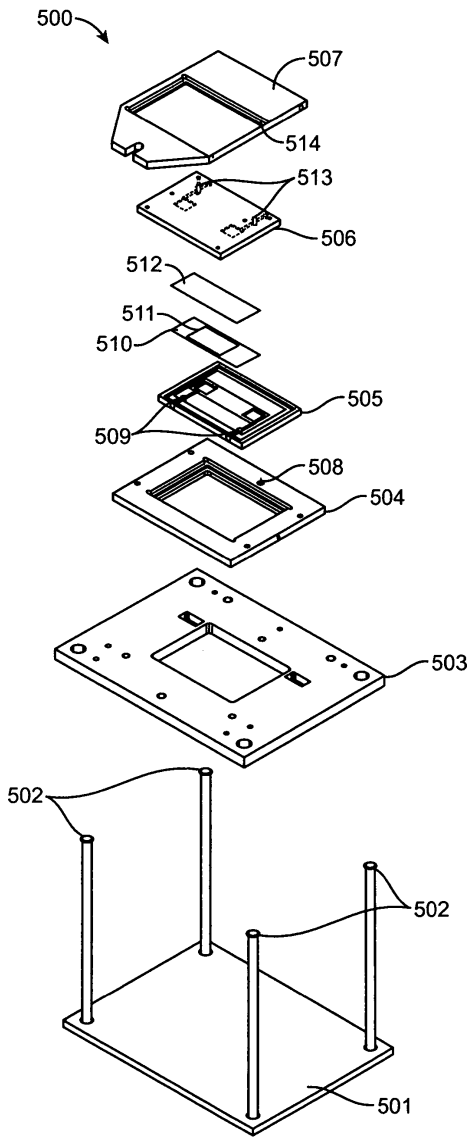
도면6



도면7



도면9



도면10

