

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年7月7日(2016.7.7)

【公表番号】特表2015-519900(P2015-519900A)

【公表日】平成27年7月16日(2015.7.16)

【年通号数】公開・登録公報2015-045

【出願番号】特願2015-514128(P2015-514128)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	1/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/071	(2010.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 N	1/02	
C 1 2 N	5/00	2 0 2 A
G 0 1 N	37/00	1 0 1
G 0 1 N	37/00	1 0 2
C 1 2 M	1/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月20日(2016.5.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法において、

前記複数の粒子を個別の反応容積に捕捉して、それぞれが1つの粒子のみを含有する複数の個別の反応容積を生成するステップと、

それぞれ個別の反応容積内にある各粒子に対して複数の反応を行って、各粒子ごとに複数の反応生成物を生成し、少なくとも1種の反応生成物が、標的核酸に添加されかつ前記反応生成物の供給源であった前記反応容積の同一性をコード化するヌクレオチド配列を含んでいるサブステップ、および

前記反応生成物を解析して、結果を得るサブステップ  
を含む、各粒子ごとに複数のパラメーターをアッセイするステップと、

前記アッセイの結果を各粒子に関連付けて、個別の反応容積内にある前記複数の粒子中の各粒子ごとに複数のパラメーターを含むデータ集合を生成するステップと  
を含む、複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法。

【請求項2】

前記パラメーターの少なくとも1つが、それぞれ個別の反応容積内でアッセイされる、  
請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記個別の反応容積の内容物が回収される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

それぞれ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積

の総数の少なくとも 35 %であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記粒子が、前記複数の反応を行うための 1 種または複数種の試薬を添加する前に、個別の反応容積に捕捉される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記粒子が細胞である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

40,000 個よりも少ない粒子が前記方法で用いられる、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

個別の反応容積内に分布した粒子の数が 10 個よりも多く、100 個よりも多く、または 1000 個よりも多い、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記捕捉するステップが、限界希釈により行われる、請求項 1 から 3 または 5 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

限界希釈が、

粒子懸濁液の連続希釈物を調製するステップと、

各希釈物から、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に粒子を分布させるステップと、

各コンパートメント内の粒子の数を決定するステップと、

個別の反応容積に単粒子を捕捉する際に使用される、単粒子のみ含む最も多い数のコンパートメントを生成する希釈物を選択するステップと

を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

各コンパートメント内の粒子の数が、明視野顕微鏡法または蛍光顕微鏡法により決定される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記捕捉するステップが、マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位での機械的捕捉を含む、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

各捕捉部位が、

1 つの粒子のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、

前記捕捉形体が粒子によって占有されていない場合に、前記捕捉部位内に前記流体を流すことが可能なドレイン形体と

を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記マイクロ流体デバイスが、粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

親和性に基づく捕捉を含み、かつ粒子成分に結合する結合パートナーを用いる、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記結合パートナーが、前記マイクロ流体デバイスの別々の領域に添着され、それぞれ別々の領域は 1 つの粒子のみを結合可能にする、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記親和性に基づく捕捉が、

マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位に前記結合パートナーを含む支持体を捕捉して、各捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであり、それぞれ固定化された支持体が、1つの粒子のみをそれぞれ固定化された支持体に結合可能とするように結合パートナーを呈示するステップと、

粒子を、前記固定化された支持体上の前記結合パートナーに結合するステップとを含む、請求項1\_6に記載の方法。

【請求項 1\_9】

前記支持体が、機械的捕捉によって捕捉される、請求項1\_8に記載の方法。

【請求項 2\_0】

各捕捉部位が、

1つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、  
捕捉形体が支持体によって占有されていない場合に、前記捕捉部位内に前記流体を流す  
ことが可能なドレイン形体と  
を含む、請求項1\_8に記載の方法。

【請求項 2\_1】

前記マイクロ流体デバイスが、支持体および／または粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項1\_8に記載の方法。

【請求項 2\_2】

各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、  
請求項1\_3から1\_5および1\_7から2\_1のいずれかに記載の方法。

【請求項 2\_3】

前記個別の反応容積がマイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在し、  
それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を決定するステップと、  
粒子を含有しないまたは単粒子より多い粒子を含有する任意の反応容積からの結果を無  
視するステップと  
を含む、請求項 1 から 2\_2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2\_4】

前記回収するステップが、個別の反応容積から反応生成物を個別に回収するサブステッ  
プを含む、請求項 3 から 2\_3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2\_5】

前記回収するステップが、複数の個別の反応容積から反応生成物をプールするサブステッ  
プを含む、請求項 3 から 2\_3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2\_6】

前記少なくとも1種の反応生成物が、少なくとも2つの増幅プライマーを使用する核酸  
増幅を含む反応によって生成され、各増幅プライマーは、前記反応生成物の供給源であつ  
た前記反応容積の同一性をコード化するバーコード配列とバーコード配列の組合せを含む  
、請求項 1 から 2\_5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2\_7】

前記核酸増幅が、1対のインナープライマーおよび1対のアウタープライマーを使用し  
、

前記インナープライマーは、

第1のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および標的特異的部分を  
含む順方向インナープライマーと、

標的特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列および第2のヌクレオチドタグを  
含む逆方向インナープライマーと

を含み、

前記アウタープライマーは、

第2のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方  
向アウタープライマーと、

第2のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーと  
を含み、

前記アウタープライマーは前記インナープライマーよりも過剰であり、

核酸増幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3' を含むアンプリコンを生成する、

請求項2\_6に記載の方法。

#### 【請求項2\_8】

前記核酸増幅が、1対のインナープライマーと、1対のスタッファーブライマーと、1対のアウタープライマーとを使用し、

前記インナープライマーは、

第1のヌクレオチドタグおよび標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと、  
標的特異的部分および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーとを含み、

前記スタッファーブライマーは、

第3のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向スタッファーブライマーと、

第2のヌクレオチドタグ特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列、第4のヌクレオチドタグを含む逆方向スタッファーブライマーとを含み、

前記アウタープライマーは、

第2のバーコードヌクレオチド配列および第3のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと、

第4のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーと  
を含み、

前記アウタープライマーは、前記インナープライマーよりも過剰な前記スタッファーブライマーよりも過剰であり、

前記核酸増幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第3のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第4のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3' を含むアンプリコンを生成する、

請求項2\_6に記載の方法。

#### 【請求項2\_9】

前記個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントであり、前記個別のコンパートメントが、行および列によって画定されたアレイとして並べられており、各アンプリコンにおける前記第1および前記第2のバーコードの組合せが、前記アンプリコンの供給源であった前記コンパートメントの前記行および前記列を特定する、請求項2\_7に記載の方法。

#### 【請求項3\_0】

前記回収するステップが、行におけるまたは列におけるコンパートメントからアンプリコンをプールするサブステップを含む、請求項2\_9に記載の方法。

#### 【請求項3\_1】

前記アウタープライマーが、DNA配列決定プライマーにより結合することが可能な第1および第2のプライマー結合部位をさらに含み、前記核酸増幅が、5' - 第1のプライマー結合部位 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のプライ

マー結合部位 - 3' を含むアンプリコンを生成する、請求項 2\_7 に記載の方法。

【請求項 3\_2】

前記解析するステップが、前記増幅生成物を配列決定するサブステップを含む、請求項 3\_1 に記載の方法。

【請求項 3\_3】

前記複数の反応が無傷の粒子上で行われる、請求項 1 から 3\_2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3\_4】

前記複数の反応が、崩壊した粒子上で行われる、請求項 1 から 3\_3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3\_5】

前記複数の反応が、溶解した細胞上で行われる、請求項 3\_4 に記載の方法。

【請求項 3\_6】

前記粒子が、前記複数の反応を行う前に、生体応答を誘発する薬剤で処理される、請求項 1 から 3\_5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3\_7】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 つまたは複数の R N A 分子のヌクレオチド配列を決定するステップを含む、請求項 1 から 3\_6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3\_8】

前記解析の結果が、

表現型に相關する 2 つ以上のコピー数多型、

表現型に相關する 2 つ以上の突然変異、または

一緒にになって表現型に相關する、少なくとも 1 つのコピー数多型および少なくとも 1 つの突然変異

の存在を示す、請求項 1 から 3\_7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3\_9】

前記解析の結果が、ゲノム組換えの出現を示す、請求項 1 から 3\_8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4\_0】

前記解析の結果が、特定のスプライスバリエントの共発現を示す、請求項 1 から 3\_9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4\_1】

前記解析の結果が、B 細胞内での特定の軽鎖および重鎖の共発現を示す、請求項 1 から 4\_0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4\_2】

前記解析の結果が、特定の宿主細胞における特定の病原体の存在を示す、請求項 1 から 4\_1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4\_3】

基質上の捕捉部位に結合パートナーを含む支持体を捕捉して、前記捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであり、前記結合パートナーが粒子成分に結合し、前記固定化された支持体が、それぞれ固定化された支持体に 1 個の粒子のみを結合可能にするように前記結合パートナーを呈示するステップと、

前記固定化された支持体上で前記結合パートナーに粒子を結合するステップとを含む、単粒子を単離する方法。

【請求項 4\_4】

前記捕捉するステップが、支持体の機械的捕捉を含む、請求項 4\_3 に記載の方法。

【請求項 4\_5】

前記捕捉部位が、

1 つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、

前記捕捉形体が支持体によって占有されない場合に、前記捕捉部位内に流体を流すこと

が可能なドレイン形体と  
を含む、請求項4 3に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記基質が、流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項4 3に記載の方法。  
。

【請求項 4 7】

前記基質が複数の捕捉部位を含む、請求項4 3から4 6のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、  
請求項4 7に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記粒子を含む溶液を、前記マイクロ流体デバイスの前記コンパートメント内に通すス  
テップを含み、それによって前記コンパートメントの 35 %以上が単粒子のみを含む、請  
求項4 8に記載の方法。

【請求項 5 0】

複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法において、

前記複数の粒子を個別の反応容積に捕捉して、それぞれが 1 つの粒子のみを含有する複  
数の個別の反応容積を生成し、それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測さ  
れる割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 35 %であるようにするステップと、  
それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を決定するステップと、

それぞれ個別の反応容積内にある各粒子ごとに複数のパラメーターをアッセイするステ  
ップであって、前記パラメーターの少なくとも 1 つが、それぞれ個別の反応容積内でアッ  
セイされ、前記アッセイするステップが、

それぞれ個別の反応容積内にある各粒子に対して複数の反応を行って、それぞれ個別の  
反応容積内にある各粒子ごとに複数の反応生成物を生成するサブステップであって、  
少なくとも 1 種の反応生成物が、少なくとも 2 つの増幅プライマーを使用する核酸增  
幅を含む反応によって生成されるアンプリコンであり、各増幅プライマーはバーコード配  
列を含み、

前記個別の反応容積はマイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントであり、前記  
個別のコンパートメントは行および列によって画定されたアレイとして並べられており、  
各アンプリコンにおける前記第 1 および前記第 2 のバーコードの組合せが、前記アンプリ  
コンの供給源であった前記コンパートメントの前記行および前記列を特定する、

サブステップと、

行におけるまたは列におけるコンパートメントから反応生成物をプールすることによっ  
て前記個別の反応容積の内容物を回収するサブステップと、

前記反応生成物を解析して結果を得るサブステップと、

粒子を含有しないまたは単粒子より多い粒子を含有する任意の反応容積からの結果を無  
視するサブステップと、

を含み、

前記方法は更に、

前記アッセイの残りの結果を、1 つの粒子のみを有する各個別の反応容積に関連付けて  
、個別の反応容積内にある前記複数の粒子中の各粒子ごとに複数のパラメーターを含むデ  
ータ集合を生成するステップ、

を含む、方法。

【請求項 5 1】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積  
の総数の少なくとも 50 %であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップを  
さらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積

の総数の少なくとも 6 5 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 8 5 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記粒子が、前記複数の反応を行うための 1 種または複数種の試薬を添加する前に、個別の反応容積に捕捉される、請求項 5 0 から 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

前記粒子が細胞である、請求項 5 0 から 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

前記粒子が、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの組合せから選択される、請求項 5 0 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

4 0 , 0 0 0 個よりも少ない粒子が前記方法で用いられる、請求項 5 0 から 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 8】

1 0 , 0 0 0 個よりも少ない粒子が前記方法で用いられる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

個別の反応容積内に分布した粒子の数が 1 0 個よりも多く、1 0 0 個よりも多く、または 1 0 0 0 個よりも多い、請求項 5 0 から 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 0】

前記捕捉するステップが、限界希釈を含む方法により行われる、請求項 5 0 から 5 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 1】

限界希釈が、

粒子懸濁液の連続希釈物を調製するステップと、

各希釈物から、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に粒子を分布させるステップと、

各コンパートメント内の粒子の数を決定するステップと、

個別の反応容積に単粒子を捕捉する際に使用される、単粒子のみ含む最も多い数のコンパートメントを生成する希釈物を選択するステップと

を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

各コンパートメント内の粒子の数が、明視野顕微鏡法または蛍光顕微鏡法により決定される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

染色剤、色素または標識を用いて、それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を検出する、請求項 6 1 に記載の方法。