

【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】令和7年6月18日(2025.6.18)

【国際公開番号】WO2022/261507
 【公表番号】特表2024-520804(P2024-520804A)
 【公表日】令和6年5月24日(2024.5.24)
 【年通号数】公開公報(特許)2024-095
 【出願番号】特願2023-575822(P2023-575822)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月10日(2025.6.10)

【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

20

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

相補的デオキシ核酸(cDNA)分子またはその誘導体のセットを1つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

1つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるために、固体支持体上の1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを前記1つまたは複数の核酸分子と接触させるステップ、
cDNA分子を前記捕捉された核酸分子または誘導体から合成し、アダプターを前記cDNA分子またはその誘導体の3'領域に挿入するステップであって、前記cDNA分子が、前記複数の表面プライマープローブの表面プライマープローブに結合される、ステップ、

30

cDNA分子またはその誘導体の前記セットを作成するために、前記cDNA分子またはその誘導体のうちの少なくとも一部分を増幅するステップであって、cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記複数の表面プライマープローブのうちの表面プライマープローブに結合される、ステップ

を含む、方法。

【請求項2】

前記アダプターが、cDNA分子またはその誘導体の前記セットのうちのcDNA分子における配列決定反応の開始を可能にするように構成された配列を含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項3】

前記接触させるステップの後に、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくともサブセットを不活化するステップを含み、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットが、核酸分子を捕捉しなかった1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記不活化するステップが、前記1つもしくは複数の核酸分子捕捉用プローブ、または前記1つもしくは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットを、エキソヌクレアーゼと接触させるステップを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

50

前記合成するステップが、前記 c D N A 分子またはその誘導体を含む 1 つまたは複数の第 2 鎖合成反応を行うステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記挿入するステップの前に、前記 c D N A 分子またはその誘導体を増幅するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記挿入するステップの前に、前記 c D N A 分子またはその誘導体の断片化を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 c D N A 分子またはその誘導体の 3' 領域へ前記アダプターを前記挿入するステップが、一本鎖ライゲーション、タグ付け断片化、および二本鎖ライゲーションのうちの 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 9】

前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくともサブセットにおける伸長反応をブロックする遮断剤を含み、前記方法は、前記挿入するステップの前に、前記遮断剤を、前記複数の表面プライマープローブまたは前記複数の表面プライマープローブの前記サブセット前記サブセットをブロック解除する反応に供して、前記伸長反応を可能にするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記増幅するステップの後に、c D N A 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを切断または線状化するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 11】

前記増幅するステップの後に、D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端をブロックする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記固体支持体上で、i n s i t u で前記 c D N A 分子またはその誘導体の前記少なくともサブセットを配列決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

c D N A 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを前記固体支持体から溶出させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 14】

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブのうちの 1 つの核酸分子捕捉用プローブの配列が、前記 1 つまたは複数の 1 つの核酸分子のうちの核酸分子に結合するように構成されており、前記核酸分子捕捉用プローブの前記配列が、ポリ T 配列、ランダム、前記 1 つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記固体支持体が、流体チャネルの表面である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記流体チャネルが、フローセルである、請求項 15 に記載の方法。 40

【請求項 17】

前記固体支持体が、ビーズではない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数のタグを含み、前記 1 つまたは複数のタグのうちの 1 つのタグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子 (U M I) 配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記増幅するステップが、固体支持増幅を含む、請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 2 0】

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、単一細胞または生体組織に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記固体支持体が、その上に配置されたヒドロゲルチャンバーを含み、前記ヒドロゲルチャンバーが 1 つまたは複数のポリマーマトリックス壁を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 1 つまたは複数のポリマーマトリックス壁が、前記固体支持体から、前記固体支持体の反対側の上表面に伸びて、それにより前記ヒドロゲルチャンバーの内部を形成する、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 3】

前記挿入するステップが、前記 c D N A 分子が前記表面プライマープローブに結合される後である、請求項 1 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】0 2 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 8】

本発明の好ましい実施形態を、本明細書に示し、記載したが、当業者には、そのような実施形態が例としてのみ提供されていることが自明である。本発明は、本明細書内で提供される特定の例によって限定されることを意図するものではない。本発明を、前述の明細書を参照して記載したが、本明細書における実施形態の記載および説明は、限定的な意味で解釈されることを意味するものではない。本発明から逸脱することなく、当業者であれば、多数の変形、変更、および置換に直ちに想起する。さらにまた、本発明のすべての態様が、各種の条件および変数に依存する本明細書に示される特定の描写、構成、または相対的割合に限定されないことが理解されるべきである。本明細書に記載される本発明の実施形態に対するさまざまな代替を、本発明を実施する際に用いてもよいことが理解されるべきである。したがって、本発明は、任意のそのような代替、改変、変形、または均等物も包含すべきであることが企図される。以下の請求項が、本発明の範囲を定義すること、およびこれらの請求項およびそれらの均等物の範囲内の方法および構造がそれによって包含されることが意図される。

20

30

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

相補的デオキシ核酸 (c D N A) 分子またはその誘導体のセットを 1 つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

(a) 固体支持体を提供するステップであって、前記固体支持体が、 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブおよび複数の表面プライマープローブを含む、ステップ、

(b) 前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを前記 1 つまたは複数の核酸分子と接触させて、 1 つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるステップ、

40

(c) c D N A 分子を前記捕捉された核酸分子または誘導体から合成するステップであって、前記 c D N A 分子が、前記複数の表面プライマープローブの表面プライマープローブに結合される、ステップ、

(d) アダプターを前記 c D N A 分子またはその誘導体の 3 ' 領域に挿入するステップ、ならびに

(e) 前記 c D N A 分子またはその誘導体を増幅して、 c D N A 分子またはその誘導体の前記セットを作成するステップであって、 c D N A 分子またはその誘導体の前記セットが、前記複数の表面プライマープローブの表面プライマープローブに結合される、ステップを含む、方法。

(項目 2)

50

前記アダプターが、cDNA分子またはその誘導体の前記セットのcDNA分子における配列決定反応の開始を可能にするように構成された配列を含む、項目1に記載の方法。
(項目3)

cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記アダプターを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

(b)の後に、前記固体支持体を、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくともサブセットを不活化するように構成された部分と接触させるステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットが、核酸分子を捕捉しなかった1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくとも前記サブセットを不活化するように構成された前記部分が、エキソヌクレアーゼを含む、項目4に記載の方法。

(項目7)

前記合成するステップが、前記cDNA分子またはその誘導体を含む1つまたは複数の第2鎖合成反応を行うステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目8)

(d)の前に、前記cDNA分子またはその誘導体を増幅するステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記増幅するステップが、(d)の前に、溶液中のプライマー配列を含む、項目7に記載の方法。

(項目10)

(d)の前に、前記cDNA分子またはその誘導体の断片化を含む、項目1に記載の方法。

(項目11)

(d)が、一本鎖ライゲーション、タグ付け断片化、または二本鎖ライゲーションを含む、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットにおける伸長反応をブロックする遮断剤を含む、項目1に記載の方法。

(項目13)

(e)の前に、前記遮断剤を、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットをブロック解除する反応に供して、前記伸長反応を可能にするステップを含む、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記1つまたは複数の遮断剤が、1つまたは複数の3'リン酸ヌクレオチドを含む、項目12に記載の方法。

(項目15)

前記1つまたは複数の遮断剤が、前記複数の表面プライマープローブの少なくとも前記サブセットに少なくとも部分的に相補的な配列を含む核酸分子、可逆的ターミネーターヌクレオチド、ポリメラーゼ、その任意の誘導体、またはその任意の組合せを含む、項目12に記載の方法。

(項目16)

(e)の後に、cDNA分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを切断または線状化するステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目17)

10

20

30

40

50

(e) の後に、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端をブロックする、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) と接触させるステップを含む、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、DNA 分子の前記セットの前記サブセットの 3' 末端に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させるステップを含む、項目 1 7 に記載の方法。

10

(項目 2 0)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、カチオン性 - 中性ジブロックポリペプチドコポリマーと接触させるステップを含む、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記固体支持体上で、i n s i t u で前記 c DNA 分子またはその誘導体の前記少なくとも前記サブセットを配列決定するステップを含む、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 2 2)

c DNA 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを前記固体支持体から溶出させるステップを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、DNA またはリボ核酸 (RNA) 分子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記 DNA が、断片化された一本鎖 DNA である、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記 RNA 分子が、メッセンジャー RNA (mRNA) またはマイクロ RNA (mi RNA) を含む、項目 2 3 に記載の方法。

30

(項目 2 6)

前記 1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された前記配列が、ポリ T 配列、ランダム、前記 1 つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記固体支持体が、ウェル、ビーズ、または流体チャネルである、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記流体チャネルが、フローセルである、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記固体支持体が、ビーズではない、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 3 0)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数のタグを含み、タグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子 (U M I) 配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記増幅するステップが、固体支持増幅を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記固体支持増幅が、ブリッジ増幅である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

50

前記1つまたは複数の核酸分子が、単一細胞または生体組織に由来する、項目1に記載の方法。

(項目34)

(a)~(e)のうちのいずれか1つ、またはその任意の組合せが、ゲルマトリックスにおいて起こり、前記ゲルマトリックスが、前記固体支持体に隣接している、項目1に記載の方法。

(項目35)

相補的デオキシ核酸(cDNA)分子またはその誘導体のセットを1つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

(a)固体支持体を提供するステップであって、前記固体支持体が、1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、ステップ、

(b)前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを前記1つまたは複数の核酸分子と接触させて、1つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるステップ、

(c)cDNA分子を前記捕捉された核酸分子または誘導体から合成するステップであって、前記合成するステップが、逆転写を行うステップを含む、ステップ、

(d)前記cDNA分子またはその誘導体を最初に増幅して、増幅されたcDNA集団を作成するステップ、

(e)アダプターを前記増幅されたcDNA分子またはその誘導体の3'領域に挿入し、それによって、タグ付けされた増幅されたcDNA集団を作成するステップ、ならびに

(f)前記タグ付けされた増幅されたcDNA集団において固体支持増幅を行って、cDNA分子またはその誘導体の前記セットを作成するステップ

を含む、方法。

(項目36)

前記固体支持体が、複数の表面プライマープローブを含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

前記cDNA分子または前記その誘導体、前記増幅されたcDNA集団、前記タグ付けされた増幅されたcDNA集団、cDNA分子またはその誘導体の前記セット、またはその任意の組合せが、前記複数の表面プライマープローブに結合される、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記アダプターが、cDNA分子またはその誘導体の前記セットのcDNA分子における配列決定反応の開始を可能にするように構成された配列を含む、項目35に記載の方法。

(項目39)

cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記アダプターを含む、項目35に記載の方法。

(項目40)

(b)の後に、前記固体支持体を、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくともサブセットを不活化するように構成された部分と接触させるステップを含む、項目35に記載の方法。

(項目41)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットが、核酸分子を捕捉しなかった1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくとも前記サブセットを不活化するように構成された前記部分が、エキソヌクレアーゼを含む、項目40に記載の方法。

(項目43)

前記合成するステップが、前記cDNA分子またはその誘導体を含む1つまたは複数の第2鎖合成反応を行うステップを含む、項目35に記載の方法。

(項目44)

10

20

30

40

50

前記 1 つまたは複数の第 2 鎖合成反応が、テンプレートスイッチ伸長を含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記 1 つまたは複数の第 2 鎖合成反応が、ランダムプライミングを含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 6)

(e) の前に、前記増幅された c D N A 分子の断片化を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

(e) が、一本鎖ライゲーション、タグ付け断片化、または二本鎖ライゲーションを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットにおける伸長反応をブロックする遮断剤を含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 9)

(d) の前に、前記遮断剤を、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットをブロック解除する反応に供して、前記伸長反応を可能にするステップを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、1 つまたは複数の 3 ' リン酸ヌクレオチドを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、前記複数の表面プライマープローブの少なくとも前記サブセットに相補的な配列を含む核酸分子を含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 2)

(f) の後に、c D N A 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを切断または線状化するステップを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 5 3)

(f) の後に、D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3 ' 末端をブロックする、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 5 4)

D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3 ' 末端の前記ブロックするステップが、D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) と接触させるステップを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3 ' 末端の前記ブロックするステップが、D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、D N A 分子の前記セットの前記サブセットの 3 ' 末端に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させるステップを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 6)

D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3 ' 末端の前記ブロックするステップが、D N A 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、カチオン性 - 中性ジブロックポリペプチドコポリマーと接触させるステップを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記固体支持体上で、i n s i t u で前記 c D N A 分子またはその誘導体の前記少なくとも前記サブセットを配列決定するステップを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 5 8)

c D N A 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを前記固体支持体

10

20

30

40

50

から溶出させるステップを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、DNA またはリボ核酸 (RNA) 分子を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記 DNA が、断片化された一本鎖 DNA である、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記 RNA 分子が、メッセンジャー RNA (mRNA) またはマイクロ RNA (miRNA) を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、前記 1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された配列を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記 1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された前記配列が、ポリ T 配列、ランダム、前記 1 つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記固体支持体が、ウェル、ビーズ、または流体チャネルである、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記流体チャネルが、フローセルである、項目 6 4 に記載の方法。

(項目 6 6)

前記固体支持体が、ビーズではない、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数のタグを含み、タグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子 (UMI) 配列を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記最初に増幅するステップが、固体支持増幅を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記最初に増幅するステップが、溶液中のプライマー配列を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記固体支持増幅が、ブリッジ増幅である、項目 6 8 に記載の方法。

(項目 7 1)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、単一細胞または生体組織に由来する、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 7 2)

(a) ~ (f) のうちのいずれか 1 つ、またはその任意の組合せが、ゲルマトリックスにおいて起こり、前記ゲルマトリックスが、前記固体支持体に隣接している、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 7 3)

相補的デオキシ核酸 (cDNA) 分子またはその誘導体のセットを 1 つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

(a) 固体支持体を提供するステップであって、前記固体支持体が、1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブおよび複数の表面プライマープローブを含み、前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、テンプレートスイッチ部分を含む、ステップ

(b) 前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを前記 1 つまたは複数の核酸分子と接触させて、1 つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるステップ、

10

20

30

40

50

(c) cDNA分子を前記捕捉された核酸分子または誘導体から合成するステップであって、前記合成するステップが、逆転写を行うステップを含む、ステップ、

(d) アダプターを前記cDNA分子またはその誘導体の3'末端に挿入するステップ、ならびに

(e) 前記cDNA分子またはその誘導体を増幅して、cDNA分子またはその誘導体の前記セットを作成するステップを含む、方法。

(項目74)

前記合成するステップが、前記cDNA分子またはその誘導体を含む1つまたは複数の第2鎖合成反応を行うステップを含む、項目73に記載の方法。

(項目75)

前記1つまたは複数の第2鎖合成反応が、前記テンプレートスイッチ部分を含む前記複数の表面プライマープローブの前記サブセットによって媒介される、項目74に記載の方法。

(項目76)

前記1つまたは複数の第2鎖合成反応が、テンプレートスイッチ伸長を含む、項目73に記載の方法。

(項目77)

前記cDNA分子または前記その誘導体、cDNA分子またはその誘導体の前記セット、あるいはその両方が、前記複数の表面プライマープローブに結合される、項目73に記載の方法。

(項目78)

前記アダプターが、cDNA分子またはその誘導体の前記セットのcDNA分子における配列決定反応の開始を可能にするように構成された配列を含む、項目73に記載の方法。

(項目79)

cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記アダプターを含む、項目73に記載の方法。

(項目80)

(b)の後に、前記固体支持体を、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくともサブセットを不活化するように構成された部分と接触させるステップを含む、項目73に記載の方法。

(項目81)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットが、核酸分子を捕捉しなかった1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、項目80に記載の方法。

(項目82)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくとも前記サブセットを不活化するように構成された前記部分が、エキソヌクレアーゼを含む、項目80に記載の方法。

(項目83)

(d)の前に、前記cDNA分子またはその誘導体を増幅するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目84)

前記増幅するステップが、(d)の前に、溶液中のプライマー配列を含む、項目73に記載の方法。

(項目85)

(d)の前に、前記cDNA分子の断片化を含む、項目73に記載の方法。

(項目86)

(d)が、一本鎖ライゲーション、タグ付け断片化、またはライゲーションを含む、項目73に記載の方法。

(項目87)

10

20

30

40

50

前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットにおける伸長反応をブロックする遮断剤を含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 8 8)

(e)の前に、前記遮断剤を、前記複数の表面プライマープローブの前記少なくとも前記サブセットをブロック解除する反応に供して、前記伸長反応を可能にするステップを含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、1 つまたは複数の 3'リン酸ヌクレオチドを含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、前記複数の表面プライマープローブの少なくとも前記サブセットに相補的な配列を含む核酸分子を含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 1)

(e)の後に、cDNA分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを切断または線状化するステップを含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 9 2)

(e)の後に、DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3'末端をブロックする、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 9 3)

DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3'末端の前記ブロックするステップが、DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)と接触させるステップを含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3'末端の前記ブロックするステップが、DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、DNA分子の前記セットの前記サブセットの 3'末端に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させるステップを含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 5)

DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3'末端の前記ブロックするステップが、DNA分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、カチオン性-中性ジブロックポリペプチドコポリマーと接触させるステップを含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記固体支持体上で、in situで前記cDNA分子またはその誘導体の前記少なくとも前記サブセットを配列決定するステップを含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 9 7)

cDNA分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを前記固体支持体から溶出させるステップを含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、DNAまたはリボ核酸(RNA)分子を含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記DNAが、断片化された一本鎖DNAである、項目 9 8 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

前記RNA分子が、メッセンジャーRNA(mRNA)またはマイクロRNA(miRNA)を含む、項目 9 8 に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、前記 1 つまたは複数の核酸分子に結

10

20

30

40

50

合するように構成された配列を含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記 1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された前記配列が、ポリ T 配列、ランダム、前記 1 つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

前記固体支持体が、流体チャネルである、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

前記流体チャネルが、フローセルである、項目 1 0 3 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数のタグを含み、タグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子 (UMI) 配列を含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記増幅するステップが、固体支持増幅を含む、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記固体支持増幅が、ブリッジ増幅である、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、単一細胞または生体組織に由来する、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

(a) ~ (f) のうちのいずれか 1 つ、またはその任意の組合せが、ゲルマトリックスにおいて起こり、前記ゲルマトリックスが、前記固体支持体に隣接している、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 1 1 0)

1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブおよび複数の表面プライマープローブを含む固体支持体であって、前記複数の表面プライマープローブの少なくともサブセットが、テンプレートスイッチ部分を含む、固体支持体。

(項目 1 1 1)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された配列を含む、項目 1 1 0 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 2)

前記 1 つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された前記配列が、ポリ T 配列、ランダム、前記 1 つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、項目 1 1 1 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 3)

前記固体支持体が、ウェル、ビーズ、または流体チャネルである、項目 1 1 0 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 4)

前記流体チャネルが、フローセルである、項目 1 1 0 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 5)

前記 1 つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1 つまたは複数のタグを含み、タグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子 (UMI) 配列を含む、項目 1 1 0 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 6)

前記 1 つまたは複数の核酸分子が、DNA またはリボ核酸 (RNA) 分子を含む、項目 1 1 0 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 7)

前記 DNA が、断片化された一本鎖 DNA である、項目 1 1 6 に記載の固体支持体。

(項目 1 1 8)

10

20

30

40

50

前記RNA分子が、メッセンジャーRNA (mRNA) またはマイクロRNA (miRNA) を含む、項目117に記載の固体支持体。

(項目119)

前記固体支持体が、ゲルマトリックスを含み、前記ゲルマトリックスが、前記固体支持体に隣接している、項目110に記載の固体支持体。

(項目120)

相補的デオキシ核酸 (cDNA) 分子またはその誘導体のセットを1つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

(a) 固体支持体を提供するステップであって、前記固体支持体が、1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブおよび複数の表面プライマープローブを含む、ステップ、

(b) 前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを前記1つまたは複数の核酸分子と接触させて、1つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるステップ、

(c) cDNA分子を前記捕捉された核酸分子または誘導体から合成するステップであって、前記合成するステップが、逆転写を行うステップを含み、前記cDNA分子が、前記複数の表面プライマープローブの表面プライマープローブに結合される、ステップ、

(d) アダプターを前記cDNA分子またはその誘導体の3'末端に挿入するステップ、ならびに

(e) 前記cDNA分子またはその誘導体を増幅して、cDNA分子またはその誘導体の前記セットを作成するステップであって、cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記複数の表面プライマープローブの表面プライマープローブに結合される、ステップを含む、方法。

(項目121)

前記アダプターが、cDNA分子またはその誘導体の前記セットのcDNA分子における配列決定反応の開始を可能にするように構成された配列を含む、項目120に記載の方法。

(項目122)

cDNA分子またはその誘導体の前記セットが、前記アダプターを含む、項目121に記載の方法。

(項目123)

(b) の後に、前記固体支持体を、前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくともサブセットを不活化するように構成された部分と接触させるステップを含む、項目120に記載の方法。

(項目124)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの前記サブセットが、核酸分子を捕捉しなかった1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブを含む、項目123に記載の方法。

(項目125)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブの少なくとも前記サブセットを不活化するように構成された前記部分が、エキソヌクレアーゼを含む、項目123に記載の方法。

(項目126)

前記合成するステップが、前記cDNA分子またはその誘導体を含む1つまたは複数の第2鎖合成反応を行うステップを含む、項目120に記載の方法。

(項目127)

前記1つまたは複数の第2鎖合成反応が、テンプレートスイッチ伸長を含む、項目126に記載の方法。

(項目128)

前記1つまたは複数の第2鎖合成反応が、ランダムプライミングを含む、項目126に記載の方法。

(項目129)

(d) の前に、前記cDNA分子またはその誘導体を増幅するステップを含む、項目120に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 3 0)

前記増幅するステップが、(d)の前に、溶液中のプライマー配列を含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 3 1)

(d)の前に、前記 c DNA 分子の断片化を含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 3 2)

(d)が、一本鎖ライゲーション、タグ付け断片化、またはライゲーションを含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 3 3)

前記複数の表面プライマープロープの少なくともサブセットが、前記複数の表面プライマープロープの前記少なくとも前記サブセットにおける伸長反応をブロックする遮断剤を含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

10

(項目 1 3 4)

(e)の前に、前記遮断剤を、前記複数の表面プライマープロープの前記少なくとも前記サブセットをブロック解除する反応に供して、前記伸長反応を可能にするステップを含む、項目 1 3 3 に記載の方法。

(項目 1 3 5)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、1 つまたは複数の 3' リン酸ヌクレオチドを含む、項目 1 3 3 に記載の方法。

(項目 1 3 6)

前記 1 つまたは複数の遮断剤が、前記複数の表面プライマープロープの少なくとも前記サブセットに相補的な配列を含む核酸分子を含む、項目 1 3 3 に記載の方法。

20

(項目 1 3 7)

(e)の後に、c DNA 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを切断または線状化するステップを含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 3 8)

(e)の後に、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端をブロックする、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 3 9)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) と接触させるステップを含む、項目 1 3 8 に記載の方法。

30

(項目 1 4 0)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、DNA 分子の前記セットの前記サブセットの 3' 末端に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させるステップを含む、項目 1 3 8 に記載の方法。

(項目 1 4 1)

DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットの 3' 末端の前記ブロックするステップが、DNA 分子またはその誘導体の前記セットの前記サブセットを、カチオン性-中性ジブロックポリペプチドコポリマーと接触させるステップを含む、項目 1 3 8 に記載の方法。

40

(項目 1 4 2)

前記固体支持体上で、*in situ*で前記 c DNA 分子またはその誘導体の前記少なくとも前記サブセットを配列決定するステップを含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 4 3)

c DNA 分子またはその誘導体の前記セットの少なくともサブセットを前記固体支持体から溶出させるステップを含む、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 4 4)

50

前記1つまたは複数の核酸分子が、DNAまたはリボ核酸(RNA)分子を含む、項目120に記載の方法。

(項目145)

前記DNAが、断片化された一本鎖DNAである、項目144に記載の方法。

(項目146)

前記RNA分子が、メッセンジャーRNA(mRNA)またはマイクロRNA(miRNA)を含む、項目144に記載の方法。

(項目147)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、前記1つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された配列を含む、項目120に記載の方法。

(項目148)

前記1つまたは複数の核酸分子に結合するように構成された前記配列が、ポリT配列、ランダム、前記1つもしくは複数の核酸分子の少なくともサブセットに相補的な配列、またはその任意の組合せを含む、項目147に記載の方法。

(項目149)

前記固体支持体が、ウェル、ビーズ、ゲルマトリックス、または流体チャネルである、項目120に記載の方法。

(項目150)

前記流体チャネルが、フローセルである、項目149に記載の方法。

(項目151)

前記固体支持体が、ビーズではない、項目120に記載の方法。

(項目152)

前記1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブが、1つまたは複数のタグを含み、タグが、細胞特異的または空間の場所特異的識別子配列、および必要に応じて固有分子識別子(UMI)配列を含む、項目120に記載の方法。

(項目153)

前記増幅するステップが、固体支持増幅を含む、項目120に記載の方法。

(項目154)

前記固体支持増幅が、ブリッジ増幅である、項目153に記載の方法。

(項目155)

前記1つまたは複数の核酸分子が、単一細胞または生体組織に由来する、項目120に記載の方法。

(項目156)

(a)~(e)のうちのいずれか1つ、またはその任意の組合せが、ゲルマトリックスにおいて起こり、前記ゲルマトリックスが、前記固体支持体に隣接している、項目120に記載の方法。

(項目157)

相補的デオキシ核酸(cDNA)分子またはその誘導体のセットを複数の細胞由来の1つまたは複数の核酸分子から調製するための方法であって、

(a) 1つまたは複数の核酸分子捕捉用プローブおよびそれに結合した複数の表面プライマープローブを含み、その上に配置された複数の細胞を含む表面を含む固体支持体を提供するステップ、

(b) 前記表面の別々の領域を異なる細胞の前記1つまたは複数の核酸分子と接触させて、前記別々の領域のそれぞれにおいて1つまたは複数の捕捉された核酸分子を生じさせるステップであって、異なる別々の領域における核酸分子が、異なる細胞由来である、ステップ、ならびに

(c) cDNA分子を前記捕捉された核酸分子またはその誘導体から合成するステップであって、前記cDNA分子のそれぞれが、前記固体支持体の前記表面に結合され、異なる別々のエリアに結合されたcDNAが、異なる細胞由来である、ステップ

を含む、方法。

10

20

30

40

50

(項目158)

前記接触させるステップが、前記複数の細胞の前記異なる細胞を溶解試薬で処理して、前記1つまたは複数の核酸分子を前記複数の細胞の前記異なる細胞から放出させるステップを含む、項目157に記載の方法。

(項目159)

前記cDNA分子またはその誘導体を増幅して、cDNA分子またはその誘導体のアンプリコンの複数のセットを作成するステップをさらに含む、項目157に記載の方法。

(項目160)

前記複数の細胞のトランスクリプトームが、前記アンプリコンの前記cDNA分子を配列決定することによって決定される、項目159に記載の方法。

(項目161)

前記表面に結合した前記cDNA分子が、前記表面上の位置をコードする空間バーコードを含み、前記cDNA分子を、前記配列決定することの前に、前記表面から溶出させるステップをさらに含む、項目160に記載の方法。

(項目162)

前記1つまたは複数の核酸分子を前記接触させるステップが、前記1つまたは複数の核酸分子の拡散性を低減する拡散性調整剤の存在下で行われる、項目157に記載の方法。

(項目163)

前記表面が、その上に配置された前記細胞を封入するゲル層を含むか、または前記表面上に配置された前記細胞のそれぞれが、別々のゲル体によって封入されている、項目162に記載の方法。

(項目164)

前記表面上に配置された前記細胞のそれぞれが、ヒドロゲルチャンバーによって囲まれている、項目162に記載の方法。

(項目165)

前記ヒドロゲルチャンバーが、内部エリアを含み、前記接触させるステップが、捕捉された1つまたは複数の核酸分子が放出され、前記内部エリア内で捕捉用プローブによって再捕捉されるように、前記放出された1つまたは複数の核酸分子を所定温度でインキュベートするステップをさらに含む、項目164に記載の方法。

(項目166)

前記ヒドロゲルチャンバーの前記内部エリアが、前記結合されたcDNA分子が少なくとも $0.25\mu\text{m}$ の予想最近隣距離を有するように、選択される、項目165に記載の方法。

(項目167)

前記ヒドロゲルチャンバーの前記内部エリアが、前記結合されたcDNA分子が少なくとも $1\mu\text{m}$ の予想最近隣距離を有するように、選択される、項目165に記載の方法。

(項目168)

前記ヒドロゲルチャンバーの前記内部エリアが、前記結合されたcDNA分子が少なくとも $2\mu\text{m}$ の予想最近隣距離を有するように、選択される、項目165に記載の方法。

(項目169)

前記結合されたcDNA分子が、 $0.5\mu\text{m}$ および $5\mu\text{m}$ の範囲の予想最近隣距離を有する、項目165に記載の方法。

(項目170)

表面上に配置されたヒドロゲルチャンバーであって、前記ヒドロゲルチャンバーが、単一細胞由来の核酸分子の均一な分布を含む内部エリアを含む、ヒドロゲルチャンバー。

(項目171)

前記核酸分子が、mRNA分子である、項目170に記載のヒドロゲルチャンバー。

(項目172)

前記均一な分布が、 $1\mu\text{m}$ またはそれよりも大きい前記核酸分子間の予想最近隣距離を有するポアソン分布である、項目170に記載のヒドロゲルチャンバー。

10

20

30

40

50

(項目 1 7 3)

前記核酸分子の前記均一な分布が、実質的にポアソン分布である、項目 1 7 0 に記載の
ヒドロゲルチャンバー。

10

20

30

40

50