

【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30年8月2日(2018.8.2)

【公表番号】特表2017-522867(P2017-522867A)

【公表日】平成29年8月17日(2017.8.17)

【年通号数】公開・登録公報2017-031

【出願番号】特願2016-575111(P2016-575111)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2018.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/071	(2010.01)
C 0 7 K	16/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/071	
C 0 7 K	16/00	

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月25日(2018.6.25)

【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】

個々の細胞または細胞集団を特徴付ける方法であって、

(a) 1つまたは複数の細胞表面特徴結合基を有する細胞を、前記1つまたは複数の細胞表面特徴結合基からの1つの細胞表面特徴結合基を前記細胞と結合させるのに十分な条件下でインキュベートすることであって、前記1つまたは複数の細胞表面特徴結合基のうちの各細胞表面特徴結合基が、レポーターオリゴヌクレオチド配列を含むレポーターオリゴヌクレオチドと結合すること、

(b) 前記細胞を各々がバーコード配列を含む配列を含む複数のオリゴヌクレオチドを含む区分に区分すること、

(c) 前記バーコード配列および前記レポーターオリゴヌクレオチドを使用して、(i)前記バーコード配列またはその相補体、および(ii)前記レポーターオリゴヌクレオチド配列またはその相補体を含む核酸分子を生成することと  
と含む、方法。

【請求項2】

前記1つまたは複数の細胞表面特徴結合基が、1つまたは複数の抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記1つまたは複数の細胞表面特徴結合基が、1つまたは複数の抗体断片である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記核酸分子を配列決定して、前記細胞を特徴づけることをさらに含む、請求項1に記

載の方法。

【請求項 5】

前記複数のオリゴヌクレオチドがビーズに結合され、前記区分が前記ビーズをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、各々が前記バーコード配列を含む少なくとも 100 万のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記区分が液滴である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記区分がウェルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

(c) が前記区分中で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記液滴から前記核酸分子を放出することまたは除去することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記核酸分子を、前記液滴から前記核酸分子を放出することまたは除去することの後の 1 つまたは複数の反応に供することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つまたは複数の反応は、ポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項 11 に記載の方法。

。

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数の反応は、シーケンサーのフローセルへの付着を可能にするように構成された 1 つまたは複数の機能配列の添加を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ビーズはゲルビーズである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸分子を配列決定して、前記バーコード配列またはその相補体および前記レポーターオリゴヌクレオチド配列またはその相補体を識別することであって、前記オリゴヌクレオチド配列またはその相補体が、前記細胞表面特徴結合基が特異的である細胞表面特徴を識別し、前記バーコード配列またはその相補体が前記細胞を識別する、ことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞表面特徴が、細胞表面タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記複数のオリゴヌクレオチドの各々が識別子配列を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドの各々オリゴヌクレオチドの前記識別子配列が、前記複数のオリゴヌクレオチドの他のオリゴヌクレオチドの識別子配列と異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記複数のオリゴヌクレオチドの各々が、前記レポーターオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記レポーターオリゴヌクレオチドの配列に相補的な前記配列は、ポリチミン(ポリ T)配列であり、前記レポーターオリゴヌクレオチドがポリアデニン(ポリ A)配列を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

(c) の生成することが、核酸伸長反応を行うことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

(c) の生成することが、核酸增幅反応を行うことを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 22】**

(c) の生成することが、逆転写反応を行うことを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 23】**

(c) の生成することが、テンプレートスイッチング反応を行うことを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 24】**

少なくとも (a) において、前記細胞表面特徴結合基は、前記レポーターオリゴヌクレオチドに共有結合性に付着される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 25】**

少なくとも (a) において、前記細胞表面特徴結合基は、前記レポーターオリゴヌクレオチドに非共有結合性に付着される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 26】**

少なくとも (a) において、前記レポーターオリゴヌクレオチドは、前記細胞表面特徴結合基が共有結合性に付着するオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項 25 に記載の方法。

**【請求項 27】**

前記バーコード配列を含む前記配列は、前記ビーズから放出可能である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 28】**

前記バーコード配列を含む前記配列は、ジスルフィド結合を介して前記ビーズに付着する、請求項 27 に記載の方法。

**【請求項 29】**

前記バーコード配列を含む前記配列は、化学刺激への暴露に際して、前記ビーズから放出可能である、請求項 27 に記載の方法。

**【請求項 30】**

(c) の前に、前記ビーズから、前記バーコード配列を含む前記配列を放出することをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

**【手続補正 2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の原理が利用される例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明、及び以下の添付の図面（本明細書の「Figure（図面）」及び「FIG.」）を参照することによって、本発明の特徴及び利点がより良く理解されることになる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目 1）

細胞から核酸を分析する方法であって、

（a）個々の細胞に由来する核酸を離散区分に提供することと、

（b）前記離散区分内の前記核酸に由来する 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列であって、共通の核酸バーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを結合させている前記 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列を生成することと、

（c）前記 1 つもしくは複数の第 1 の核酸配列または前記 1 つもしくは複数の第 1 の核酸配列に由来する 1 つもしくは複数の第 2 の核酸配列であって、共通のバーコード配列を含む前記 1 つもしくは複数の第 2 の核酸配列の特徴付けを行うことと、

（d）（c）で行われた前記特徴付けにおける前記共通の核酸バーコード配列の存在に少なくとも部分的に基づいて、前記個々の細胞に由来する前記 1 つもしくは複数の第 1 の

核酸配列または 1 つもしくは複数の第 2 の核酸配列を識別することと、を含む、前記方法。

(項目 2)

前記離散区分が離散液滴である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

(a)において、前記オリゴヌクレオチドが、前記個々の細胞に由来する前記核酸と前記離散区分と共に区分される、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

(a)において、少なくとも 10,000 の前記オリゴヌクレオチドが、前記離散区分に前記個々の細胞に由来する前記核酸と共に区分される、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

(a)において、少なくとも 100,000 の前記オリゴヌクレオチドが、前記離散区分に前記個々の細胞に由来する前記核酸と共に区分される、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

(a)において、少なくとも 500,000 の前記オリゴヌクレオチドが、前記離散区分に前記個々の細胞に由来する前記核酸と共に区分される、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

(a)において、前記オリゴヌクレオチドがビーズに付着されて提供され、ビーズ上の各オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含み、前記ビーズが前記離散区分に前記個々の細胞と共に区分される、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記オリゴヌクレオチドが前記ビーズに放出可能に付着している、項目 7 に記載の方法。

。

(項目 9)

前記ビーズが分解性ビーズを含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

(b)の前または最中に、前記ビーズの分解を介して前記ビーズから前記オリゴヌクレオチドを放出することをさらに含む、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

(c)の前に、前記離散区分から前記 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列を放出することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

(c)が、前記 1 つもしくは複数の第 1 の核酸配列または前記 1 つもしくは複数の第 2 の核酸配列を配列決定することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

前記 1 つもしくは複数の第 1 の核酸配列または前記 1 つもしくは複数の第 2 の核酸配列から、前記個々の細胞のゲノムの少なくとも一部の連続核酸配列をアセンブルすることをさらに含む、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 14)

前記個々の細胞が、前記個々の細胞の前記ゲノムの少なくとも一部の前記核酸配列に基づいて特徴付けされる、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 15)

前記核酸が、前記離散区分内の前記個々の細胞から放出される、項目 1 に記載の方法。

(項目 16)

前記核酸がリボ核酸 (RNA) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 17)

前記 RNA がメッセンジャー RNA (mRNA) である、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 18)

(b)が、前記 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列をもたらす条件下で前記核酸を逆転写させることをさらに含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目19)

前記逆転写が前記離散区分で生じる、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記オリゴヌクレオチドが、前記離散区分に提供され、かつポリT配列をさらに含む、項目18に記載の方法。

(項目21)

前記逆転写が、前記ポリT配列を前記核酸のそれぞれの少なくとも一部にハイブリダイズさせることと、前記ポリT配列をテンプレート指向の様式で伸長させることと、を含む、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記オリゴヌクレオチドが、前記ポリT配列のハイブリダイゼーションを促進するアンカー配列をさらに含む、項目21に記載の方法。

(項目23)

前記オリゴヌクレオチドが、ランダムプライミング配列をさらに含む、項目20に記載の方法。

(項目24)

前記ランダムプライミング配列がランダム六量体である、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記逆転写が、前記ランダムプライミング配列を前記核酸のそれぞれの少なくとも一部にハイブリダイズさせることと、前記ランダムプライミング配列をテンプレート指向の様式で伸長させることと、を含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記1つまたは複数の第1の核酸配列のうちの所与の1つが、前記核酸の所与の1つの少なくとも一部に対する配列相補性を有する、項目1に記載の方法。

(項目27)

前記離散区分が、複数の細胞の中で、最大でも前記個々の細胞のみを含む、項目1に記載の方法。

(項目28)

前記オリゴヌクレオチドが、固有の分子配列セグメントをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目29)

前記固有の分子配列セグメントの存在に少なくとも部分的に基づいて、前記核酸の所与の核酸に由来する前記1つもしくは複数の第1の核酸配列、または前記1つもしくは複数の第2の核酸配列の個々の核酸配列を識別することをさらに含む、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記固有の分子配列セグメントの存在に基づいて前記所与の核酸の量を決定することをさらに含む、項目29に記載の方法。

(項目31)

(c)の前に、前記1つまたは複数の第2の配列を生成するために、1つまたは複数の追加配列を前記1つまたは複数の第1の配列に追加することをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目32)

スイッチオリゴヌクレオチドを用いて、第1の追加核酸配列を前記1つまたは複数の第1の核酸配列に追加することをさらに含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記スイッチオリゴヌクレオチドが、前記1つまたは複数の第1の核酸配列の少なくとも一部にハイブリダイズさせ、前記第1の追加核酸配列を前記1つまたは複数の第1の核酸配列に結合させるためにテンプレート指向様式で伸長する、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記第1の追加核酸配列に結合する前記より多くの第1の核酸配列のうちの1つを増幅させることをさらに含む、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記増幅が前記離散区分で生じる、項目34に記載の方法。

(項目36)

前記増幅が、前記第1の追加核酸配列に結合する前記1つまたは複数の第1の核酸配列を前記離散区分から放出した後に生じる、項目34に記載の方法。

(項目37)

前記増幅後に、前記1つまたは複数の第2の核酸配列を生成するために、前記第1の追加配列に結合する前記1つまたは複数の第1の核酸配列に1つまたは複数の第2の追加核酸配列を追加することをさらに含む、項目34に記載の方法。

(項目38)

前記1つまたは複数の第2の追加配列の追加が、前記第1の追加核酸配列に結合する前記1つまたは複数の第1の核酸配列のそれぞれの一部を除去することと、前記1つまたは複数の第1の核酸配列に前記1つまたは複数の第2の追加核酸配列を結合させることと、を含む、項目37に記載の方法。

(項目39)

前記除去が、前記第1の追加核酸配列に結合する前記1つまたは複数の第1の核酸配列の剪断によって完了する、項目38に記載の方法。

(項目40)

前記結合が連結によって完了する、項目39に記載の方法。

(項目41)

(c)の前に、1つまたは複数のRNA断片を生成するために、前記1つまたは複数の第1の核酸配列を転写させることをさらに含む、項目18に記載の方法。

(項目42)

前記転写が、離散区分からの前記1つまたは複数の第1の核酸配列の放出後に生じる、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記オリゴヌクレオチドが、T7プロモーター配列をさらに含む、項目41に記載の方法。

(項目44)

(c)の前に、前記1つまたは複数のRNA配列のそれぞれの一部を除去することと、前記1つまたは複数のRNA配列に追加配列を結合させることと、をさらに含む、項目43に記載の方法。

(項目45)

(c)の前に、前記1つまたは複数の第2の核酸配列を生成するために、前記追加配列に結合する前記1つまたは複数のRNA配列を逆転写させることをさらに含む、項目44に記載の方法。

(項目46)

(c)の前に、前記1つまたは複数の第2の核酸配列を増幅させることをさらに含む、項目45に記載の方法。

(項目47)

(c)の前に、1つまたは複数のDNA配列を生成するために、前記1つまたは複数のRNA配列を逆転写させることをさらに含む、項目41に記載の方法。

(項目48)

(c)の前に、前記1つまたは複数の第2の核酸配列を生成するために、前記1つまたは複数のDNA配列のそれぞれの一部を除去することと、前記1つまたは複数のDNA配列に1つまたは複数の追加配列を結合させることと、をさらに含む、項目47に記載の方法。

(項目49)

(c) の前に、前記 1 つまたは複数の第 2 の核酸配列を增幅させることをさらに含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記核酸が、前記個々の細胞からの RNA の逆転写から生成された相補的 (cDNA) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記オリゴヌクレオチドがプライミング配列をさらに含む、離散区分に提供される、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記プライミング配列が、ランダム N 量体を含む、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

(b) が、前記ライミング配列を前記 cDNA にハイブリダイズさせることと、前記プライミング配列をテンプレート指向の様式で伸長させることと、を含む、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記離散区分が、前記オリゴヌクレオチドの相補配列を含むスイッチオリゴヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5 5)

(b) が、前記スイッチオリゴヌクレオチドを前記核酸由来の核酸断片の少なくとも一部にハイブリダイズさせることと、前記スイッチオリゴヌクレオチドをテンプレート指向の様式で伸長させることと、を含む、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

(b) が、前記オリゴヌクレオチドを前記 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列に結合させることを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記 1 つまたは複数の第 1 の核酸配列が前記核酸由来の核酸断片である、項目 1 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記 (b) が、前記オリゴヌクレオチドを前記核酸に結合させることを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記結合させることができることを含む、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

複数の区分が離散区分を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記複数の区分が、1 つの区分あたり平均 1 つ未満の細胞を含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記複数の区分の 25% 未満の区分が細胞を含まない、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記複数の区分が、それぞれ少なくとも 1 つの区分された細胞を有する離散区分を含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記離散区分の 25% 未満が複数の細胞を含む、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

少なくとも離散区分のサブセットがビーズを含む、項目 6 4 に記載の方法。

(項目 6 6)

前記離散区分の少なくとも 75% が、少なくとも 1 つの細胞及び少なくとも 1 つのビーズを含む、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記離散区分が、区分された核酸バーコード配列をさらに含む、項目63に記載の方法。  
。

(項目68)

前記離散区分が、少なくとも1,000の異なる区分された核酸バーコード配列を含む、項目67に記載の方法。

(項目69)

前記離散区分が、少なくとも10,000の異なる区分された核酸バーコード配列を含む、項目68に記載の方法。

(項目70)

前記離散区分が、少なくとも100,000の異なる区分された核酸バーコード配列を含む、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記複数の区分が、少なくとも1,000の区分を含む、項目60に記載の方法。

(項目72)

前記複数の区分が少なくとも10,000の区分を含む、項目71に記載の方法。

(項目73)

前記複数の区分が、少なくとも100,000の区分を含む、項目72に記載の方法。

(項目74)

複数の異なる細胞タイプの集団における細胞を特徴付ける方法であって、

(a) 前記集団内の個々の細胞からの核酸を離散区分へ提供することと、

(b) 共通の核酸バーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを、前記離散区分であって、複数の異なる区分が異なる共通の核酸バーコード配列を含む、前記離散区分内の個々の細胞からの前記核酸の1つまたは複数の断片に結合させることと、

(c) 前記複数の離散区分からの前記核酸の前記1つまたは複数の断片を特徴付けて、共通バーコード配列の存在に少なくとも部分的に基づいて、前記1つまたは複数の断片を個々の細胞に帰属させることと、

(d) 前記複数の離散区分における前記1つまたは複数の断片の前記特徴付けに基づいて、前記集団内の複数の個々の細胞を特徴付けることと、を含む、前記方法。

(項目75)

前記核酸を断片化することをさらに含む、項目74に記載の方法。

(項目76)

前記離散区分が液滴である、項目74に記載の方法。

(項目77)

前記核酸の前記1つまたは複数の断片を特徴付けることが、前記個々の細胞からのリボソームデオキシリボ核酸を配列決定することを含み、前記個々の細胞を特徴付けることが、細胞の属、種、株または変異体を識別することを含む、項目74に記載の方法。

(項目78)

前記個々の細胞がマイクロバイオームサンプルに由来する、項目77に記載の方法。

(項目79)

前記個々の細胞がヒト組織サンプルに由来する、項目74に記載の方法。

(項目80)

前記個々の細胞が哺乳類の循環細胞に由来する、項目74に記載の方法。

(項目81)

前記個々の細胞が法医学的サンプルに由来する、項目74に記載の方法。

(項目82)

前記核酸が、前記離散区分の前記個々の細胞から放出される、項目74に記載の方法。

(項目83)

個々の細胞または細胞集団を特徴付ける方法であって、

(a) 複数の異なる細胞表面特徴結合基タイプであって、各異なる細胞表面結合基タイプは異なる細胞表面特徴に結合することができ、かつ存在する場合は、1つまたは複数の

細胞表面特徴結合基とその細胞表面特徴それぞれとの間の結合を可能にする条件下で、それに結合したレポーターオリゴヌクレオチドを含む、前記複数の異なる細胞表面特徴結合基タイプを有する細胞をインキュベートすることと、

(b) 前記細胞を、バーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドを含む区分に区分することと、

(c) 前記バーコード配列を前記区分に存在するオリゴヌクレオチドレポーター基に結合させることと、

(d) 前記オリゴヌクレオチドレポーター基及び結合したバーコードを配列決定することと、

(e) 配列決定されたレポーターオリゴヌクレオチドに基づいて前記細胞上に存在する細胞表面特徴を特徴付けることと、を含む方法。

(項目 8 4)

複数の区分を含む組成物であって、前記複数の区分のそれぞれが、(i)個々の細胞、及び(ii)共通の核酸バーコード配列を含むオリゴヌクレオチドの集団を含む組成物。

(項目 8 5)

前記複数の区分がエマルジョン中の液滴を含む、項目84に記載の組成物。

(項目 8 6)

前記複数の区分のそれぞれの中の前記オリゴヌクレオチドの集団が、前記複数の区分のそれぞれの中に配置されたビーズに結合される、項目84に記載の組成物。

(項目 8 7)

前記個々の細胞には、それらのそれぞれの細胞表面特徴に関連する複数の異なる細胞表面特徴結合基が結合しており、各異なるタイプの細胞表面特徴結合基は、異なるヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドレポーター基を含む、項目84に記載の組成物。

(項目 8 8)

前記複数の異なる細胞表面特徴結合基が、複数の異なる細胞表面特徴に対して結合親和性を有する複数の異なる抗体または抗体断片を含む、項目87に記載の組成物。