

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-545472

(P2013-545472A)

(43) 公表日 平成25年12月26日 (2013. 12. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 B	
	C 1 2 M 1/34 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-541336 (P2013-541336)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月30日 (2011. 11. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月24日 (2013. 7. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/071433
 (87) 国際公開番号 W02012/072705
 (87) 国際公開日 平成24年6月7日 (2012. 6. 7)
 (31) 優先権主張番号 10193291.1
 (32) 優先日 平成22年12月1日 (2010. 12. 1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/418, 423
 (32) 優先日 平成22年12月1日 (2010. 12. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502247787
 モルフォシス・アー・ゲー
 ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 ・マルティン
 スリッド／ブラネッグ, レナークリストー
 シュトラーセ 4 8
 (71) 出願人 513134982
 ハーエスゲーイーイーエムイーテー インス
 ティトゥッツ フュル ミクロ ウント
 インフォルマティオンステヒニーク
 ドイツ連邦共和国 7 8 0 5 2 フィリン
 ゲンシュヴェニンゲン, ヴィルヘルム
 シッカートーシュトラーセ 1 0

最終頁に続く

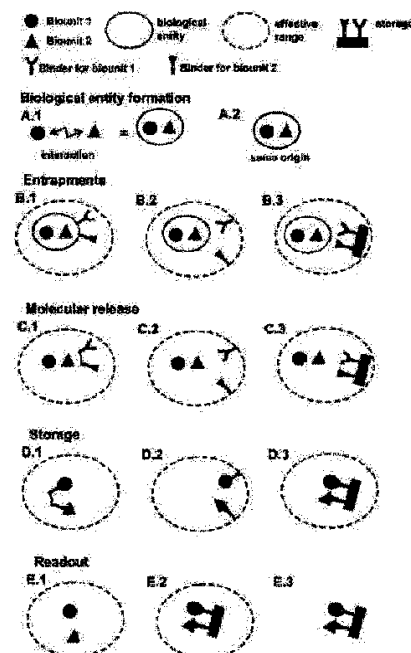
(54) 【発明の名称】 単一細胞内の生体分子の同時検出

(57) 【要約】

本発明は、単一細胞または他の生物学的実体から複数の生体分子を検出することに関する方法、イムノアッセイ、キット、および装置を提供する。本発明はまた、そのような実体から、相互作用する生体分子を高度に並行的に検出することを可能にする。

【選択図】 図 1

FIGURE 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

2 つ以上の生体分子を検出するための方法において、前記方法が、
(a) 前記生体分子を含む細胞を含む試料を準備する工程と、
(b) 前記生体分子の派生体を結合することができる成分を含むコンパートメントの中に前記細胞を空間分離する工程と、
(c) 前記細胞から前記生体分子を放出させる工程と、
(d) 前記生体分子の派生体を生成させる工程と、
(e) 前記生体分子の派生体が、前記生体分子の派生体を結合することができる前記成分に結合することを可能にする工程と、
(f) 前記生体分子の派生体を検出または同定する工程と
を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記生体分子が、サブクラスであるポリペプチド、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂肪酸、小分子、細胞小器官、または前述のいずれかの派生体、一部、もしくは組合せからなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、すべての生体分子が同じサブクラスに由来することを特徴とする方法。

20

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、前記サブクラスが、ポリペプチドのサブクラスまたは核酸のサブクラスであることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法において、前記ポリペプチドのそれぞれが、多量体のタンパク質または酵素の一部であるか、または前記核酸のそれぞれが、多量体のタンパク質または酵素の一部であるポリペプチドをコードすることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法において、前記多量体タンパク質が、免疫グロブリンまたはその機能性断片であることを特徴とする方法。

30

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子が、免疫グロブリンまたはその機能性断片の可変重鎖および可変軽鎖をコードする遺伝子であることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の方法において、前記生体分子が異なるサブクラスに由来することを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の方法において、前記試料が、血液、骨髄、腫瘍、単一細胞生物、原核生物、または体液であるか、またはそれらに由来することを特徴とする方法。

40

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記試料が患者に由来する試料であり、前記患者が健康患者、免疫患者、感染患者、または疾患もしくは障害を有する患者であることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 の何れか 1 項に記載の方法において、前記細胞が単一 B 細胞などの単一細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 乃至 10 の何れか 1 項に記載の方法において、前記細胞が、別の細胞、ウイルス、細菌、分子、もしくは生体分子、または前述のいずれかの派生体、断片、もしくは複

50

合物と相互作用する細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 10 の何れか 1 項に記載の方法において、前記細胞が、2 つの化学的および/または生物学的ライブラリーの混合物を含み、第 1 ライブラリーの少なくとも 1 つのメンバーが、第 2 ライブラリーのメンバーと相互作用または結合することを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 10 の何れか 1 項に記載の方法において、前記細胞が、化学的および/または生物学的ライブラリーの少なくとも 2 つのメンバーと相互作用または結合する生体分子を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 15】

請求項 1 乃至 14 の何れか 1 項に記載の方法において、前記コンパートメントが、キャビティー、ウェル、エマルション、相境界システム、疎水性スポット、粒子、物理力、または化学的架橋により形成されることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法において、前記相境界が、空気中の水滴のように水と気体の間の相分離によって、または油中の水滴のように水と液体の間の相分離によって、またマイクロタイタープレート中の水滴のように水と固相の間の相分離によって実現されることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法において、前記キャビティーまたは前記ウェルが、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または微小構造基材の上のキャビティーであることを特徴とする方法。

20

【請求項 18】

請求項 15 に記載の方法において、前記エマルションが、油中水型または水中油型のエマルションであることを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 15 に記載の方法において、前記粒子が、シリカ、ガラス、アガロース、ポリマー、金属酸化物、またはそれらの複合物からなることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 15 に記載の方法において、前記物理力が、静電力、電流力、誘電泳動力、電磁力、磁気、光学、温度、または密度効果であることを特徴とする方法。

30

【請求項 21】

請求項 1 乃至 20 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子の派生体を結合することができる前記成分が、ビーズ、スライドガラス、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または前述のいずれかの蓋であることを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 1 乃至 21 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (c) が化学的または物理的条件の変化により行われることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、化学的条件の前記変化が、pH 変化、塩濃度の変化、酵素の添加、細胞溶解剤の添加であることを特徴とする方法。

40

【請求項 24】

請求項 22 に記載の方法において、物理的条件の前記変化が、加熱、凍結、電場、磁場または誘電場の印加、剪断力または遠心力、機械的変形、弛緩、超音波または任意の物理的な破断作用であることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の方法において、物理的条件の前記変化が、溶液への粒子の溶解、生体ユニットのまわりの保護シェルの溶解、または酵素による誘導など、時間依存的にもたらされることを特徴とする方法。

50

【請求項 26】

請求項 1 乃至 25 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (d) が、前記生体ユニットのレプリケートまたは派生体の生成をもたらす増幅反応を含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法において、前記増幅反応が PCR または RT-PCR であり、前記 PCR または RT-PCR の間に、前記レプリケートまたは派生体が前記生体分子の派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする [第 1 の] タグが加えられることを特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法において、前記 PCR または RT-PCR の間に、前記 PCR 産物または RT-PCR 産物のその後のシーケンシングを可能にする第 2 のタグが加えられることを特徴とする方法。

10

【請求項 29】

請求項 1 乃至 28 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (e) が DNA シーケンシングにより行なわれることを特徴とする方法。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の方法において、前記 DNA シーケンシングが、前記 PCR 産物または RT-PCR 産物を連続または並行してシーケンシングすることにより行われることを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 29 または 30 に記載の方法において、前記 DNA シーケンシングが、前記 PCR 産物もしくは RT-PCR 産物を結合することができる成分上で、または前記成分のコピー上で前記 PCR 産物もしくは RT-PCR 産物をシーケンシングすることにより行われることを特徴とする方法。

20

【請求項 32】

請求項 1 乃至 31 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子が、前記核酸を結合することができる成分にハイブリダイゼーションにより結合する核酸であり、前記成分が固相粒子であり、かつ前記固相粒子が工程 (e) のシーケンシングために使用されることを特徴とする方法。

【請求項 33】

請求項 1 乃至 32 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子が、前記ポリペプチドまたはタンパク質を結合することができる成分の表面に直接結合するポリペプチドまたはタンパク質であり、前記成分が固相粒子であり、かつ前記固相粒子上の前記生体分子が工程 (e) のイムノアッセイにより検出されることを特徴とする方法。

30

【請求項 34】

請求項 1 乃至 33 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子またはそれらの派生体の検出または同定が同時に行なわれることを特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 1 乃至 34 の何れか 1 項に記載の方法において、前記試料が、少なくとも 10^3 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^9 、または少なくとも 10^{12} の細胞を含み、前記細胞のそれぞれにおいて、少なくとも 2 つの生体分子が検出されることを特徴とする方法。

40

【請求項 36】

請求項 35 に記載の方法において、前記細胞内の前記少なくとも 2 つのサブユニットの存在の相関が統計的に分析または判定されることを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 1 乃至 36 に記載の方法のいずれか 1 つを組み込んだまたは利用することを特徴とするイムノアッセイ。

【請求項 38】

請求項 1 乃至 37 の何れか 1 項に記載の方法またはイムノアッセイを実施することを特

50

徴とする装置。

【請求項 39】

請求項 1 乃至 37 の何れか 1 項に記載の方法またはイムノアッセイを実施するための装置および説明書を含むことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は 2010 年 12 月 1 日に出願された米国仮特許出願第 61/418,423 号明細書の利益を主張するものであり、その内容全体を参照によって組み込むものとする。

【0002】

本発明は、単一細胞または他の生物学的実体から複数の生体分子を検出することに関する方法、イムノアッセイ、キット、および装置を提供する。本発明はまた、そのような実体から生体分子を高度に並行的に検出することを可能にする。

【背景技術】

【0003】

生物界は、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂肪酸、およびその他多数を含む種々のタイプの有機物および無機物から構成されている。それらは、細胞、組織、器官、および生体を形成し、次いで、他のコンパートメントまたは周辺の組織もしくは液体の中に存在する物質および化合物に反応し、相互作用する。これらの物質（本発明では、「生体ユニット」または「生体分子」と呼ばれる）すべてについて、検出方法が存在する。所与の問題について最適な検出方法は、生体ユニットそれ自体の性質および試験される試料の起源など、多くの因子に依存する。全体として、最近の 10 数年で、ほとんどの検出方法の感度が大幅に改善した。特定の生体ユニットについては、単一分子の検出も可能にする検出方法が存在する。そのような高感度な方法では、それぞれの検出方法を妨害する因子を除去するために、試料の複雑な処理を必要とすることが多い。本発明は、生体ユニットの検出のための新規かつ優れた方法を開示する。そのような生体ユニットは、例えば、生体分子であってもよい。

【0004】

本発明の方法により検出または同定される生体ユニットまたは生体分子が試料に含まれると、本発明は、前記生体ユニットまたは生体分子の少なくとも 2 つの並行検出を達成する。試料それ自体は、生体ユニットまたは生体分子を含有する、1 つまたは複数の（典型的には複数の）構造的または生物学的サブユニット（本発明の用語における「生物学的実体」）を含むことができる。例として：試料が 1 滴の血液の場合、生物学的実体が前記 1 滴の血液に含まれる 1 つの単一 B 細胞であり、並行検出される生体ユニットが、前記 B 細胞により産生される抗体の V H 鎖および V L 鎖をコードする核酸である。

【0005】

理論的には、細胞などの生物学的実体における、いくつかの異なる単一（またはごく少数の）生体ユニットまたは生体分子の存在は、生物学的実体または細胞を、異なる一群の生体ユニット / 生体分子に分離し、それぞれの群の中で、目的とする所望の生体ユニット / 生体分子を同定することにより分析することができる（例えば、細胞における所与の遺伝子またはポリペプチドの有無）。しかしながら、具体的には、2 つ以上の、可能性としては数百数千もの生物学的実体を試料中で分析することになる場合には、そのような分離および検出方法は極めて厄介である。したがって、連続的ではなく並行的に処理を行わなければならない。多くの既存の検出システムには並行的手法がない。さらに、並行的手法は、生物学的実体または細胞当たり 1 つの生体ユニットまたは生体分子の並行検出に焦点を合わせる。

【0006】

生物学的実体または細胞当たり少なくとも 2 つの生体ユニットまたは生体分子の高度な並行処理および並行検出のために、各生物学的実体または細胞を個別のコンパートメントまたはキャビティー（本発明では、「有効範囲」または「コンパートメント」と呼ばれる

10

20

30

40

50

）に移すことにより試料を検出前に分割しなければならない。具体的には、生体ユニットまたは生体分子を単一試料中で検出しなければならない場合は、位置情報、すなわち、いずれの生体ユニット／生体分子がいずれの生物学的実体に存在するかに関する情報を保持する必要がある。これは、例えば、エッペンドルフチューブまたは96ウェルもしくは384ウェルのマイクロタイタープレートまたはピコタイタープレートのキャピティーなど、異なる容器またはキャピティーに試料を物理的に分配または分割することにより達成され、試料、生物学的実体または細胞、および検出される生体ユニット／生体分子の性質に依存する。しかし、そのようなシステムは、高度な並行処理能力を欠いている。より高度な並行化は、約 10^6 またはそれ以上もあるキャピティーを含有するいわゆるピコタイタープレートで達成することができる。しかし、ここで、試料がほんの少量、例えば、ほんの数マイクロリットルまたはピコリットルでもある場合で、分割工程を介して容量をさらに低減しなければならない場合、試料の分配は特に面倒である。明らかに、具体的に試料それ自体が、試験される生体ユニット／生体分子をほとんど含まない場合、これは問題をもたらす。分割工程での生体ユニット／生体分子の統計的分布により、個々のキャピティーが、生体ユニット／生体分子をまったく含有しないか、または検出閾値を下回る濃度でのみ含有する可能性がある。単一生体ユニット／生体分子を検出することになる場合、これは明白な問題をもたらす。別の問題は、少量を取り扱うことの実際的な困難であり、少量では、完全に乾燥する傾向があり、またキャピティーの表面に吸着する傾向を示し、重力の影響を受けない。一方、試料が多く、生体ユニット／生体分子を含有する場合、分割工程が統計的に行われると、生体ユニット／生体分子間の位置情報が破壊されることになる。これは、例えば、いくつかの細胞からDNAを採取して増幅前に混合する第2世代シーケンシング技術の場合である。本発明の他の態様では、試料は、コンパートメントよりも大きな生物学的実体を含有することがある（例えば、コンパートメントがピコタイタープレートのキャピティーにより形成される場合）。例えば、試料は、腎臓である場合も、その一部である場合もあり、かつ生物学的実体がネフロンである場合もある。そのような場合に、本発明は、生体ユニット／生体分子を並行して単離しかつ検出しなければならない高度に並行的な方法を提供する。

【0007】

本発明が解決した問題の1つは、生物学的実体または細胞の高度な並行処理および前記生物学的実体または細胞に存在するかまたはそれに由来する2つ以上の生体ユニットまたは生体分子の同時分析である。本発明の方法で分析および検出される2つ以上の生体ユニットまたは生体分子は、任意の方法または形式で互いに相互作用する。これは、例えば、互いに直接結合することにより可能となりうる。あるいは、それらは、2つの生体ユニットまたは生体分子に「結合する」第3のタンパク質または他の実体もしくは成分に結合することがある。さらに、あるいは、2つ以上の生体ユニットまたは生体分子が、任意の直接的または間接的相互作用を伴って、同じ生物学的実体または細胞の中に単純に存在する可能性もある。そのような場合、本発明は、所与の生物学的実体または細胞の中に存在するそのような2つ以上の生体ユニットまたは生体分子を検出するように適用することができる。特定の実施形態では、2つ以上の生体ユニットまたは生体分子は、直ちに分析されずに、後の分析のために保存される。これは、生体ユニットもしくは生体分子または前記生体ユニットもしくは生体分子から生成される派生体に結合することができる成分を準備することにより達成される。

【0008】

前記問題の解決に向けた一工程は、エマルション（例えば、油中水型エマルション）の使用である。ここでは、典型的には水性小滴が油に取り囲まれ、それによって、単一細胞などの単一生物学的実体を捕捉することができる有効範囲が生成する。液滴のサイズは、例えば腎臓のネフロンのような完全な組織または機能単位を含むほどの大きさにもなりうる。互いに関係もしくは近接する（例えば、同じ細胞内に存在する）か、または任意の方法もしくは形式で互いに相互作用する生体ユニットまたは生体分子は、エマルションの1つの単一液滴に捕獲され、捕捉されるようになる。これに対して、別の生物学的実体また

10

20

30

40

50

は細胞に含まれる生体ユニット／生体分子は分離されることになる。実際には、そのようなエマルション、具体的には、さらなる処理工程が可能であり、かつ単一生物学的実体を含有するのみであるエマルションを生成させることは極めて困難である。水性液滴の短所の1つは、特定の処理タイプのみが可能であることである。生体ユニット、生体分子、または生物学的実体が核酸である場合には、PCRまたはRT-PCRにより増幅することができる。細胞は、細胞の通常の増殖により増加させることができる。しかしながら、そのような技術（例えば、RainDance技術、PNAS（2009）106, 14195-200を参照のこと）は、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を提供も開示もしていない。これは、その後の高度な並行分析、例えばシーケンシングのための前提条件である。

10

【0009】

RettingおよびFolchは、マイクロウェルアレイへの単一細胞の捕捉を可能にする方法について開示している（Anal Chem（2005）77, 5628-34）。これに関連して、BioTrove, Inc.（現在はLife Technologies Corporationの一部）は、適切に設計されたチップ（Living Chip（商標））の20,000ウェル以上に単一細胞を捕捉する方法について開示した。しかしながら、これらの方法は、異なるキャビティーの中に生体ユニット／生体分子を物理的に分配する問題に関するのみである。それは、本発明に関する可能性のある使用について、例えばストレージへの関連もしくは相互作用する生体ユニットの捕捉、または相互作用するパートナーの同定および／もしくは検出についてまったく言及していない。

20

【0010】

Grosvenorら（Anal Chem（2000）72, 2590-4）は、ピコリットルフォーマットにおける特定のアッセイの開発について報告している。しかしながら、この発表は、小規模アッセイそれ自体にのみ関するものである。実施されたアッセイは、全細胞を利用せず、しかも例えばシーケンシングなど、いかなる主要な操作工程も考慮に入れないという意味で簡単である。Curnowら（Invest Ophthalmol Visual Sci（2005）46, 4251-9）は、細胞を利用する、ビーズ上の多重アッセイについて記載している。しかしながら、彼らは個々の細胞または生物学的実体について分析しなかった。同様の方法が、Vignali（J Immunol Meth（2000）243, 243-55）に開示されている。Taniguchiら（Nature Methods（2009）6, 503-6）は、単一細胞のいくつかの遺伝子の発現を分析することができるPCR手法について記載している。しかしながら、この手法は、極めて厄介であり、さらには細胞の集団全体ではなく単一細胞の分析に、または前記のより大きなユニット内の結合または相互作用する生体ユニット／生体分子の検出および／または同定に限定される。

30

【0011】

他の報告は、例えば遺伝子多型の検出など、シーケンシング技術および関連用途に焦点を合わせているが（例えば、国際公開第2005/082098号パンフレット、米国特許第6013445号明細書、米国特許出願公開第2009/0269749号明細書、米国特許出願公開第2006/0292611号明細書、米国特許出願公開第2006/0228721号明細書、または米国特許第7323305号明細書を参照のこと）、これらの報告はいずれも、本発明で想定される、生物学的実体または細胞に由来する核酸などの生体ユニットまたは生体分子の同時の検出または同定を目指しても達成もしていない。

40

【0012】

Zengら（Anal Chem（2010）82, 3183-90）は、単一細胞遺伝子分析に適したマイクロ流体アレイについて開示している。彼らは、野生型細胞および／または変異／病原性細胞を検出および定量するために開発された多重単一細胞PCR法について記載している。Zengらは、多重順方向プライマー、すなわち、それぞれの野

50

生型遺伝子または変異遺伝子に特異的なプライマーで機能化された微小ビーズを利用する。Zengらとは対照的に、本発明は、細胞当たり1つの生体ユニットまたは生体分子（すなわち、遺伝子の野生型または変異型）を検出するだけでなく、細胞当たり2つ以上の生体分子または生物学の実体を検出することができる。さらに、Zengらに記載の方法は、長いゲノムDNA分子についてのみ技術的に可能であり、他のいずれの生体ユニットまたは生体分子についても可能ではない。

【0013】

米国特許出願公開第2006/0263836号明細書は、多重化マイクロ粒子をベースとしたシステムについて記載している。しかしながら、このアッセイシステムは、米国特許出願公開第2006/0263836号明細書の生物学の実体または試料の中で、唯一つの生体ユニット/生体分子を検出する（すなわち、抗体）点で本発明の方法とは基本的に異なる。このアッセイで利用される第2の生体ユニット/生体分子は、マイクロ粒子上に固定化される抗原である。すなわち、前記第2の生体分子は、生物学の実体または試料に由来または含有される生体分子ではなく、米国特許出願公開第2006/0263836号明細書に開示されたアッセイの工程中に人為的に加えられる。

10

【0014】

国際公開第2007/081387号パンフレットは、特定の生体ユニット間および生体分子間の相互作用の同定に関する方法およびアッセイについて記載している。同様に、国際公開第2007/081387号パンフレットの方法で使用される生体ユニット/生体分子の1つは、生物学の実体または試料に由来または含有される生体分子ではなく、アッセイの工程中に人為的に加えられる。換言すれば、国際公開第2007/081387号パンフレットにおける生体ユニット/生体分子の1つは、第2の生体ユニット/生体分子に論理的に結合させるために使用されるものであり、検出される相互作用についての知識が予め必要である。

20

【0015】

米国特許出願公開第2005/0227264号明細書は、連続フローシステムにおける、油中水型エマルジョン中の核酸増幅法について記載している。この方法の有用性が本発明とはまったく異なる有用性であるという事実は別として、米国特許出願公開第2005/0227264号明細書は、開示のPCT手法を介して個々のPCR産物をエンコードおよびデコードすることを単に目的としている。

30

【0016】

米国特許第7,244,567号明細書は、シーケンシングプライマーの1つを一時的に遮断する技術を使用して、核酸分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖を同時にシーケンシングする方法について開示している。しかしながら、米国特許第7,244,567号明細書は、試料をさらに処理する前に、生物学の実体または細胞を空間分離するというコンセプトを開示していない。さらに、米国特許第7,244,567号明細書は、両末端から1つの単一核酸分子をシーケンシングするため、2つ以上の生体ユニットまたは生体分子を検出も同定もしない。

【0017】

要約すると、上記に列挙した方法はすべて、1つまたは複数の欠点または制約を受ける。試料の物理的な小量分割は、単一細胞分析の固有の問題である。エマルジョンなどの小さな水溶液を利用する方法では、関連、相互作用、または結合する生体ユニットのストレージおよびその後の分析を可能にする成分がないという問題がある。生体ユニットの同時分析に利用可能な方法、例えばシーケンシングでは、非効率（例えば、PCRベースの増幅反応を介して2つの異なる核酸分子を架橋する方法であるリンケージPCR（linkage PCR）は、エマルジョン中で効率的であるとは決して実証されていない）もしくは頑健性の欠如、例えば低いシグナル対ノイズ比などの技術的な落とし穴、またはさらには定量的よりむしろ定性的な結果という問題がある。例えば、国際公開第2005/042774号パンフレット（Symphogen）で実施されたリンケージPCRは、2つのPCR反応を必要とし、PCR産物は古典的なDNAシーケンシングにより同定

40

50

される。本発明は、単一PCR工程で同じ結果を達成し、このPCR反応は直接シーケンシングをすでに可能にする。この差は完全に異なるスループットをもたらし、試料の大規模処理およびそれぞれのPCR産物のその後の同定を可能にする。

【0018】

本発明の少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出および/または同定は、有効範囲またはコンパートメントの中に、前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を捕捉することにより達成される。コンパートメントが生体ユニットもしくは生体分子または前記生体ユニットもしくは生体分子の派生体を結合することができる成分を含む場合に、これは有利となりうる。コンパートメントの中に生物学的実体または細胞が捕捉されると、生体ユニットまたは生体分子が共通の起源を有しているか、または例えば一時的な相互作用を介して、試料中で互いに相互作用するという情報が保持されていることが保証される。次いで、位置情報とも呼ばれるこの情報は、生体ユニットもしくは生体分子または前記生体ユニットもしくは生体分子の派生体を結合することができる成分上に移動またはコピーすることができる。位置情報の保持はまた、前記生物学的実体または細胞の一部でもなく、それに含まれることもないコンパートメントの中に生体ユニットも生体分子も存在しないことを保証する。すなわち、偽陽性の生体ユニットは検出も同定もされない。これは当技術分野で公知の技術では可能ではない。

10

【0019】

したがって、現在の技術では、大集団の細胞にわたる各細胞内の2つ以上の遺伝子など、2つ以上の関連または結合した生体ユニットまたは生体分子の関連、相互作用、または共通起源を信頼性高くかつ高度に並行的に検出、同定、記録、および/または定量することは可能でない。現在利用可能な単一細胞技術は、1つまたはいくつかの単一生体ユニットまたは生体分子の分析および検出を可能にするだけである。本発明は、この制限を克服し、任意のサイズの生体ユニットまたは生体分子の集団の取り扱いを単純化する。その使用の1つは、単一細胞に由来する2つのmRNAの記録または検出、および全細胞集団の規模での大量並行シーケンシングによるそれらの同定である。

20

【0020】

この効果を達成するために、本発明はストレージを利用する。ストレージは、本発明で検出される生体ユニットまたは生体分子に結合する成分である。ストレージは、特定の場所、コンパートメント、または有効範囲の中に、捕捉および空間分離される生体ユニットまたは生体分子を格納し、それによって、検出される生体ユニットまたは生体分子に物理的結合をもたらす。前記生体分子、生体ユニット、またはそれらの派生体を結合することができる成分上に検出される生体分子または生体ユニットの一体感は、生物学的実体または細胞における生体分子または生体ユニットの最初の一体感に等しい。それぞれのコンパートメントの中にそのように捕捉または固定された生体ユニットまたは生体分子のみが、それぞれの分子のその後の高度な並行処理、および最終的にはそれらの検出および/または同定を受けることができる。

30

【0021】

定義

用語「生体ユニット」は、任意の分子、分子の集合体もしくは複合体、または細胞（またはそれらのサブユニット）を指す。生体ユニットという用語はまた、組織、器官、細胞小器官、生体全体、または生物システムの一部もしくはそれに含まれる他の任意の実体を含む。

40

【0022】

生体ユニットという用語は生体分子を含む。用語「生体分子」は、当技術分野で認識されており、生物システムが生成するかまたは生成することができる任意の分子を含む。生体分子は、アミノ酸（ポリペプチド、タンパク質、もしくはペプチドなど）、ヌクレオチド（DNA、RNA、もしくはそれらの修飾物など）、炭水化物（もしくは糖の任意の他の形態）、または脂肪酸、脂質、または天然の有機小分子、代謝産物、または前述のいずれかの任意の派生体、一部、もしくは組合せから構成される分子を含む。

50

【 0 0 2 3 】

抗体および抗体断片は本発明の代表的かつ好ましいポリペプチドである。代表的な核酸には、抗体および抗体断片をコードする遺伝子が含まれる。生体ユニットは天然に存在しても、天然に存在する分子から誘導されてもよい。生体ユニットという用語はまた、所与の生物システムにとって外来性であるが、例えば、前記生物システムにおける特定の効果を達成または研究するためにそのシステムに加えられる分子を含む。したがって、特定の細胞、組織、または患者に投与するかまたは接触させる、薬学的に活性な化合物は本発明の生体ユニットである。生体ユニットおよび生体分子はまた、代謝産物、例えば同化または異化代謝分子であってもよい。(単一)ゲノム上にコードされる2つ(以上)の遺伝子または遺伝子産物は、2つ(以上)の生体ユニットまたは生体分子と見なされる。生体ユ

10

【 0 0 2 4 】

本発明は、試料由来の核酸またはポリペプチドなどの少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の高度な並行検出のための方法を提供する。具体的には、かつ好ましくは、前記生体ユニットまたは生体分子は、任意の形状、形態、または手段で互いに相互作用する。そのような相互作用、関係、または結合は、用語「相互作用する」または「相互作用」によって特徴づけられる。相互作用は、天然の共有結合のことも非共有結合のこともある物理的相互作用であってもよいが、相互作用は、2つの生体分子または生体ユニット間の別の非物理的結合であってもよい。例としては、以下のものが挙げられる。

20

- ・ 少なくとも2つの生体ユニット間の現在または過去の相互作用、例えば、

抗原または抗体間の相互作用、

2つのDNA分子間のハイブリダイゼーション

2つのDNA分子または遺伝子間のリンケージ

ウイルスと細胞の間の相互作用

2つの細胞間の相互作用

同じ抗原に対する2つの抗体の相互作用または結合

- ・ 共通起源の少なくとも2つの生体ユニット、例えば、

同じ細胞内の2つの分子

同じゲノムに由来または起源する2つのメッセンジャーRNA

同じゲノムまたは細胞に由来または起源する2つのDNA配列、RNA、ペプチド

、またはタンパク質

2つの娘細胞

同じ祖先に起源する細胞。

30

【 0 0 2 5 】

特定の態様では、本発明は、生物学的実体または細胞における、2つ以上の生体分子または生体ユニットの検出のための方法を提供する。代替態様では、本発明は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体分子または生体ユニットの検出のための方法を提供する。特定の態様では、3つ以上、例えば3、4、5、10、20、またはそれより多くの生体分子または生体ユニットが、本発明で検出される。

40

【 0 0 2 6 】

用語「バインダー」は、別の生体ユニットまたは生体分子(「バインダーターゲット」と呼ばれる)に結合することができる生体ユニットまたは生体分子を指す。本発明のバインダーおよびバインダーターゲットは、本明細書で上記に定義されたいずれの生体ユニットであっても生体分子であってもよい。本発明の典型的なバインダーには、抗体およびそれらの派生体が含まれる。本発明の典型的なバインダーターゲットには抗原が含まれる。最も一般的には、抗原はタンパク質性の構造であるが、抗原は、例えば炭水化物、脂肪酸、または脂質のような異なる性質からなることもある。さらに、ストレージおよびバイン

50

ダーは同じ実体であってもよい。すなわち、特定の実施形態では、同じ分子が本発明のバインダーおよびストレージとして役立つことができる。

【0027】

用語「修飾因子」は、別の生体ユニットまたは生体分子（「修飾因子ターゲット」と呼ばれる）を修飾することができる生体ユニットまたは生体分子を指す。修飾因子は、特定の成分（例えば、リン酸基または糖成分）を基質、例えばバインダーに加え、それによってバインダーの結合活性を増大もしくは減少させるか、またはバインダー（すなわち、本発明の用語では修飾因子ターゲット）のターゲティング、物理的、生理的、または化学的性質を変化させる酵素を含む。

【0028】

用語「レプリケート（replicate）」は、ソース分子に由来するかまたはそれから生成する分子を指す。レプリケートは、例えばソースデオキシリボ核酸分子の複製により生成した二本鎖デオキシリボ核酸分子などのソース分子の正確なコピーであってもよい。レプリケートはまた、例えばソースデオキシリボ核酸分子の転写により生成したメッセンジャーRNAなどのソース分子の派生体であってもよい。後者の場合では、レプリケートは、それが由来したソース分子の情報を依然として保持する。すなわち、明確に後戻りすること、またはソース分子を同定することが依然として可能である。

【0029】

用語「派生体」は、それがソース分子の直接的かつ明確な産物であるという意味で、別の分子（ソース分子）の派生体、コピー、またはイメージである分子を指す。すなわち、ソース分子の正確なアイデンティティおよび性質は、知られているか、または派生体が知られている場合には推定することができる。PCR産物は、本発明の典型的な派生体である。ソース分子のアイデンティティ、性質（および配列）は、所与のPCR産物から直ちに推定することができる。同様に、RT-PCR産物は、本発明の派生体である。すなわち、逆転写により合成された、mRNA鎖のcDNA再スクリプトは派生体である。

【0030】

用語「生物学的実体」は、生物学的ユニットの内部、その上、またはその近傍に両方が存在するか、生物学的ユニットに結合しているか、互いに相互作用または結合するか、別の第3の分子に相互作用または結合するか、または一緒になって特定の下流イベントを引き起こすかもしくは何らかの他の因果関係を有する、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む機能的な前記生物学的ユニットを指す。その最も簡単な形態では、そのような生物学的実体は、バインダーおよびそれに対応するバインダーターゲットなど、別の分子に相互作用または結合する分子を包含する。生物学的実体の例としては、抗体およびその対応抗原、リガンドおよび受容体、酵素およびその基質、または薬物およびその薬物ターゲットがある。別の形態では、生物学的実体は、修飾因子およびそれに対応する修飾因子ターゲットなど、別の分子を修飾する分子を包含する。例としては、ホスファターゼなど、ターゲット分子を修飾する（この場合はリン酸化）酵素がある。他の生物学的実体は、2つ以上の生体ユニットまたは生体分子からなるかまたはそれらを含む分子複合体である。そのような生物学的実体は、抗体またはリボソームなど、タンパク質/ポリペプチド、RNAおよび/またはDNAの複合体、ホモマーまたはヘテロマーのタンパク質または酵素の複合体であってもよい。他の生物学的実体としては、単一細胞、ウイルス、細菌、細胞コンパートメント、細胞クラスター、組織、器官、または多細胞生物がある。生物学的実体において少なくとも生体ユニットは、生物学的実体内にて任意の形状または形態で相互作用する。

【0031】

用語「ストレージ」は、少なくとも2つの生体ユニットもしくは生体分子またはそれらの派生体もしくはレプリケートのためのバインダーを含む成分を指す。本発明の特定の実施形態では、ストレージそれ自体が、本発明の生体ユニットもしくは生体分子またはそれらの任意の派生体もしくはレプリケートを結合することができるかまたは結合する能力を有する。特定の好ましい実施形態では、ストレージは、前記生体ユニットまたは生体分子

10

20

30

40

50

の派生体を結合することができる成分を含む。ストレージまたは成分の役割は、有効範囲の中に生体ユニットまたは生体分子を吸収および捕捉し（定性的、より好ましくは定量的に）、それによって物理的結合を誘起し、格納された生体ユニットまたは生体分子のさらなる処理（例えば、複製および/または修飾）および最終的にはそれらの検出を可能にすることである。例としては、ビーズ、スライドガラス、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または前述のいずれかの蓋が挙げられる。格納された生体ユニットまたは生体分子の検出および同定は、種々の方法で可能であり、生体ユニットまたは生体分子の性質に依存する。例としては、DNAのシークエンシング、RNAのRT-PCR、酵素の生物活性の測定、抗体の結合特性の決定、またはファージもしくは細菌の感染力の測定が挙げられる。シークエンシングは、格納された生体ユニットもしくは生体分子の上で、または生体ユニットもしくは生体分子の派生体上で直接実施することができる。シークエンシング工程に適切なプライマーを加えることができる。生体ユニットまたは生体分子の検出および同定のためのシークエンシングプライマーおよびシークエンシング反応は、同時にまたは連続して実施することができる。特定の環境下では、シークエンシング反応を連続して実施することが有利になりうる。すなわち、最初に第1のシークエンシングプライマーを加えて、第1のシークエンシング反応を実施し、次に続けて、第2のシークエンシングプライマーを加えて、第2のシークエンシング反応を実施する。

10

【0032】

特定の環境下では、有効範囲、コンパートメント、または生物学的実体それ自体が、さらにストレージとして機能することができる。例えば、生体ユニットを生物学的実体に直接連結することができる場合、生物学的実体はストレージとして機能することができる。これは、例えば、ホルムアルデヒドまたは乾燥を介するなどの重合または重縮合など、分子の架橋によって達成することができる。有効範囲またはコンパートメントは、さらにストレージとして機能することができる。例えば、有効範囲またはコンパートメントがリボソームまたはウェルである場合、リボソームまたはウェルの壁はストレージとして機能することができる。さらに、ストレージおよびバインダーは同じ実体であってもよい。すなわち、本発明の特定の実施形態では、同じ分子が本発明のバインダーおよびストレージとして役立つことができる。

20

【0033】

本発明の特定の実施形態では、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体は、核酸を結合することができる成分にハイブリダイゼーションにより結合する前記核酸であり、前記成分は固相粒子である。特定の実施形態では、前記固相粒子は工程(e)のシークエンシングために使用される。

30

【0034】

本発明の特定の実施形態では、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体は、ポリペプチドまたはタンパク質を結合することができる成分の表面に直接結合する前記ポリペプチドまたはタンパク質であり、前記成分は固相粒子であり、前記固相粒子上の前記生体ユニット、生体分子、または派生体は、イムノアッセイにより検出される。

【0035】

用語「有効範囲」は、生化学反応もしくは化学反応が起こる場所もしくは空間範囲、少なくとも2つの生体ユニットもしくは生体分子を含む場所もしくは空間範囲、またはその両方を指す。生体ユニットまたは生体分子は有効範囲の中に捕捉され、例えば、前記有効範囲の中で修飾または結合されうる（それらは、例えば、バインダーターゲットまたは修飾因子ターゲットとして機能することができる）。有効範囲のサイズは、時間経過と共に変化することができ、さらには内部または外部のパラメーターを通して、増大、減少、または安定化することができる。特定の生化学反応については、極めて小さな有効範囲を利用することが好ましい。有効範囲は、その内部に捕捉された生体ユニットまたは生体分子を保持するのに適した任意の手段によって形成することができる。例としては、マイクロタイタープレートのウェルの壁または他の任意の物理的手段、電流または電荷がある。物理的手段により生成される有効範囲は、「コンパートメント」と呼ばれる。有効範囲また

40

50

はコンパートメントは、ストレージを含んでも含まなくてもよい。本発明の特定の実施形態では、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉される生体ユニットまたは生体分子（またはそれらの派生体）は、直接検出または同定することができるため、すなわち、生体ユニットまたは生体分子をさらに処理する必要がないため、ストレージを必要としないことがある。代替実施形態では、生体ユニットまたは生体分子（またはそれらの派生体）のその後の処理には、生体ユニットまたは生体分子と一緒に保持し、有効範囲またはコンパートメントの内部に捕捉したままにすることが必要であるため、ストレージが必要となりうる。本発明の生体ユニットまたは生体分子を有効範囲またはコンパートメントの中に導くかまたは移す方法は、それぞれの生体ユニットまたは生体分子の「捕捉」または「空間分離」と呼ばれる。

10

【0036】

本発明の特定の実施形態では、2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体は、同じ試料の中に含まれる他の生物学的実体から空間分離される。特定の実施形態では、前記生物学的実体は、細胞、好ましくはB細胞などの単一細胞である。特定の実施形態では、2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む細胞は、同じ試料の中に含まれる他の細胞から空間分離される。特定の実施形態では、前記細胞は、B細胞などの単一細胞である。

【0037】

用語「試料」は、少なくとも1つの生物学的実体または細胞を含む任意の材料を指す。試料は、2つ以上、時として数千、数百万、またはそれ以上の生物学的実体または細胞を含むことが極めて多い。例えば、1mlの血液試料は、40億超の細胞、すなわち40億超の生物学的実体を含有し、それぞれの生物学的実体は、数千の異なる生体ユニットまたは生体分子を含む。

20

【0038】

用語「位置情報」は、特定の生体ユニットまたは生体分子が、試料中の同じ生物学的実体または細胞の中に含有されるか、それに由来するか、またはそれからもしくはそれに結合しているか否かを伝える情報である。

【0039】

本明細書で使用する用語「タグ」は、分子の精製または同定に適した任意のペプチド配列を指す。タグは、タグに親和性を有する別の成分に特異的に結合する。タグに特異的に結合するそのような成分は、アガロースビーズなどのマトリックスまたは樹脂に通常結合している。タグに特異的に結合する成分としては、抗体、ニッケルまたはコバルトのイオンまたは樹脂、ビオチン、アミロース、マルトース、およびシクロデキストリンが挙げられる。代表的な精製タグとしては、ヒスチジンタグ（ヘキサヒスチジンペプチドなど）が挙げられ、これはニッケルイオンまたはコバルトイオンなどの金属イオンに結合することになる。用語「タグ」はまた、「エピトープタグ」、すなわち抗体により特異的に認識されるペプチド配列を含む。代表的なエピトープタグとしては、FLAGタグが挙げられ、これはモノクローナル抗FLAG抗体により特異的に認識される。抗FLAG抗体により認識されるペプチド配列は、配列DYKDDDDKまたはその実質的に同一の変異体からなる。したがって、特定の実施形態では、精製タグは、抗体により特異的に認識されるペプチド配列を含むかそれからなる。

30

40

【0040】

本発明の用語「同時の」または「同時に」は、単一試料に由来する少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出を指す。前記少なくとも生体ユニットは、位置情報を保持するように有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉される生体試料である。これは、単一試料または単一の生物学的実体もしくはコンパートメントの中の少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の高度な並行検出を可能にする。

【0041】

用語「検出する」または「検出」は、当技術分野で認識されており、所与の試料、生物学的実体、またはコンパートメントの中の既知の生体ユニットまたは生体分子の同定を指

50

す。

【 0 0 4 2 】

用語「同定する」または「同定」もまた、当技術分野で認識されており、所与の試料、生物学的実体、またはコンパートメントの中の生体ユニットまたは生体分子の同定を指し、ここで、前記生体ユニットまたは生体分子の存在は知られていなかったか単に疑われていたものである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の実施形態の 1 つの方法工程を説明する図である。記号および構造の意味は図の上部に示す。図中の「生体ユニット」は「生体分子」であってもよく、「生物学的実体」は「細胞」であってもよく、「有効範囲」は「コンパートメント」であってもよく、すべての用語は本明細書の上記に定義されたとおりである。A . 1 は、2 つの生体ユニットまたは生体分子が互いに相互作用し、それによって生物学的実体を形成するシナリオを表す。A . 2 は、2 つの生体ユニットまたは生体分子が、直接相互作用することなく、同じ起源または生物学的実体、例えば同じ細胞に由来するシナリオを指す。工程 B では、生体ユニットまたは生体分子は、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉される。B . 1 では、生体ユニットまたは生体分子に対するバインダーは生物学的実体または細胞の上に配置される。B . 2 では、生体ユニットまたは生体分子に対するバインダーは有効範囲またはコンパートメントの上に配置される。B . 3 では、生体ユニットまたは生体分子に対するバインダーは、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができるストレージまたは成分をさらに含む。特定の実施形態では、バインダーおよびストレージは同じ実体または分子であってもよい。工程 C では、生体ユニットまたは生体分子は生物学的実体または細胞から放出されるが、それらは有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉されているため、依然としてバインダーに空間的に近接している。シナリオ B . 1 は C . 1 で示される状況に、シナリオ B . 2 は C . 2 で示される状況に、そしてシナリオ B . 3 は C . 3 で示される状況に至る。工程 D では、生体ユニットまたは生体分子は適切な条件下でそれぞれのバインダーに結合する。シナリオ C . 1 は D . 1 で示される状況に、シナリオ C . 2 は D . 2 で示される状況に、そしてシナリオ C . 3 は D . 3 で示される状況に至る。工程 E では、生体ユニットまたは生体分子は適切な手段により検出または同定される。E . 1 では、生体ユニットまたは生体分子は有効範囲またはコンパートメント内で検出または同定される。E . 2 では、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができるストレージ上または成分上に結合している間に、生体ユニットまたは生体分子は有効範囲またはコンパートメントの内部で検出または同定される。E . 3 では、生体ユニットまたは生体分子は、外部でまたは有効範囲またはコンパートメントの外側で検出または同定される。生体ユニットまたは生体分子は、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができるストレージ上または成分上に結合しているため、有効範囲またはコンパートメントはもはや必要ではない。

【 図 2 】 図 2 は、生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の中に存在することができる可能なシナリオの一部を説明する図である。パネル 1 (左側) では、生体ユニットまたは生体分子は単一の生物学的実体または細胞に結合しており、そこでは、(a) 両方の生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の内部に位置しているか、(b) 1 つの生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の表面上に位置し、1 つの生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の内部に位置するか、あるいは (c) 両方の生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の表面上に位置するかのいずれかである。パネル 2 (右側) では、生体ユニットまたは生体分子は異なる生物学的実体または細胞に結合しているが、相互作用によって連結されている。(a) では、生体ユニットまたは生体分子が生物学的実体または細胞の内部で位置し、生物学的実体または細胞の間で直接相互作用が形成される。(b) では、一方の生体ユニットまたは生体分子が一方の生物学的実体または細胞の内部に位置し、他方の生体ユニットまたは生体分子が他方の生物学的実体または細胞の表面上に位置し、生体ユニットまたは生体分

10

20

30

40

50

子と生物学的実体または細胞との間で相互作用が形成される。(c)では、両方の生体ユニットまたは生体分子が異なる生物学的実体または細胞の表面上に位置し、それによって相互作用が形成される。シナリオ(d)は(c)に類似しているが、生体ユニットまたは生体分子の間の相互作用が追加の分子によって可能になる。用語「生体分子」は、この図および以降の図において「生体ユニット」と交換可能である。

【図3】図3は、本発明の可能な用途を説明する図である。B細胞をヒトなどの個体から単離する。B細胞の一部を特定のアレルゲンで免疫する(あるいは代替的に、病原体を感染させるか、または何らかの他の手段によって疾患状態にする)。次いで、B細胞の免疫レパートリーをアレルゲンへの曝露前後に測定して、観察された差をその疾患によるものとみなす。

【図4】図4は、本発明の有効範囲またはコンパートメントの中への生物学的実体または細胞の捕捉を説明する図である。この図4の中で使用される記号および構造の意味は、図2と同一である。捕捉は、例えば、油中水型エマルジョンなどのエマルジョンを介して達成することができる(図4、パネルAを参照のこと)。捕捉はまた、例えば、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、またはシーケンシングチップのウェル中で達成することができる(図4、パネルBを参照のこと)。有効範囲またはコンパートメントは壁および蓋により形成される。ストレージは、バインダー、例えば抗体を含むビーズであってもよく、このバインダーは生体ユニットすなわち抗原に特異的である。あるいは、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、シーケンシングチップ、または前記容器の蓋は、それ自体ストレージであってもよく、またはストレージとして役立ってもよい。

【図5】図5は、本発明の方法の用途(対合末端シーケンシング)を説明する図である。リンカー配列を目的の遺伝子の両末端上に付ける。両リンカー配列に相補的な配列を含むタグを含むビーズにリンカー配列をハイブリダイズさせる。前記タグは、シーケンシング(x1、x2)のための開始点として役立つ核酸配列を追加して含む。それによって、両末端から核酸分子をシーケンシングすることができ、実質的により長いシーケンシングリードが得られる。

【図6】図6は、バインダーへのストレージのカップリングを示す図である。ここで、抗体はバインダーとして役立つ。抗体は、シーケンシングビーズのDNA断片(配列A')に相補的なDNA断片(配列A)をそのC末端に含む。抗体は相補的な核酸配列AおよびA'を介してビーズに結合する。

【図7】図7は、B細胞により例示された生物学的実体の捕捉を示す図である。抗体(実施例1の出力)を負荷したビーズを、B細胞、例えば特定の病原体に感染したか、または特定の疾患または障害を有する個体のB細胞と混合する。このB細胞に対して特異性を有する抗体がB細胞に結合し、それによってビーズ-抗体-B細胞複合体(中央)が形成される。B細胞を認識しない抗体は結合しないままである(上部)。同様に、いかなる抗体によっても認識されないB細胞は結合しないままである(下部)。

【図8】図8は、有効範囲またはコンパートメントの生成を示す図である。キャビティーのサイズにより、キャビティーは1つ以下のビーズを含有することができる。以下のシナリオが起こりうる:(1)キャビティーは、1つの細胞を有するビーズを含有する(左)、(2)キャビティーは、2つ以上の細胞を有するビーズを含有する(中央)、(3)キャビティーは、1つまたは複数の細胞を含有するが、ビーズを含有しない(右側)、そして(4)キャビティーは空である(図示せず)。

【図9】図9は、生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合および増幅を示す図である。詳細は実施例4で説明される。代替実施形態では、配列Aはキャビティーの壁または蓋に付着させることもできることに留意されたい。これは図9の左上隅に示される。

【図10】図10は、生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合および増幅を示す図である。詳細は実施例4で説明される。代替実施形態では、配列Aはキャビティーの壁または蓋に付着させることもできることに留意されたい。

【図11】図11は、生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合および増幅を示

10

20

30

40

50

す図である。詳細は実施例 4 で説明される。代替実施形態では、配列 A はキャピティの壁または蓋に付着させることもできることに留意されたい。

【図 1 2】図 1 2 は、核酸を例示とした、生体ユニットまたは生体分子を検出および同定する工程を示す図である。核酸領域 C は核酸配列 C' に相補的である。核酸領域 D は核酸配列 D' に相補的である。詳細は実施例 5 で説明される。

【図 1 3】図 1 3 は、2 つ以上の細胞を含むウェルからの配列データをさらなる分析から排除することができる方法を示す図である。2 つ以上の細胞を有するビーズを含有するキャピティからのシグナルは、シーケンシングが混合したシグナルを伝えることになるので、簡単には解釈することができない。そのようなキャピティは、実施例 6 に記載の較正配列の使用により同定することができる。2 つ以上の細胞を含むキャピティのシグナル強度は、較正配列で得られるシグナル強度とは異なり（下部を参照のこと）、混合したシグナルになる。

【図 1 4】図 1 4 は、油中水型エマルジョンが有効範囲を生成するために使用される、本発明の実施形態を示す図である。水滴が、細胞および PCR 混合物を有するビーズを含む（上部）。下部の図は、PCR 増幅後の最終結果を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、ライブラリー対ライブラリーのスクリーニング手法を概説する図である。詳細は実施例 8 で示される。

【発明を実施するための形態】

【0044】

一態様では、本発明は、2 つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

- (a) 前記 2 つの相互作用する生体分子を含む細胞を含む試料を準備する工程と、
 - (b) 前記生体分子の派生体を結合することができる成分を含むコンパートメントの中に前記細胞を空間分離する工程と、
 - (c) 細胞から生体分子を放出させる工程と、
 - (d) 前記生体分子 / ユニットの派生体を生成させる工程と、
 - (e) 前記生体分子の派生体がストレージに結合することを可能にする工程と、
- 生体分子の派生体を検出または同定する工程と

を含む方法を提供する。特定の態様では、前記試料は、前記 2 つの相互作用する生体分子を含む 2 つ以上の細胞を含む。好ましい態様では、前記 2 つの相互作用する生体分子は、前記 2 つ以上の細胞のうちの 1 つの細胞に含まれる。他の態様では、前記試料は、前記 2 つの相互作用する生体分子を含む少なくとも 2 つの細胞を含む。好ましい態様では、前記 2 つの相互作用する生体分子は、前記 2 つ以上の細胞のうちの 1 つの細胞に含まれる。好ましい態様では、前記 2 つの相互作用する生体分子は、前記 2 つ以上の細胞のうちの 1 つの細胞に含まれる。

【0045】

一態様では、本発明は、少なくとも 2 つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

- (a) 少なくとも 2 つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、
 - (b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体のためのストレージを追加して含むか、またはそれ自体がストレージである工程と、
 - (c) 場合によっては、生物学的実体から生体ユニットを放出させる工程と、
 - (d) 場合によっては、前記生体ユニットの派生体を生成させる工程と、
 - (e) 生体ユニットまたはそれらの派生体がストレージに結合することを可能にする工程と、
 - (f) 生体ユニットまたはそれらの派生体を検出または同定する工程と
- を含む方法を提供する。この方法は図 1 に示される。

【0046】

他の態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させる工程と、

10

(e) 生体ユニットまたは生体分子の派生体が、前記生体ユニットまたは生体分子の前記派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(f) 生体ユニットまたは生体分子の派生体を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0047】

工程(c)および(d)は任意選択であってよい。特定の実施形態では、工程(c)は必要ないこともある。これは、例えば、両方ともシーケンシングタグを含有する2つの抗体が同じ抗原の異なるエピトープに結合する場合である。そのような場合、抗体(すなわち、生体ユニットまたは生体分子)は、生物学的実体または細胞から予め放出されることなく、直接シーケンシング(すなわち、検出または同定)することができる。さらに、工程(d)は任意選択であってもよい。生体ユニットまたは生体分子を直接処理することができるか、またはさらなる処理のために生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させることができるかのいずれかである。これは特定の実施形態の下では有利となりうる。例えば、生体ユニットまたは生体分子それ自体が、相当不安定な場合(例えば、mRNA)、より安定な形態(例えば、DNA)への変換が好ましい。

20

【0048】

一態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

30

(b) 前記生物学的実体または前記細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させる工程と、

(e) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体が、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(f) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

40

【0049】

一態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または前記細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させる工程と、

50

(e) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体が、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(f) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0050】

代替態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させる工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子の派生体が、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(e) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0051】

代替態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を生成させる工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子の派生体が、前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(e) 生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0052】

さらなる代替態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離し、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子に結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生体ユニットまたは生体分子が、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0053】

さらなる代替態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉ま

10

20

30

40

50

たは空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子が、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(e) 生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0054】

さらなる代替態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生体ユニットが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0055】

さらなる代替態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記生物学的実体または細胞を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分を含む工程と、

(c) 生体ユニットが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0056】

本発明の少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子は、1つの生物学的実体の中に存在することができる。あるいは、本発明の少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子は、1つの細胞の中に存在することができる。特定の実施形態では、両方の生体ユニットまたは生体分子は、生物学的実体または細胞の内部に位置することができる。代替実施形態では、両方の生体ユニットまたは生体分子は、生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置することができる。さらなる代替実施形態では、一方の生体ユニットまたは生体分子は、生物学的実体または細胞の内部に位置することができ、他方の生体ユニットまたは生体分子は、生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置することができる。

【0057】

少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子はまた、任意の方法または形態で互いに相互作用する2つの生物学的実体または細胞の中に存在することができる。特定の実施形態では、第1の生体ユニットまたは生体分子は、第1の生物学的実体または細胞の内部に位置し、第2の生体ユニットまたは生体分子は、第2の生物学的実体または細胞の内部に位置する。他の実施形態では、第1の生体ユニットまたは生体分子は、第1の生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置し、第2の生体ユニットまたは生体分子は、第2の生物学的実体または細胞の内部に位置する。さらに他の実施形態では、第1の生体ユニットまたは生体分子は、第1の生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置し

10

20

30

40

50

、第2の生体ユニットまたは生体分子は、第2の生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置する。さらに他の実施形態では、第1の生体ユニットまたは生体分子は、第1の生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置し、第2の生体ユニットまたは生体分子は、第2の生物学的実体または細胞の上にまたはその外部に位置し、かつ2つの生体ユニットまたは生体分子は、第3の分子、例えば第1の生体ユニットまたは生体分子および第2の生体ユニットまたは生体分子の両方に結合する生体ユニットまたは生体分子を介して間接的に相互作用している。図2に、可能なシナリオの一部を図示する。

【0058】

これらの技術領域で使用される従来技術の方法には、酵母ツーハイブリッドシステム、酵母スリーハイブリッドシステム、SIP技術（自己感染性ファージ）、PCAアッセイ（タンパク質-断片相補性アッセイ）、およびスプリット-ユビキチンシステムが挙げられる。これらのアッセイおよびシステムはすべて、読み取りシグナルの高いバックグラウンドノイズが受け、不満足なシグナル対バックグラウンド比がもたらされる。ほとんどの場合、これは、これらのシステムで起こる非特異的な相互作用によるものである。読み取りシグナルの定量化によって、例えばカラー強度またはコロニーサイズの測定によって、これらの問題を回避することは、部分的にしか成功しておらず、依然として厄介で誤りが多いものとなっている。本発明は、これらの欠点に対して簡潔な解決法を提供する。数千または数百万もの相互作用または事象を分析することにより、統計的に有意な読み取りシグナルを受け取る問題は、分析される相互作用または事象の数を増加させることにより解決される。本発明は、大量の読み取りシグナルを分析することができるハイスループット法を提供する。これは、例えば、それぞれの表現型読み取りシグナルが低いシグナル対バックグラウンド比になる場合に、遺伝子型レベルで達成することができる。

【0059】

本発明はまた、ライブラリー対ライブラリー用途、例えば1つのライブラリーのメンバーと2番目のライブラリーのメンバーとの間の相互作用に対するスクリーニングで使用することができる。一例として、感染または疾患に応答したヒトの免疫レパートリーなど、生体の免疫応答を測定することができるであろう。統計的に有意でかつ満足すべき方法における免疫応答全体の複雑な分析は、本発明に記載の方法によってのみ可能になった。それぞれの実験手法を図3に示す。

【0060】

特定の態様では、前記生体ユニットは、サブクラスであるポリペプチド、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂肪酸、小分子、細胞小器官、細胞、組織、または前述のいずれかの派生体、一部、もしくは組合せからなる群から選択される。特定の態様では、すべての生体ユニットは同じサブクラスに由来する。特定の態様では、生体ユニットは異なるサブクラスに由来する。特定の態様では、前記サブクラスは、ポリペプチドのサブクラスまたは核酸のサブクラスである。特定の態様では、前記サブクラスは、ポリペプチドのサブクラスである。

【0061】

特定の態様では、前記生体ユニットは生体分子である。特定の好ましい態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドである。代替態様では、前記生体分子は、DNAまたはRNAなどの核酸である。前記核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。DNA分子は、RNAまたはDNAの鋳型から合成することができることは理解されよう。同様に、RNA分子も、RNAまたはDNAの鋳型から合成することができる。

【0062】

特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、多量体のタンパク質または酵素の一部である。特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、多量体のタンパク質または酵素の一部であるポリペプチドである。特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、多量体のタンパク質または酵素の一部をコードする核酸である。特定の態様では、前記多量体タンパク質は、免疫グロブリンまたはその機能性断片である。特定の

態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、免疫グロブリンまたはその機能性断片の可変重鎖および可変軽鎖をコードする遺伝子である。

【0063】

特定の態様では、本発明で使用される試料は、血液、骨髓、腫瘍、単一細胞生物、原核生物、または体液に由来した試料である。特定の態様では、前記試料は患者に由来する試料であり、前記患者は、健常患者、免疫患者、感染患者、または疾患もしくは障害を有する患者である。

【0064】

特定の態様では、本発明で使用される生物学的実体は、単一細胞である。特定の態様では、前記単一細胞は単一B細胞である。

10

【0065】

特定の態様では、生物学的実体は、別の細胞、ウイルス、細菌、分子、もしくは生体分子、または前述のいずれかの派生体、断片、もしくは複合物と相互作用する細胞である。特定の態様では、生物学的実体は、細胞、および前記細胞に感染するウイルスである。特定の態様では、生物学的実体は、細胞、および前記細胞に感染する細菌である。特定の態様では、生物学的実体は、細胞および別の細胞である。前記細胞は、ドナーおよびアクセプターの観点から、エフェクターおよび作用を受ける実体の観点から、または阻害剤および阻害される細胞の観点から互いに情報交換することができる。

【0066】

特定の態様では、生物学的実体は、2つの化学的および/または生物学的ライブラリー（例えば、ファージライブラリーまたはリボソームディスプレイライブラリーなど）の混合物を含み、そこでは、第1ライブラリーの少なくとも1つのメンバーが、第2ライブラリーのメンバーと相互作用または結合する。特定の態様では、第1ライブラリーの各メンバーは、第1ライブラリーに特異的なタグを含み、第2ライブラリーは、第2ライブラリーに特異的なタグを含む。

20

【0067】

特定の態様では、生物学的実体は、少なくとも1つの化学的および/または生物学的ライブラリー（例えば、ファージライブラリーまたはリボソームディスプレイライブラリーなど）の少なくとも2つのメンバーと相互作用または結合する分子を含む。特定の態様では、ライブラリーの各メンバーは、前記ライブラリーに特異的なタグを含む。

30

【0068】

代替態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程と、

(c) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

40

(d) 生体ユニットまたは生体分子が、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(e) 前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0069】

代替態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

50

(b) 前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程と、

(c) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子が、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(e) 前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

10

【0070】

代替態様では、本発明は、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる工程と、

(c) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

20

(d) 生体ユニットまたは生体分子が、有効範囲またはコンパートメントに結合することを可能にする工程と、

(e) 有効範囲またはコンパートメント上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0071】

代替態様では、本発明は、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 前記2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む生物学的実体または細胞を含む試料を準備する工程と、

30

(b) 前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントが、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる工程と、

(c) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(d) 生体ユニットまたは生体分子が、有効範囲またはコンパートメントに結合することを可能にする工程と、

(e) 有効範囲またはコンパートメント上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

40

【0072】

一工程では、本発明の方法は、有効範囲またはコンパートメントの中への、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子のためのストレージを含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞の捕捉を含む。前述のストレージは、前記生体ユニットもしくは生体分子またはそれらの派生体を結合することができる成分である。特定の実施形態では、前記ストレージは、前記生体ユニットまたは生体分子を結合することができる成分である。他の実施形態では、前記ストレージは、前記生体ユニットまたは生体分子の派生体を結合することができる成分である。

【0073】

前記生物学的実体または細胞、生体ユニットまたは生体分子、およびストレージの捕捉

50

または空間分離は、捕捉または空間分離された生体ユニットまたは生体分子のその後の検出を可能にする任意の方法または形態で達成することができる。特定の実施形態では、これは、例えば油中水型エマルションなどのエマルションを介して達成することができる（図4、パネルAを参照のこと）。このような実施形態では、生物学的実体を細胞とすることができ、生体ユニットまたは生体分子をDNA配列（例えば、抗体の可変重鎖および可変軽鎖）とすることができ、ストレージをプライマーとすることができ（例えば、抗体の可変重鎖に結合する1つのプライマーおよび同じ抗体の可変軽鎖に結合する別のプライマー）。油中水型エマルションの代わりとして、水中油型エマルションを使用することができ、それによって有効範囲またはコンパートメントとして役立つミセルが形成される。他の実施形態では、前記生物学的実体または細胞、生体ユニットまたは生体分子、およびストレージの捕捉または空間分離は、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、またはシーケンシングチップのウェルにおいて達成することができる（図4、パネルBを参照のこと）。有効範囲またはコンパートメントは壁および蓋により形成される。そのような実施形態では、生物学的実体を細胞とすることができ、生体ユニットまたは生体分子を抗原とすることができ、ストレージを、例えば、生体ユニット、すなわち抗原に特異的な抗体とすることができ。あるいは、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、シーケンシングチップ、または前記容器の蓋は、それ自体ストレージであってもよく、またはストレージとして役立つもよい。さらに、ストレージは少なくとも2つのバインダー、例えばプライマーを含む。

10

20

【0074】

本発明の特定の態様では、前記有効範囲またはコンパートメントは、キャビティー、ウェル、エマルション、相境界システム、疎水性スポット、粒子、固相粒子、物理力、または化学的架橋により形成される。本発明の特定の態様では、前記相境界は、空気中の水滴のように水と気体の間の相分離によって、または油中の水滴のように水と液体の間の相分離によって、またマイクロタイタープレート中の水滴のように固相によって実現される。本発明の特定の態様では、前記キャビティーまたは前記ウェルは、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または微小構造基材の上にある。本発明の特定の態様では、前記有効範囲は、化学的架橋で形成され、前記化学的架橋はホルムアルデヒドによる架橋である。

30

【0075】

本発明の特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体に対する前記ストレージは、限界希釈によってまたはセルソーティングなどの任意の手段によるソーティングによって、有効範囲またはコンパートメントの中に捕捉または空間分離される。

40

【0076】

本発明の特定の態様では、有効範囲またはコンパートメントは、エマルションにより形成され、前記エマルションは、油中水型または水中油型のエマルションである。

【0077】

本発明の特定の態様では、有効範囲またはコンパートメントは、粒子または固相粒子により形成され、前記粒子は、シリカ、ガラス、アガロース、ポリマー、金属酸化物、またはそれらの複合物からなる。

40

【0078】

本発明の特定の態様では、有効範囲またはコンパートメントは、物理力により形成され、前記物理力は、静電力、電磁力、誘電泳動力、電磁力、磁気、光学、温度、または密度効果である。本発明の特定の態様では、有効範囲またはコンパートメントは、光ピンセットにより生成される。

【0079】

本発明の特定の態様では、有効範囲またはコンパートメントは、ネブライザーにより形成される。

【0080】

50

本発明の特定の態様では、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる前記ストレージまたは前記成分は、ビーズ、スライドガラスの表面上領域、マイクロタイタープレートもしくはピコタイタープレートのウェル、電場もしくは磁場、フィールド勾配もしくはフィールドケージ、または前述のいずれかの蓋上領域もしくは分離可能表面である。

【0081】

本発明の特定の態様では、生物学的実体または細胞からの生体ユニットまたは生体分子の放出は、化学的または物理的条件の変化により行われる。特定の態様では、化学的条件の変化は、pH変化、塩濃度の変化、酵素の添加、または細胞溶解剤の添加である。特定の態様では、物理的条件の変化は、加熱、凍結、電場、磁場もしくは誘電場の印加、剪断力または遠心力、機械的変形、弛緩、超音波、または任意の物理的な破断作用である。特定の態様では、物理的条件の変化は、加熱、例えば90を超る加熱である。特定の態様では、前記物理的条件の変化は、溶液への粒子の溶解、生体ユニットまたは生体分子のまわりの保護シェルの溶解、または酵素による誘導など、時間依存的にもたらされる。

10

【0082】

別の工程では、本発明の方法は、生体ユニットまたは生体分子が、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができるストレージまたは成分に結合することを可能にする工程を含む。この工程は、前記ストレージまたは前記成分への生体ユニットまたは生体分子の結合を可能にするのに十分な時間および方法で、生体ユニットまたは生体分子をインキュベートする工程を含む。こうすることにより、生体ユニットまたは生体分子は、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができるストレージまたは成分により捕捉される。生体ユニットまたは生体分子の結合は、直接的であっても、生体ユニットまたは生体分子の派生体を介して間接的であってもよい。直接的結合は、例えばPCRまたは直接反応を介して達成することができる。間接的結合は、生体ユニットまたは生体分子の派生体の生成、およびそのような派生体を結合することができるストレージまたは成分への前記派生体の結合によって達成することができる。一例は、RNAからのcDNA鋳型の生成、およびストレージ、例えばプライマーへのcDNAの結合である。

20

【0083】

したがって、本発明の特定の態様では、工程(d)は、前記生体ユニットまたは生体分子のレプリケートまたは派生体の生成をもたらす増幅反応を含む。本発明の特定の態様では、前記増幅反応は、PCRまたはRT-PCRであり、前記PCRまたはRT-PCRの間に、前記レプリケートまたは派生体がそのような派生体を結合することができるストレージまたは成分に結合することを可能にする[第1の]タグが加えられる。本発明の特定の態様では、前記PCRまたはRT-PCRの間に、PCR産物またはRT-PCR産物のその後のシーケンシングを可能にする第2のタグが加えられる。本発明の特定の態様では、PCR反応はエマルジョンPCR反応である。代替態様では、RT-PCR反応はエマルジョンRT-PCRである。本発明の特定の態様では、検出される2つの核酸分子は、本方法の工程(d)で増幅される。

30

【0084】

別の工程では、本発明の方法は、生体ユニットまたは生体分子を結合することができるストレージ上または成分上の生体ユニットまたは生体分子を検出する工程を含む。これは、検出される生体ユニットまたは生体分子について公知の任意の適切な検出方法によって達成することができ、使用される方法は、生体ユニットまたは生体分子それ自体の性質に主として依存する。例としては、並行または連続して実施される(少なくとも)2つのイムノアッセイ、少なくとも2つの色素による並行染色、及び並行シーケンシングがある。

40

【0085】

本発明の特定の態様では、生体ユニットまたは生体分子の検出は、DNAシーケンシングにより行われる。本発明の特定の態様では、前記DNAシーケンシングは、PCR産物またはRT-PCR産物を連続または並行してシーケンシングすることにより行わ

50

れる。本発明の特定の態様では、前記DNAシーケンシングは、ストレージ上またはストレージのコピー上のPCR産物またはRT-PCR産物をシーケンシングすることにより行われる。本発明の特定の態様では、検出される生体ユニットまたは生体分子は核酸分子であり、種々の開始プライマーが核酸分子のシーケンシングおよび同定のために使用される。本発明の特定の態様では、シーケンシング反応は、エマルジョンPCRにより、好ましくはビーズ上で直接行われる。本発明の特定の態様では、2つのシーケンシング反応は、連続して行われる。例えば、第1のシーケンシングプライマーを利用する第1のシーケンシング反応、および第2のシーケンシングプライマーを利用する第2のシーケンシング反応である。特定の実施形態では、第1の核酸分子は、免疫グロブリン、抗体、またはその断片の重鎖をコードし、第2の核酸分子は、免疫グロブリン、抗体、またはその断片の軽鎖をコードする。

10

【0086】

本発明の方法の検出工程がシーケンシングにより行われる場合、特定の技術的変法が可能である。例えば、第2のシーケンシング反応のためのプライマーを酵素的に切断可能な保護基に連結することができよう。これは、保護基の切断の後でのみ、第2の核酸分子をシーケンシングすることが可能になることを保証する。これはシーケンシングエラーを低減するであろう。あるいは、第2のシーケンシングプライマーを続けて、すなわち第1のシーケンシング反応が行われた後に加えることができる。さらに、特定の核酸モチーフを使用して、検出される核酸分子に結合させることができる。これらの核酸モチーフを一種の「ZIPコード」でを使用して、核酸分子を同定またはマークする。

20

【0087】

本発明の方法で 사용할 ことができる代表的なシーケンシングシステムには、GS FLX 454システム(Rocher)およびHiSeq2000システム(Illumina)が含まれる。

【0088】

本発明の特定の態様では、試料は、少なくとも 10^3 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^9 、または少なくとも 10^{12} の生物学的実体または細胞を含む。本発明の特定の態様では、前記生物学的実体または細胞のそれぞれの中に、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも500、または少なくとも1000の生体ユニットまたは生体分子が検出される。本発明の特定の態様では、試料は、少なくとも 10^3 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^9 、または少なくとも 10^{12} の生物学的実体または細胞を含み、前記生物学的実体または細胞のそれぞれの中に、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも500、または少なくとも1000の生体ユニットまたは生体分子が検出される。

30

【0089】

本発明の特定の態様では、前記生物学的実体もしくは細胞の中の前記少なくとも2つの生体ユニットもしくは生体分子の存在について、または前記2つの生体ユニットもしくは生体分子の相互作用についての相関が統計的に分析および決定される。適切な統計分析ツールは当業者に公知である。適切な統計ツールの非限定例としては、ブラベ-ピアソンによるまたはスピアマンによる共分散または相関係数の分析または決定が挙げられる。

40

【0090】

本発明の特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、粒子にハイブリダイゼーションにより結合する核酸であり、前記粒子は、工程(e)におけるシーケンシングのために使用される。

【0091】

本発明の特定の態様では、前記生体ユニットまたは生体分子は、粒子の表面に直接結合するポリペプチド、ペプチド、またはタンパク質であり、前記粒子上の前記生体ユニットまたは生体分子は、工程(e)においてイムノアッセイにより検出される。

【0092】

50

特定の実施形態では、本発明は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子のためのストレージを含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程と、

(b) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(c) 生体ユニットまたは生体分子がストレージに結合することを可能にする工程と、

(d) ストレージ上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

10

【0093】

代替実施形態では、本発明は、生物学的実体または細胞における、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子のためのストレージを含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程と、

(b) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(c) 生体ユニットまたは生体分子がストレージに結合することを可能にする工程と、

(d) ストレージ上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

20

【0094】

他の実施形態では、本発明は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントがストレージでもある工程と、

(b) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(c) 生体ユニットまたは生体分子がストレージに結合することを可能にする工程と、

(d) ストレージ上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

30

【0095】

他の実施形態では、本発明は、生物学的実体または細胞における、2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

(a) 有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子を含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントがストレージでもある工程と、

(b) 場合によっては、生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

(c) 生体ユニットまたは生体分子がストレージに結合することを可能にする工程と、

(d) ストレージ上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

40

【0096】

前記少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子は、互いに相互作用しても、相互作用しなくてもよい。前記生体ユニットまたは生体分子は、それぞれの生物学的実体、例えば細胞の中に存在するだけでよく、互いに直接相互作用しなくてもよい。しかしながら、それらは、例えば特定の遺伝子の発現およびそれぞれのポリペプチドのその後の産生を誘発する刺激など、共通の事象を介して連結することができる。前記生体ユニットまたは生体分子は、互いに相互作用する生体ユニットまたは生体分子であってもよい。例としては

50

、互いに結合するか、互いとまたは第3の分子を介して複合体を形成する2つのポリペプチドがある。別の例としては、多量体タンパク質（例えば、抗体などの免疫グロブリンの可変重鎖および可変軽鎖）のサブユニットがある。

【0097】

少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子が互いに相互作用する場合、本発明によって提供される方法は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

（a）有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子および前記生体ユニットまたは生体分子のためのストレージを含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程と、

（b）生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

（c）生体ユニットまたは生体分子がストレージに結合することを可能にする工程と、

（d）ストレージ上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法として言い直すことができる。

【0098】

あるいは、本発明は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

（a）有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子および生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分を含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程と、

（b）生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

（c）生体ユニットまたは生体分子が、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

（d）生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分上の生体ユニットまたは生体分子を検出または同定する工程とを含む方法を提供する。

【0099】

代替実施形態では、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子が互いに相互作用する場合、本発明によって提供される方法は、生物学的実体または細胞における、少なくとも2つの生体ユニットまたは生体分子の相互作用の検出のための方法であって、前記方法が、

（a）有効範囲またはコンパートメントの中に、少なくとも2つの相互作用する生体ユニットまたは生体分子を含む少なくとも1つの生物学的実体または細胞を捕捉または空間分離する工程であって、前記有効範囲またはコンパートメントがストレージでもある工程と、

（b）生物学的実体または細胞から生体ユニットまたは生体分子を放出させる工程と、

（c）生体ユニットまたは生体分子が、生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

（d）生体ユニット、生体分子、またはそれらの派生体を結合することができる成分上の生体ユニットまたは派生体を検出または同定する工程とを含む方法として言い直すことができる。

【0100】

この方法は、第1ライブラリーに含まれる生体ユニットまたは生体分子と第2ライブラリーに含まれる生体ユニットまたは生体分子との間の相互作用のスクリーニングに適合させることができる。主として、例えば、所与の生体または細胞の中のタンパク質-タンパク質相互作用をすべて同定することが可能である。

【0101】

本発明の特定の実施形態では、特に、生体ユニットまたは生体分子がそれぞれのライブラリーに含まれる場合に、ディスプレイ技術が、本発明の生体ユニットまたは生体分子を

提示するために使用される。ファージディスプレイ技術およびリボソームディスプレイ技術は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドなどのタンパク質性の生体ユニットまたは生体分子のディスプレイに特に有用である。

【0102】

本明細書において上記のように、本発明を使用して、生体ユニットまたは生体分子の第2ライブラリーに対して、生体ユニットまたは生体分子の第1ライブラリーをスクリーニングすることができる。これは、第1ライブラリーの生体ユニットまたは生体分子と第2ライブラリーの生体ユニットまたは生体分子との間のすべての相互作用の同定に導く。

【0103】

このようなライブラリー対ライブラリー手法の別の適用は、両方が共通のターゲットタンパク質に結合する2つの生体ユニットまたは生体分子の同定である。そのように同定された生体ユニットまたは生体分子は、同じターゲット分子であるが、前記ターゲット分子の異なるエピトープに結合することになる。そのような生体ユニットまたは生体分子のそれぞれの対は、例えば、ELISAアッセイに有用である。実験的には、タグを含むターゲット分子を、2つのライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーとともに、前記ライブラリーのメンバーが前記ターゲット分子に結合することを可能にする条件でインキュベートする。ターゲット分子と、前記ターゲットに結合する、前記ライブラリーのファージディスプレイメンバーとを含む複合体は、ビーズに親和性を有する前記ターゲット分子上のタグを介して単離される。本発明に記載のさらなる処理は、ターゲット分子に同時に、すなわち同時かつ互いに干渉することなく、結合する2つの生体ユニットまたは生体分子の同定に導くことになる。本発明で唯一可能となる、高い冗長性およびハイスループットにより、従来技術の同様の実験で同定されることが極めて多い、非特異的または粘着性バインダーの同定の問題が解決される。

【0104】

ライブラリー対ライブラリー手法の別の適用は、酵素の1つのイソ酵素形態にのみ相互作用または結合する生体ユニットまたは生体分子の同定である。例えば、生体ユニットまたは生体分子の第1ライブラリーを、所与の酵素の第1のアイソフォームとインキュベートする。次いで、生体ユニットまたは生体分子の第2ライブラリーを前記酵素の第2のアイソフォームとインキュベートする。ここで前記第2ライブラリーのメンバーはタグを含む。次いで、第1ライブラリーが第2ライブラリーより過剰に存在するように、2つのライブラリーを混合する。次に、タグに親和性を有するビーズを加えて、第1のアイソフォームには結合せずに第2のアイソフォームにのみ結合するファージを単離する。

【0105】

ライブラリー対ライブラリー手法の別の適用は、細菌、例えば様々な種または亜種の細菌の混合集団に対する抗体ライブラリーのスクリーニングである。細菌の集団を抗体ライブラリーと混合する。ここで、それぞれの抗体はDNAタグを含む。DNAタグを介して抗体-細菌複合体を単離する。単離された細菌は、その16S rRNAまたは細菌の遺伝子同定に適した任意の他の配列のシーケンシングにより同定することができる。これは、混合集団から単離された特定の細菌に特異的な抗体の同定に導くことになり、同時に、細菌の種および亜種についての情報を収集することができる。

【0106】

この方法の他の使用には、酵母ツーハイブリッド及び酵母スリーハイブリッド用途での使用がある。統計的に意味のあるデータ分析を可能にする、高度に並行形態の本発明の技術に大きな利点がある。本発明の方法の文脈中使用することができる他の適切な技術としては、SIP技術（自己感染性ファージ）、PCA（タンパク質相補性アッセイ）、またはタンパク質-タンパク質、若しくはタンパク質-リガンドの相互作用、例えば病原体-宿主、宿主-共生体、もしくは宿主-寄生体の相互作用の同定に適した他の技術がある。

【0107】

さらに、本発明を使用して、同時に、例えば特定の刺激または環境における特定の条件

10

20

30

40

50

の変化に応答して、発現される遺伝子を同定することができる。そのような分析は、定性的または定量的に実施することができる。定量的分析は、本発明が使用することができる高度な並行形態によって可能である。

【0108】

分析される細胞または他の生物学的実体は、癌細胞であっても、特定の病原体に感染した細胞であっても、特定の医薬品で処理された細胞であってもよい。本発明の方法で検出することができる事象としては、遺伝子またはポリペプチドの共発現、例えば感染に応答した特定遺伝子の発現の検出、細胞の抵抗性パターン、異なる組織における細胞の差次的発現が挙げられる。

【0109】

さらに本発明を使用して、B細胞などの細胞、組織、または生体のイムノームを同定しかつ特徴づけることができる。具体的には、免疫グロブリンのいずれの可変重鎖がいずれの可変軽鎖と対になるかを同定することが可能である。この情報を使用して、生体の免疫レパートリーを特徴づけることができる。さらに、このような情報を使用して、健常患者の免疫レパートリーを病人または感染患者の免疫レパートリーと比較することができる（図2を参照のこと）。

【0110】

さらに、本発明を使用して、経路を同定、精査、および特徴づけることができる。所与の経路にある2つ以上の遺伝子の定量的シーケンシングは、例えば薬物ライブラリーの作用様式を評価するための標準として使用することができる。薬物の効果は、転写物の定量により直接測定することができる。レポーター遺伝子による間接的かつ不正確な定量は必要ではない。

【0111】

さらに、本発明を使用して、核酸シーケンシングに関連した困難および落とし穴を克服することができる。明らかに、本発明は、ハイスループットかつ高度な並行シーケンシングの利点を提供する。これは、全ゲノム、イムノーム、またはSNP（一塩基多型）の分析など、高度に複雑な配列集団の生成を可能にする。さらに、本発明の中ですでに論述されているように、前処理対後処理、健常対病人、または比較する必要のある核酸分子の任意の他のプールなど、核酸分子の異なる集団を比較することが可能である。

【0112】

本発明はまた、読み取りの長さにおける標準シーケンシング技術の能力に限界があるという問題点を克服する。それぞれのハイブリダイゼーションプライマーを使用することにより、あるいはシーケンシングされる遺伝子の公知の配列ストレッチを代替的に使用することにより、両末端からそれぞれの核酸分子をシーケンシングし、それによって共通の読み取り長を基本的に再現することが可能になる（図5を参照のこと）。

【0113】

本発明の別の可能性は、酵素鎖の同定および特徴づけである。細胞に2つの異なるプラスミドを形質移入する：プラスミド#1はタグ#1を含む酵素#1をコードし、プラスミド#2はタグ#2を含む酵素#2をコードする。有効範囲またはコンパートメントの中に細胞を捕捉または空間分離して溶解する。次いで、両方のタグ、すなわちタグ#1およびタグ#2に対して特異性を有するビーズを使用して、それぞれの酵素を捕捉する。次いでビーズについて酵素活性を試験する。例えば、酵素#1の基質を加え、その基質を酵素#1によりそれぞれの第1生成物に変換する。この第1生成物を直接検出することができない場合には、別の検出可能な、酵素#2による生成物にさらに変換することができる。すなわち、第1の酵素反応の生成物は、第2の酵素反応のための遊離体になり、最終生成物が検出可能な、例えば蛍光物質になる。さらに、この方法の変法を使用して、天然または合成の補酵素の同定、細胞内のイソ酵素の検出および/またはイソ酵素比の定量、補因子、補酵素、もしくはアロステリック阻害物質などの阻害物質の同定を行うことができる。

【0114】

本発明の他の可能性として、試料または患者のMHCアイソタイプの決定、または特定

10

20

30

40

50

の性質を有するMHC反応性抗体、例えばT細胞応答を抑制または促進するMHC反応性抗体の同定を目的とするMHCスクリーニングなど、MHCに関する検討が挙げられる。

【0115】

本発明のさらに他の用途は、DNAまたはRNAなどの核酸、プロモーター、アクチベーター、サイレンサー、または調節エレメントなどの任意の他の因子の結合モチーフの決定および特徴づけに関するものである。これには、遺伝子療法などのsiRNAベースの介入のための結合モチーフのスクリーニングが含まれる。他の関連する使用は、アプタマースクリーニングに関するものである。

【0116】

本発明のさらに他の用途は、目的の所与の分子のターゲット分子、例えばターゲットタンパク質の同定に関するものである。さらに、公知の相互作用に対する分子の効果、例えば、患者の第1ポリペプチドと第2ポリペプチドの間の公知の相互作用に対して、特定の化合物が有する効果を研究することも可能である。

10

【0117】

本発明のさらに他の用途は、卵母細胞または精細胞などの生殖細胞の分析に関するものである。これには、例えば胚の性別の判定または遺伝的素因に関する判定を目的とした、1つまたは複数の遺伝子または1つまたは複数の対立遺伝子の同定が含まれる。

【0118】

本発明のさらに他の用途は、一般に、阻害物質、誘導物質、変異、または観察されるもしくは観察を目的とする特定の効果を誘発するかまたはそれに関連する任意の他の変化の同定に関するものである。

20

【0119】

本発明の方法は、種々のタイプのアッセイ、例えばイムノアッセイに組み込むことができる。したがって、特定の態様では、本発明は、本発明の方法のいずれかを組み込むかまたは利用するアッセイ、例えばイムノアッセイを提供する。

【0120】

特定の態様では、本発明は、本発明の方法またはイムノアッセイを実施するための装置を提供する。

【0121】

特定の態様では、本発明は、本発明の方法またはイムノアッセイを実施するための装置および説明書を含むキットを提供する。

30

【0122】

さらに他の態様では、本発明の方法は、特定の情報、製品、または後に続く種々の方法のためにそれら自体使用することができる特定の製品についての情報を提供する。

【0123】

本発明が提供する方法は、数多くの用途に適合させることができる。

【0124】

特定の態様では、本発明は、細胞における、2つ以上の生体分子の検出のための方法を提供する。前記細胞を、検出される生体分子が同じ細胞に由来するという情報を保持させるために分離する。特定の態様では、前記生体分子の派生体を生成させることが好ましい。本発明の特定の態様では、前記細胞中に検出される生体分子は、前記細胞中で互いに相互作用する。後者の態様に対する例としては、多量体酵素のサブユニット、例えば免疫グロブリンまたはその断片の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの検出がある。

40

【0125】

任意の生体分子をこの方法で検出することができる。好ましい生体分子は、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質などのポリペプチド性生体分子、ならびにリボ核酸またはデオキシリボ核酸などの核酸である。本発明による典型的な派生体は、逆転写(transcription)RNA分子、例えばmRNAにより調製されるcDNA分子である。これにより、検出することができる、極めて安定な分子がもたらされるだけでなく、同時に、検出される生体分子または派生体のコピー数を増加させるために、例えばPCRによ

50

りその分子を増幅し、それによってそれぞれの方法の感度を増大させることができる。これは、生体分子またはその派生体を結合し、それによってその後の分析および検出のためにコンパートメントの中に生体分子または派生体を保持することができる成分によりさらに容易になる。

【 0 1 2 6 】

本発明のこの態様に含まれる例としては、例えばB細胞における、抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸の検出が挙げられる。成熟B細胞は、1つの抗体種を生成し、それによって大量の各自のmRNAを生成する。多数のB細胞（例えば、特定のタイプの疾患または障害を有する患者のB細胞の代表的な大集団）における、重鎖および軽鎖をコードするmRNAの検出によって、いずれの重鎖mRNAおよびいずれの軽鎖mRNAがそのような細胞によって生成されるかについての情報が提供されるだけでなく、個々それぞれのB細胞において、抗体のいずれの重鎖がいずれの軽鎖と対になるかについての価値ある情報も提供される。これは、直接デノボ合成し、それぞれの抗体について、効果、例えば治療効果を試験するための理論的根拠を提供する。

10

【 0 1 2 7 】

同様に、任意の他のmRNA分子も、同じ手法により検出することができる。本発明の方法で達成することができるハイスループットにより、調査される特定の疾患、障害、または任意の他の症状と特定のmRNAの出現を関連づけることを可能にする統計分析を使用することができる。したがって、この方法は、そのような疾患、障害、または症状のためのバイオマーカーの同定に適している。

20

【 0 1 2 8 】

そのようなバイオマーカーが既知の場合、本発明を使用して、任意の所与の試料、例えば、喀痰、唾液、髄液、血液、または任意の他の体液など、患者から得られる試料の中のようなバイオマーカーの出現または存在を同定することができる。この方法のハイスループットにより、そのような試料中の特定のバイオマーカーの存在を定量することが可能になる。例えば、特定の疾患では、特定のバイオマーカーを保持する細胞の数、すなわち全細胞数の中の割合を理解することが重要である。そのような情報は、癌など数多くの疾患の病期分類およびモニタリングの基礎になり、使用される治療に直接関係する。

【 0 1 2 9 】

共出現するmRNA種細胞の検出の他の用途は、当業者には、自ずと明らかであろう。

30

【 0 1 3 0 】

本発明はまた、細胞における2つ以上のDNA種の検出を提供する。例えば、第1のDNA種を第1の遺伝子または遺伝子断片とすることができ、第2のDNA種を第2の遺伝子または遺伝子断片とすることができる。そのような遺伝子断片は、一塩基多型（SNP）であっても他のゲノムマーカーであってもよい。したがって、本発明によれば、2つ以上のSNPまたは他のゲノムマーカーの出現を検出することができる。多数のマーカーを検出する場合、本発明は、患者からの試料など、任意の所与の試料におけるDNA試料を同時にスクリーニング、検出、または特徴づけるための方法を提供する。したがって、本発明の方法は、遺伝物質を特徴づけるための便利な方法を提供する。そのような情報は、診断および医療分野に有用である。例えば、特定の抵抗性マーカーの検出は、異なる治療オプションについて決定する際に価値あるパラメーターとなる。多くの白血病およびリンパ腫では、そのような抵抗性マーカーのパーセントが時間経過とともに増加する。したがって、本発明の方法は、前記抵抗性マーカーを定量し、それによって適切な治療オプションを指示する価値あるツールを提供する。T細胞受容体、補体、免疫系の他の可変部分、または遺伝子モザイクの特徴づけなど、特定の遺伝子の編成または再編成の特徴づけおよび定量を含む、同様の他の使用が可能である。

40

【 0 1 3 1 】

他の態様では、本発明の方法を使用して、DNAメチル化パターンの検出および特徴づけを行うことができる。そのようなメチル化パターンもまた、疾患進行および治療オプションのための価値あるマーカーとなる。

50

【0132】

本発明はまた、細胞における2つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の検出を提供する。本明細書において上記されているように、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質もまた、特定の疾患、障害、症状、または特定の病期のための指標となる。したがって、2つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の同時検出もまた、多くの用途のための価値あるツールとなる。

【0133】

特定の実施形態では、本発明は、2つ以上の生体分子の相互作用を検出するための方法を提供する。特定の態様では、前記生体分子の相互作用が細胞の中に存在する。他の態様では、前記生体分子の相互作用が、細胞外部に、細胞表面上に、または無細胞環境中に存在する。図2にいくつかのシナリオを示す。例えば、本発明の方法を使用して、細胞-細胞相互作用、抗体-抗原相互作用、例えば、ファージディスプレイライブラリーと抗原との相互作用、または細胞とホルモン、増殖因子、または他の分子などの他の生体分子との相互作用を検出および同定することができる。

【実施例】

【0134】

実施例1：ストレージおよびバインダーのカップリング

シーケンシングビーズは、特定配列（これ以降、配列A）の小型アダプター連結一本鎖DNA断片を含有する。代表的なビーズは、454 Life Sciences（現在、Rocheの子会社）製のシステムによるシーケンシングのために購入することができるものである。あるいは、任意の他のビーズを購入して、特定配列のDNA断片を負荷することができる。小型アダプター連結一本鎖DNA断片を負荷されたそのようなビーズは、ストレージとして役立つ。

【0135】

バインダーとして、シーケンシングビーズ（配列A'）のDNA断片に相補的なDNA断片（配列A）を、そのC末端またはそのN末端に含む抗体を使用する。そのような抗体は市販されているか、またはデノボ生成することができる。この実施例では、B細胞に特異的な抗体を使用する。これにより、選択の抗体（ここでは、B細胞に特異的な抗体）を保持および提示するビーズが生じる。そのような抗体負荷ビーズの生成は図6に示される。

【0136】

実施例2：生物学的実体の捕捉

この実施例では、特定の病原体に感染したか、特定の疾患または障害を有する個体のB細胞を、実施例1から得られたビーズに捕捉する。実施例1で生成したビーズは、B細胞に特異的であり、したがって、適切な条件でインキュベートすると試料のB細胞に結合する。これは確率過程であるので、種々の生成物、すなわち、空のビーズ、1つのB細胞を結合するビーズ、2つ以上のB細胞を結合するビーズ、単独B細胞（いかなるビーズにも捕捉されなかったB細胞）が形成されうる。この工程は図7に示される。

【0137】

実施例3：有効範囲またはコンパートメントの生成

捕捉された生物学的実体を含むビーズを、遠心分離によりピコタイタープレートのキャピティーに充填する。キャピティーのサイズにより、それぞれのキャピティーは1つ以下のビーズを含有することができる。これもまた確率過程であるので、以下のシナリオが起こりうる：（1）キャピティーは、1つの細胞を有するビーズを含有する、（2）キャピティーは、2つ以上の細胞を有するビーズを含有する、（3）キャピティーは、1つまたは複数の細胞を含有するが、ビーズを含有しない、そして（4）キャピティーは空である。この工程は図8に示される。

【0138】

キャピティーをビーズで充填した後、ピコタイタープレートを洗浄して、PCR混合物を加える（詳細は、実施例4を参照のこと）。蓋を加えて、有効範囲またはコンパートメ

10

20

30

40

50

ントを生成する。ビーズ、ピコタイタープレートの壁、または蓋はいずれも、ストレージとして役立ちうる。

【0139】

次に、生体ユニットまたは生体分子を生物学的実体から放出させる。これは、95 で細胞を溶解することにより達成される。細胞は破裂し、生体ユニットまたは生体分子が放出されることになる。さらに、抗体はビーズから分離し、シーケンシング反応に利用可能になる。本実施例の生体ユニットまたは生体分子は、2つの遺伝子、より具体的には、抗体の可変重鎖をコードする1つの遺伝子（遺伝子1）および同じ抗体の可変軽鎖をコードする遺伝子（遺伝子2）である。

【0140】

10

実施例4：生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合および増幅

実施例1で概説したように、ビーズは、抗体上の配列A'に相補的な配列Aを含有する。AとA'との間のまったく同じ相補性を、本実施例の生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合において使用する。

【0141】

実施例3で加えられたPCR混合物は、遺伝子1の順方向プライマー（P1）、遺伝子1の逆方向プライマー（R1）、遺伝子2の順方向プライマー（P2）、および遺伝子2の逆方向プライマー（R2）を含む。

【0142】

20

プライマーP1は、以下の3つの領域を含有する：

- 配列A'、ビーズ上の配列に相補的である、
- 配列C'、後にシーケンシングのために使用される、
- 配列X'、遺伝子1の配列Xに相補的である。

プライマーR1は、遺伝子1の領域R1'に相補的である。

ピコタイタープレートのキャビティーにおけるPCR増幅は、生成物A - C - X - 遺伝子1 - R1をもたらす。

【0143】

プライマーP2は以下の3つの領域を含有する：

- 配列A'、ビーズ上の配列に相補的である、
- 配列D'、後にシーケンシングのために使用される、
- 配列Y'、遺伝子2の配列Yに相補的である。

30

プライマーR2は、遺伝子2の領域R2'に相補的である。

ピコタイタープレートのキャビティーにおけるPCR増幅は、生成物A - D - Y - 遺伝子2 - R2をもたらす。

【0144】

この工程は、図9、10および11に示される。

【0145】

実施例5：生体ユニットまたは生体分子の検出

遺伝子1の領域Cに相補的なシーケンシングプライマーC'を使用して、標準シーケンシング反応を実施する。核酸鎖全体の核酸配列は、標準技術、例えば454シーケンサーによるピロシーケンシングを用いて決定する。同様に、遺伝子2は、遺伝子2の領域Dに相補的なプライマーD'を利用してシーケンシングする。

40

【0146】

この工程は図12に示される。

【0147】

実施例6：2つ以上の生物学的実体または細胞を含むキャビティーからの配列データの除去

実施例3に記載のように、キャビティーは、2つ以上の細胞を有するビーズを含有する可能性がある。そのようなキャビティーは、シーケンシングが混合したシグナル、すなわち、異なる配列の2つまたはそれ以上の核酸分子に由来するシグナルを伝えることにな

50

るので、容易に解釈することができないシークエンシングデータ（実施例 4）を生成することになる。そのようなキャピティーは、シークエンシングのために使用されるプライマーに較正配列を挿入することにより同定することができる。較正配列は、配列 A'、すなわちビーズ上の配列に相補的なプライマーの一部と、遺伝子 1（遺伝子 2）の配列 X（Y）に相補的な配列 X'（または Y'）との間に位置する。その最も簡単な形態では、較正配列は単に 4 つの異なるヌクレオチド A、C、G、および T を含有するものである。しかしながら、それはまた、任意の順序で追加の重複性ヌクレオチドを含みうるが、4 つのヌクレオチドのそれぞれは、較正配列内に少なくとも 1 回存在することが好ましい。

【0148】

シークエンシング中、各核酸分子は、個々の分子がその後に異なる遺伝子を保持しても、すなわち PCR 混合物中に異なる遺伝子 X があっても、同じ較正配列で始まる。キャピティーが 2 つ以上の細胞を有するビーズを含有する場合、この状況が起こることになる。

10

【0149】

その後のシークエンシング過程では、シグナルは較正配列で得られたものと異なるので、そのようなキャピティーは同定することができる。すなわち、シークエンシングシグナルは較正配列で得られるものより低下することになり、かつ混合したシグナルになる。すなわち、2 つ以上のヌクレオチドに対するシグナルが得られることになるそのようなキャピティーを同定し、更なる分析を免除することができる。この方法は図 13 に示される。

【0150】

実施例 7：油中エマルション

20

本発明の方法はまた、ピコタイタープレートを使用するのではなく、油中水型エマルションを使用して実行することができる。そのために、実施例 1 および 2 を、本明細書で上記したように実施する。実施例 3 を続ける代わりに、油エマルションを調製する。水滴は、細胞および PCR 混合物を有するビーズを含む。水と油の間の相境界は、有効範囲を生成し画定する。図 14 を参照されたい。生体ユニットまたは生体分子のストレージへの結合、増幅、および検出は、実施例 4 および 5 に記載のように実施する。標準 PCR の代わりに、エマルション PCR を実施する。この実施形態はまた、較正配列を用いて実行することができる（実施例 6 を参照のこと）。

【0151】

実施例 8：ライブラリー対ライブラリスクリーニング

30

この実施例では、第 2 ライブラリーに対して第 1 ライブラリーをスクリーニングするための技術的手法を記載する。それによって、第 1 ライブラリーに含有される生体ユニットまたは生体分子と第 2 ライブラリーに含有される生体ユニットまたは生体分子との間のすべての相互作用を同定することが可能である。

【0152】

第 1 ファージライブラリーは遺伝子ライブラリーを含み、このライブラリーの遺伝子をコードする核酸はそれぞれ少なくとも以下の 3 つの領域を含有する：

- 配列 C、後にシークエンシングのために使用される、
- 配列 X、ライブラリーの遺伝子 X をコードする、
- 配列 R1、これも後にシークエンシングのために使用される。

40

【0153】

第 1 ライブラリーのファージはまた、その表面上にタグを含有する。このタグは、任意の実体、好ましくは、そのようなタグを保持するファージを捕捉および単離するために使用することができるペプチド配列であってよい。そのようなタグは、それぞれの抗体により認識される任意のエピトープであってよい。この抗体は、シークエンシングビーズ上の DNA 断片（配列 A'）に相補的な DNA 断片 A をその C 末端に含む。詳細については、実施例 1 を参照されたい。

【0154】

第 2 ファージライブラリーは遺伝子ライブラリーを含み、このライブラリーの遺伝子をコードする核酸はそれぞれ少なくとも以下の 3 つの領域を含有する：

50

- 配列 D、後にシーケンシングのために使用される、
- 配列 Y、ライブラリーの遺伝子 Y をコードする、
- 配列 R 2、これも後にシーケンシングのために使用される。

【0155】

第 1 の工程では、目的の遺伝子産物を発現する 2 つのファージライブラリーを、第 1 ライブラリーの遺伝子産物と第 2 ライブラリーの遺伝子産物との間の相互作用の形成を可能にする条件下で混合する。それぞれのファージ対を形成させた後、第 1 ファージライブラリー上に提示されたタグに対して特異性を有する抗体を加える。その C 末端配列を介して、この抗体は、ビーズ上の対応する配列に結合し、それによって、ビーズ、抗体、および 2 つのファージを含む複合体が形成されることになる。しかしながら、これは確率過程であるので、以下の種々の生成物が形成されうる（抗体は、単に技術的なビヒクルとして使用するもので、載せていない）：（1）空のビーズ、（2）第 1 ライブラリーのファージを含有するビーズ、（3）第 1 ライブラリーのファージおよび第 2 ライブラリーのファージを含有するビーズ、および（4）第 1 ライブラリーの 2 つ以上のファージおよび / または第 2 ライブラリーの 2 つ以上のファージを含有するビーズ。

10

【0156】

PCR シーケンシングは、遺伝子 X に対するプライマー P 1 および R 1 ならびに遺伝子 Y に対するプライマー P 2 および R 2 を利用して実施する。プライマー P 1 は以下の 2 つの領域を含有する：ビーズ上の配列に相補的な配列 A'、および配列 C。プライマー R 1 は、配列 R 1 に相補的な配列 R 1' を含有する。プライマー P 2 は以下の 2 つの領域を含有する：ビーズ上の配列に相補的な配列 A'、および配列 D。プライマー R 2 は、配列 R 2 に相補的な配列 R 2' を含有する。

20

【0157】

以下の配列が、上記に列挙した形成生成物に応じて、得られることになる：

ケース（1）空のビーズ：シグナルなし、すなわち配列なし、

ケース（2）ビーズ + ファージ 1：適正な配列であるが、第 1 ライブラリーのファージに対してのみ、すなわち相互作用パートナーはなし、

ケース（3）ビーズ + ファージ 1 および 2：2 つの相互作用するポリペプチドの適正な配列

ケース（4）数個のファージを有するビーズ：混合したシグナル、解釈は可能でない。

30

【0158】

図 15 に、ライブラリー対ライブラリーのスクリーニング手法を概説する。

【0159】

実施例 9：酵母ツーハイブリッド（Y2H）システムの改善

酵母ツーハイブリッドシステム（Fields & Song, Nature (1989), 340, 245-6）は、相互作用するタンパク質の同定に使用される。鍵となる原理は以下のとおりである。原論文の転写因子の一部 GAL4-BD を、レポーター酵母株（UAS プロモーター（インタクトな GAL タンパク質により活性化される）の上流に lacZ を含有する）において、あるタンパク質に融合し（いわゆるベイト）、このレポーター酵母を、GAL4-AD と命名された、GAL タンパク質の 2 つの第 2 ドメインに融合された潜在的な相互作用パートナーのライブラリー（いわゆるプレイライブラリー）で形質転換する。プレイとベイトタンパク質が相互作用すると、機能的な GAL タンパク質が組み立てられ、lacZ の転写が起こって、増殖寒天に加えられた X-gal（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトシド）の青い沈澱物が放出される。青いコロニーを採集し、プレイ配列を分析して、ベイト配列に対する潜在的な相互作用パートナーとして同定する。改善された方法では、Joung ら（PNAS (2000) 97, 7382-7）は、HIS3 遺伝子の産物により付与されるスペクチノマイシン抵抗性に基づいたレポーターシステムを開発した。本発明内に記載の方法は、この方法を著しく改善することになる。記載の方法は、酵母ツーハイブリッドライブラリー対ライブラリーを、ハイスループットで、かつこれまでにないようなシグナル対バックグラウンド

40

50

比およびシグナル対ノイズ比で可能にするであろう。ベイトライブラリーを酵母株に形質転換し、かつこのライブラリーをプレイブラリーと同時形質転換する。次いで、正の選択システム、例えば Jung らが記載のシステムを適用する（例えば、液体培養中）。それぞれのプレイ/ベイト対合を維持しながら、酵母細胞を単離し、シーケンシングする。

【0160】

ベイトライブラリーは、例えば、HIS3 遺伝子が UAS プロモーターの制御下にある酵母の中の遺伝子ライブラリーを含み、このライブラリーの遺伝子をコードする核酸はそれぞれ、少なくとも以下の3つの領域を含有する：

- 配列 C、後にシーケンシングのために使用される、
- 配列 X、それぞれのベイト調節配列部分、例えば (GAL4 - BD) に融合した、ライブラリーの遺伝子 X をコードする、
- 配列 R1、これも後にシーケンシングのために使用される。

10

【0161】

第2ライブラリー（プラスミドコード）はプレイ遺伝子ライブラリーをコードし、このライブラリーの遺伝子をコードする核酸はそれぞれ、少なくとも以下の3つの領域を含有する：

- 配列 D、後にシーケンシングのために使用される、
- 配列 Y、転写因子の相補性部分（例えば GAL4 - AD）に融合した、ライブラリーの遺伝子 Y をコードする、および
- 配列 R2、これも後にシーケンシングのために使用される。

20

【0162】

酵母ベイトライブラリーを、プレイライブラリーと同時形質転換し、それぞれの正の選択条件下（例えば、スペクチノマイシンの存在下）で増殖させる。増殖する酵母細胞を、限界希釈手法を使用してビーズ上に固定する。PCR シーケンシングは、遺伝子 X に対するプライマー P1 および R1 ならびに遺伝子 Y に対するプライマー P2 および R2 を利用して実施する。プライマー P1 は以下の2つの領域を含有する：ビーズ上の配列に相補的な配列 A'、および配列 C。プライマー R1 は、配列 R1 に相補的な配列 R1' を含有する。プライマー P2 は以下の2つの領域を含有する：ビーズ上の配列に相補的な配列 A'、および配列 D。プライマー R2 は、配列 R2 に相補的な配列 R2' を含有する。

30

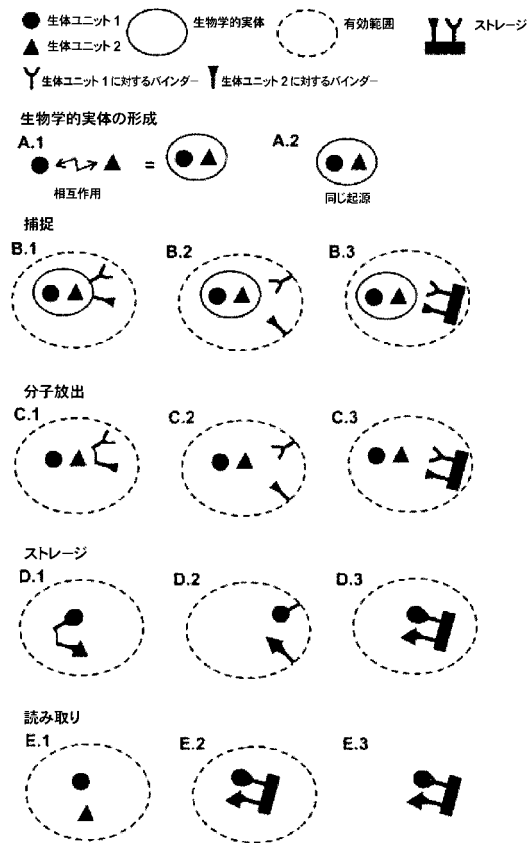
【0163】

以下の配列が、上記に列挙した形成生成物に応じて、得られることになる：

- ケース (1) 空のビーズ：シグナルなし、すなわち配列なし、
- ケース (2) ビーズ + ベイト酵母：適正な配列であるが、ベイトに対してのみであり、偽陽性は正の選択圧により起こらないはずである、
- ケース (3) ビーズ + ベイトおよびプレイ：2つの相互作用するポリペプチドの適正な配列、
- ケース (4) 数個のプレイ配列を有するビーズ：おそらく2つ以上の酵母を固定化したことに起因する。

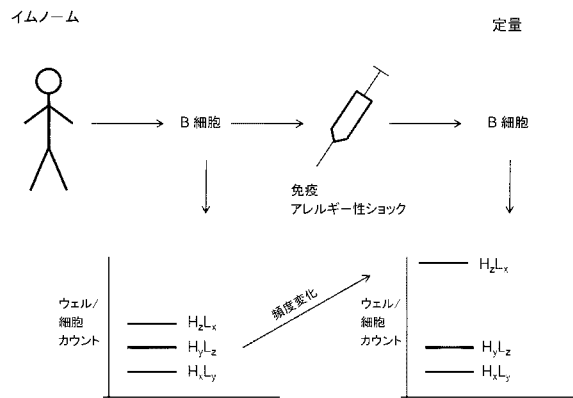
【図 1】

図 1



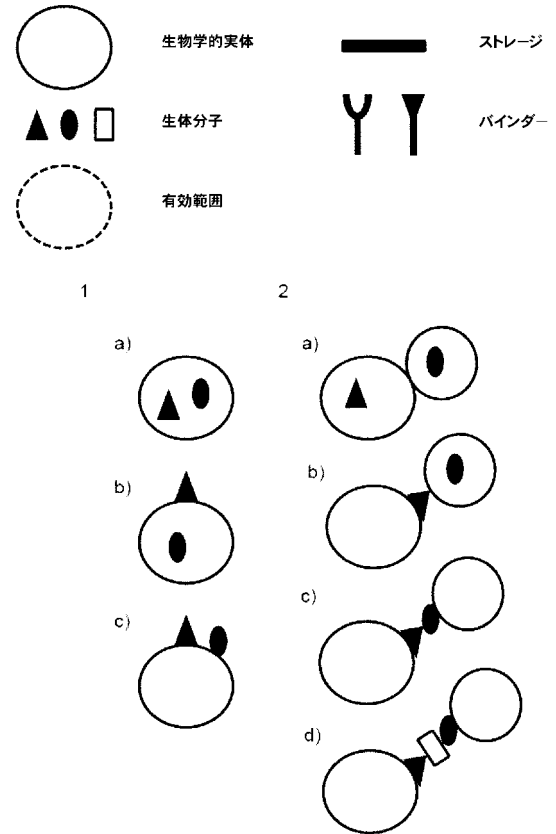
【図 3】

図 3



【図 2】

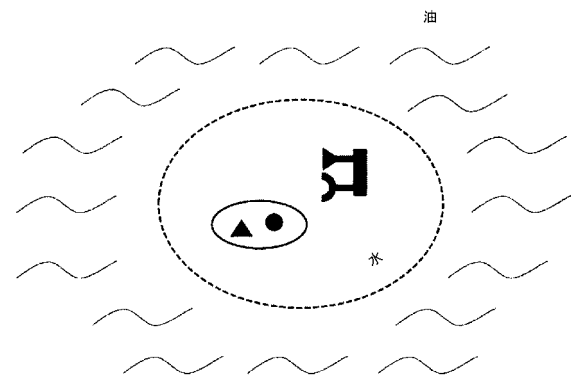
図 2



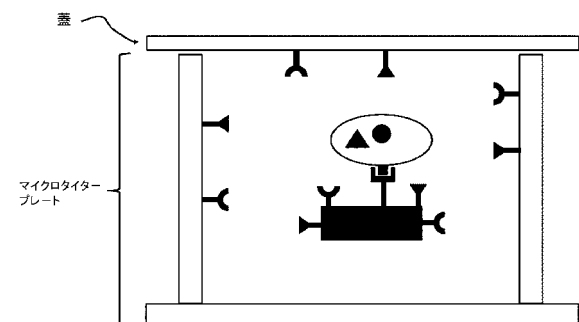
【図 4】

図 4

A

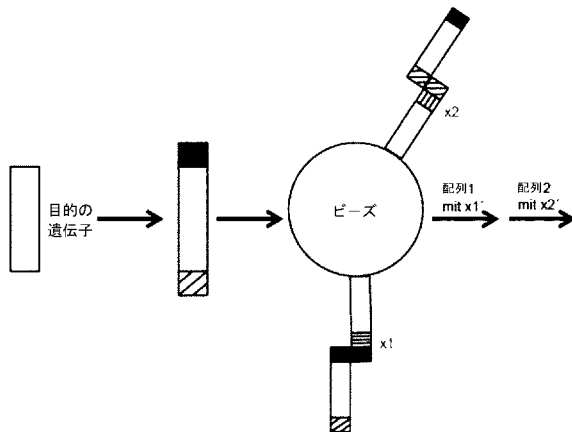


B



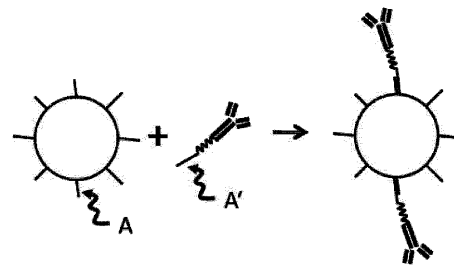
【図 5】

図 5



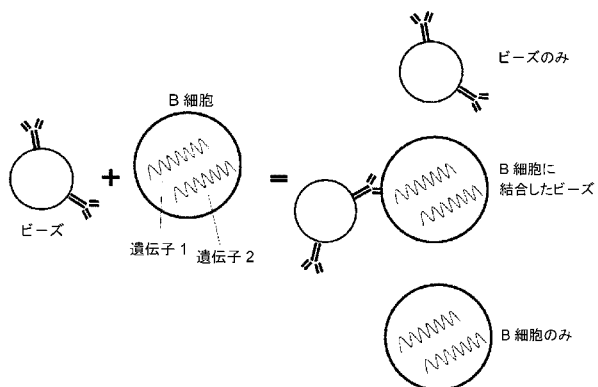
【図 6】

FIGURE 6



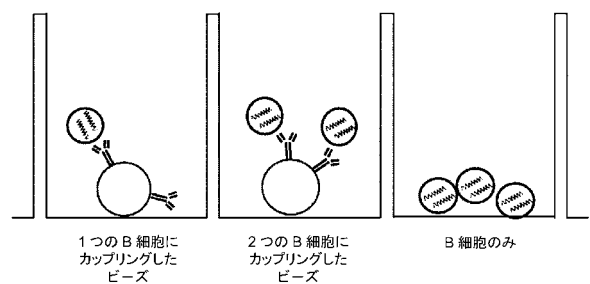
【図 7】

図 7



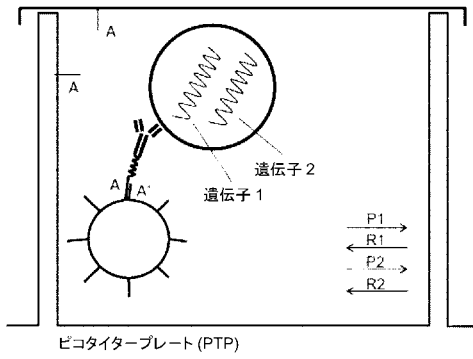
【図 8】

図 8



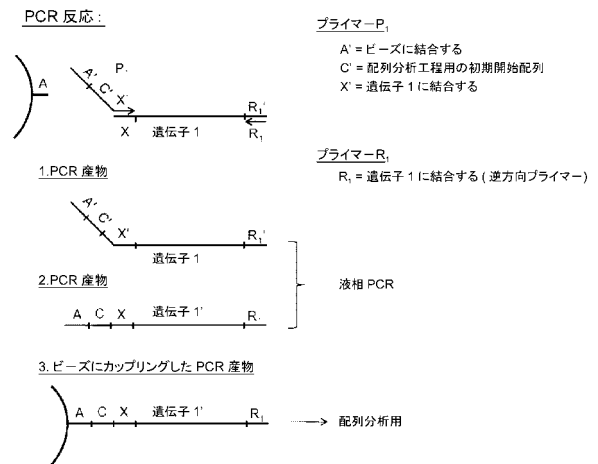
【図 9】

図 9



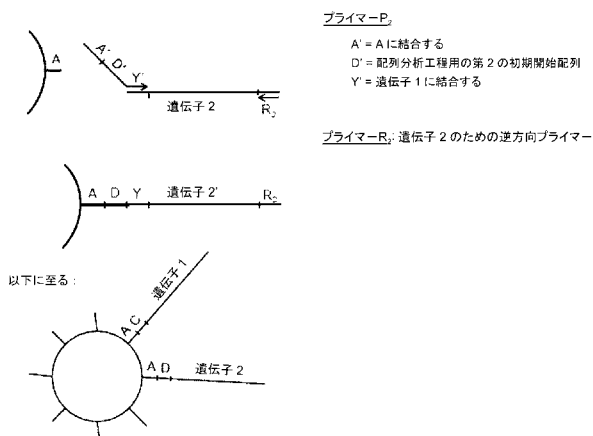
【図 10】

図 10



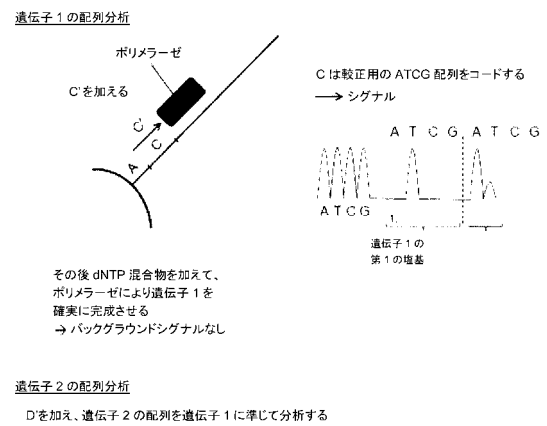
【図 11】

図 11



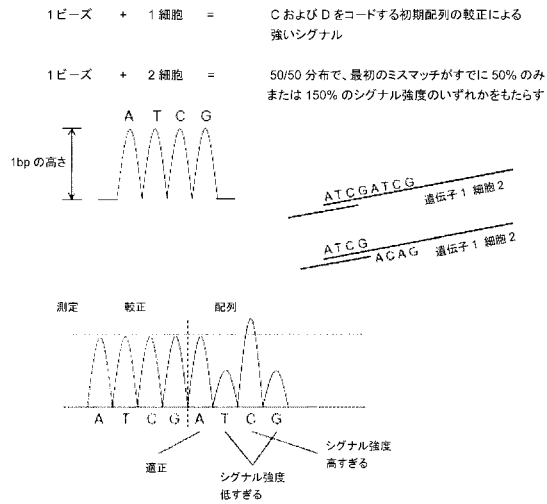
【図 12】

図 12



【図 13】

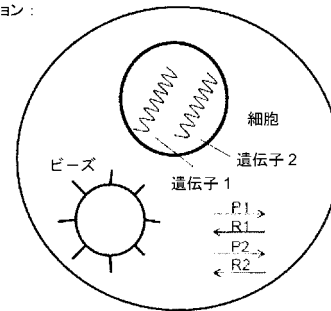
図 13



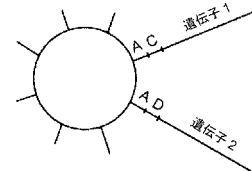
【図 14】

図 14

油エマルション：



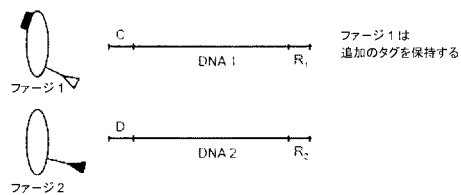
PCR 増幅後：



【図 15】

図 15

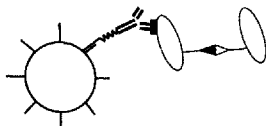
1) ファージライブラリー 1 + ファージライブラリー 2



2) 混合および対での相互作用



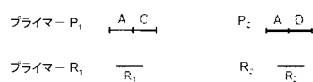
3) 抗タグ分子を保持するビーズ



4) 相互作用の可能性

- A) ビーズのみ
- B) ファージ 1 に結合したビーズ
- C) ファージ 1 + 2 を伴うビーズ
- D) いくつかのファージ 1/2 に結合したビーズ

5) 通常の配列分析



- A) ビーズのみ = シグナルなし
- B) ファージ 1 に結合したビーズ = 適正なシグナル強度であるが、1 に対してのみ
- C) ファージ 1 + 2 を伴うビーズ = 結合対 1 および 2 に対して適正なシグナル強度
- D) いくつかのファージ 1/2 に結合したビーズ = エラー

【手続補正書】

【提出日】平成24年7月20日(2012.7.20)

【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】

2 つ以上の核酸を検出するための方法において、前記方法が、

(a) 前記核酸を含む細胞を含む試料を準備する工程と、

(b) 前記核酸の派生体を結合することができる成分を含むコンパートメントの中に前記細胞を空間分離する工程と、

(c) 前記細胞から前記核酸を放出させる工程と、

(d) 前記核酸の派生体を生成させる工程と、

(e) 前記核酸の派生体が、前記核酸の派生体を結合することができる成分に結合することを可能にする工程と、

(f) 前記核酸の派生体を検出または同定する工程と

を含み、前記試料が少なくとも 10^3 の細胞を含み、前記成分が固相粒子であり、かつ前記細胞のそれぞれにおいて、少なくとも 2 つの核酸が検出されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記核酸のそれぞれが、多量体のタンパク質または酵素の一部であるポリペプチドをコードすることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記多量体タンパク質が、免疫グロブリンまたはその機能性断片であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の方法において、前記生体分子が、免疫グロブリンまたはその機能性断片の可変重鎖および可変軽鎖をコードする遺伝子であることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の方法において、前記試料が、血液、骨髓、腫瘍、単一細胞生物、原核生物、または体液であるか、またはそれらに由来することを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法において、前記試料が患者に由来する試料であり、前記患者が健康患者、免疫患者、感染患者、または疾患もしくは障害を有する患者であることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の方法において、前記細胞が単一 B 細胞などの単一細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の方法において、前記コンパートメントが、キャピティー、ウェル、エマルション、相境界システム、疎水性スポット、粒子、物理力、または化学的架橋により形成されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法において、前記相境界が、空気中の水滴のように水と気体の間の相分離によって、または油中の水滴のように水と液体の間の相分離によって、またマイクロタイプレート中の水滴のように水と固相の間の相分離によって実現されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の方法において、前記キャビティーまたは前記ウェルが、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または微小構造基材の上のキャビティーであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 8 に記載の方法において、前記エマルションが、油中水型または水中油型のエマルションであることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 8 に記載の方法において、前記粒子が、シリカ、ガラス、アガロース、ポリマー、金属酸化物、またはそれらの複合物からなることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 8 に記載の方法において、前記物理力が、静電力、電流力、誘電泳動力、電磁力、磁気、光学、温度、または密度効果であることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 13 の何れか 1 項に記載の方法において、前記核酸の派生体を結合することができる前記成分が、ビーズ、スライドガラス、マイクロタイタープレート、ピコタイタープレート、または前述のいずれかの蓋であることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1 乃至 14 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (c) が化学的または物理的条件の変化により行われることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法において、化学的条件の前記変化が、pH 変化、塩濃度の変化、酵素の添加、細胞溶解剤の添加であることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法において、物理的条件の前記変化が、加熱、凍結、電場、磁場または誘電場の印加、剪断力または遠心力、機械的変形、弛緩、超音波または任意の物理的な破断作用であることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、物理的条件の前記変化が、溶液への粒子の溶解、生体ユニットのまわりの保護シェルの溶解、または酵素による誘導など、時間依存的にもたらされることを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 1 乃至 18 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (d) が、前記核酸のレプリケートまたは派生体の生成をもたらす増幅反応を含むことを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法において、前記増幅反応が PCR または RT-PCR であり、前記 PCR または RT-PCR の間に、前記レプリケートまたは派生体が、前記核酸の派生体に結合することができる成分に結合することを可能にする [第 1 の] タグが加えられることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法において、前記 PCR または RT-PCR の間に、前記 PCR 産物または RT-PCR 産物のその後のシーケンシングを可能にする第 2 のタグが加えられることを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 1 乃至 21 の何れか 1 項に記載の方法において、工程 (f) が DNA シーケンシングにより行なわれることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、前記 DNA シーケンシングが、前記 PCR 産物または RT-PCR 産物を連続または並行してシーケンシングすることにより行われることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 1 乃至 23 の何れか 1 項に記載の方法において、前記核酸が前記核酸を結合することができる成分にハイブリダイゼーションにより結合し、前記成分が固相粒子であり、かつ前記固相粒子が工程 (f) のシーケンシングために使用されることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 1 乃至 24 の何れか 1 項に記載の方法において、前記核酸またはそれらの派生体の検出および同定が同時に行われることを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 1 乃至 25 の何れか 1 項に記載の方法において、工程前記試料が、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^9 、または少なくとも 10^{12} の細胞、かつ前記細胞のそれぞれにおいて、少なくとも 2 つの核酸が検出されることを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法において、前記細胞内の前記少なくとも 2 つの核酸の存在の相関が統計的に分析または判定されることを特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 1 乃至 27 の何れか 1 項に記載の方法またはイムノアッセイを実施することを特徴とする装置。

【請求項 29】

請求項 1 乃至 27 の何れか 1 項に記載の方法またはイムノアッセイを実施するための装置および説明書を含むことを特徴とするキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUAN GONG ET AL: "Massively parallel detection of gene expression in single cells using subnanolitre wells", LAB ON A CHIP, vol. 10, no. 18, 1 January 2010 (2010-01-01), page 2334, XP55012182, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c004847j	1-11, 14-17, 20-30, 33-39
Y	the whole document abstract page 2334, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 3 figure 1a page 2336, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 page 2336, right-hand column, paragraph 2 figure 2 figure 3 ----- -/-	12,13, 18,19, 31,32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2012

Date of mailing of the international search report

16/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gall, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071433

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KIYOMI TANIGUCHI ET AL: "Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 6, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 503-510, XP007912844, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/NMETH.1338 [retrieved on 2009-06-14] cited in the application the whole document abstract Online Methods, Cell culturing and single cell sampling Online Methods, Preparation of cDNA libraries from single cell Online Methods, Quantitative analysis of cDNA in single cell cDNA libraries Supplementary Protocol, Cell culture and single-cell sampling Supplementary Protocol, Preparation of cDNA libraries from a single cell Supplementary Protocol, Quantitative analysis of cDNA in single cell cDNA libraries Supplementary Protocol, figure A</p>	<p>1-5,9, 11,14, 15, 21-26, 35-39</p>
Y	<p>WO 2007/081387 A1 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; LINK DARREN R [US]; BOITARD LAURENT []) 19 July 2007 (2007-07-19) the whole document abstract page 66, line 28 - page 68, line 27; example 3 figure 4 claims 1-3,5</p>	<p>12,13, 18,19, 31,32</p>
Y	<p>US 2005/227264 A1 (NOBILE JOHN R [US] ET AL) 13 October 2005 (2005-10-13) the whole document abstract claims 1-5, 7</p>	<p>12,13, 18,19, 31,32</p>

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071433

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	NOVAK RICHARD ET AL: "Single-cell multiplex gene detection and sequencing with microfluidically generated agarose emulsions.", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH) 10 JAN 2011 LNKD-PUBMED:21132688, vol. 50, no. 2, 10 January 2011 (2011-01-10), pages 390-395, XP002629259, ISSN: 1521-3773, DOI: 10.1002/anie.201006089 the whole document -----	1-39
T	GUO J ET AL: "MPIC: A high-throughput analytical method for multiple DNA targets", ANALYTICAL CHEMISTRY 20110301 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 83, no. 5, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 1579-1586, XP002629260, DOI: DOI:10.1021/AC103266W the whole document -----	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/071433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007081387	A1	19-07-2007	
		AU 2006335290 A1	19-07-2007
		CA 2636855 A1	19-07-2007
		EP 1984738 A2	29-10-2008
		EP 2363205 A2	07-09-2011
		EP 2364774 A2	14-09-2011
		JP 2009536313 A	08-10-2009
		US 2010137163 A1	03-06-2010
		WO 2007081385 A2	19-07-2007
		WO 2007081386 A2	19-07-2007
		WO 2007081387 A1	19-07-2007

US 2005227264	A1	13-10-2005	
		CA 2553833 A1	11-08-2005
		EP 1735458 A2	27-12-2006
		US 2005227264 A1	13-10-2005
		US 2011177587 A1	21-07-2011
		WO 2005073410 A2	11-08-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 M 1/34 Z
 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(71)出願人 513135750

アルベルト - ルートヴィヒス - ユニヴェルジテート フライブルク

ドイツ連邦共和国 7 9 0 8 5 フライブルク, ファーネンベルクブラッツ

(74)代理人 110001302

特許業務法人北青山インターナショナル

(72)発明者 エンツェルスベルガー, マルクス

ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 プラネック - マルティンスリート, パストゥールシュトラッセ
4 1

(72)発明者 ボル, アンドレアス

ドイツ連邦共和国 8 0 8 0 4 ミュンヘン, デュッセルドルフアーシュトラッセ 1 3

(72)発明者 ディーフェンバツハ - シュトライパー, ベアテ

ドイツ連邦共和国 8 6 9 4 9 ヴィンダッハ, ライハーヴェーク 6

(72)発明者 ロート, ギュンター

ドイツ連邦共和国 7 9 1 1 0 フライブルク, オイレンヴェーク 2 6

(72)発明者 フォン, シュテッテン, フェリクス

ドイツ連邦共和国 7 9 1 1 2 フライブルク - ティエンゲン, アウフ ダー キンツィヒ 4 8

F ターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA12 DA03 HA14 HA15

4B029 AA07 BB11 BB16 BB17 BB20 CC01 FA05 FA12

4B063 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36

QR48 QR62 QR72 QR77 QS02 QS33 QS34 QS38 QS39 QX01

QX04