

【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 3 年 11 月 25 日 (2021.11.25)

【公表番号】特表 2021-500012 (P2021-500012A)

【公表日】令和 3 年 1 月 7 日 (2021.1.7)

【年通号数】公開・登録公報 2021-001

【出願番号】特願 2020-518547 (P2020-518547)

【国際特許分類】

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)

【F I】

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/6837 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 10 月 13 日 (2021.10.13)

【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】

マイクロ流体デバイスであって、

少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通して流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

a) 前記複数のトラップ堰の各トラップ堰は、

i) 物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい少なくとも 1 つの寸法の狭窄部と、

i i) 入口領域、内側領域、及び出口領域であって、2 又は 3 つの外側流体流路が、上流側のトラップ堰の前記出口領域から 1 つまたは複数の下流側のトラップ堰の前記入口領域に流れる、前記入口領域、前記内側領域、及び前記出口領域と、を含み、

b) トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比が少なくとも 0.4 である、

マイクロ流体デバイス。

【請求項 2】

流体抵抗の比が少なくとも 0.75 である、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 3】

流体抵抗の比が少なくとも 1.0 である、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 4】

流体抵抗の比が少なくとも 1.25 である、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 5】

取り外し可能な蓋をさらに備える、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 6】

各トラップ堰が、懸濁物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 7】

各トラップ堰が、約 1.5 μm から約 6 μm の範囲である空間寸法を有する少なくとも

1つの狭窄部を含む、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項8】

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造は、懸濁物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項9】

1つ以上のトラップ堰の内側領域が、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る固有の分子識別子を含む、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項10】

方法が、

a) 請求項1に記載のマイクロ流体デバイスを提供する事と、

b) 物体を含む流体をマイクロ流体デバイスに流して、物体を複数のトラップ堰の1つ以上にトラップする事と、

を含む、流体中の懸濁物体をトラップする為の方法。

【請求項11】

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造が、物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

(b)の流す事が第1の流体力学的圧力で行われ、其れに依って、1つ以上のトラップ堰の入口領域の狭窄部に物体をトラップする、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

物体が変形可能な物体を含み、方法が、1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部にトラップされた物体（単数又は複数）に第1の流体力学的圧力よりも高い第2の流体力学的圧力を掛ける事を更に含み、其れに依って、変形可能な物体（単数又は複数）を1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部から内側領域に押し込む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

第1の流体力学的圧力が約1から約100mbarの範囲である、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

第2の流体力学的圧力が約100mbarから約1,000mbarの範囲である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

物体が細胞又はビーズである、請求項10に記載の方法。

【請求項17】

(b)の流す事が少なくとも1回反復され、其れに依って、少なくとも2つの物体が1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められる事を許す、請求項13に記載の方法。

【請求項18】

(b)の流す事が、第1の場合に用いられた物と同じ物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

(b)の流す事が、第1の場合に用いられた物とは異なる物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復される、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められた少なくとも2つの物体が、少なくとも2つの同じ細胞、少なくとも2つの異なる細胞、少なくとも2つの同じビーズ、少なくとも2つの異なるビーズ、又は少なくとも1つの細胞及び1つのビーズを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 2 1】

非混和性の流体をマイクロ流体デバイスに流す事に依って複数のトラップ堰をシールする事を更に含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

非混和性の流体が油又は空気である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

物体が細胞であり、細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 日以上に渡って培養される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 週以上の期間に渡って培養される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

物体が細胞であり、方法が、1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）の細胞を表現型解析する為のイメージング技術の使用を更に含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

イメージング技術が、明視野イメージング、蛍光イメージング、2 光子蛍光イメージング、又は其れ等の何れかの組み合わせから成る群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

複数のトラップ堰の内側領域が夫々固有の分子識別子を含み、此れ等は、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

分子コンポーネントが蛋白質、ペプチド、DNA 分子、RNA 分子、mRNA 分子、又は其れ等の何れかの組み合わせを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

固有の分子識別子が、DNA シーケンシング、遺伝子発現分析、又はクロマチン分析を行う為に用いられる、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

外部から適用される電場が、固有の分子識別子に対する核酸分子コンポーネントのハイブリダイゼーションを容易化する為に用いられる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

マイクロ流体デバイスが更に取り外し可能な蓋を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 2】

変形可能な物体が細胞であり、1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於ける細胞（単数又は複数）のトラップ後に、生体適合性のハイドロゲルがマイクロ流体デバイス内に灌流され、重合する事を許される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

ハイドロゲルの重合後に、マイクロ流体デバイスの蓋が取り外されて、トラップされた細胞へのアクセスを許す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

生体適合性のハイドロゲルが、細胞のリシス時にトラップされた細胞のゲノム材料を閉じ込める為に用いられる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

生体適合性のハイドロゲルが、コラーゲン、ラミニン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ヘパリン、ゼラチン、マトリゲル、ポリエチレングリコール、DNA、成長因子、ペプチド、または細胞外マトリックスの他の成分のうち、任意の組み合わせを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記マイクロ流体デバイスが、取り外し可能な蓋をさらに備える、請求項 1 0 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】0174

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0174】

本発明の好ましい実施形態を本願に示し記載したが、斯かる実施形態は例としてのみ提供されていると言う事は当業者には自明であろう。本発明から逸脱する事なしに、数々の変形、変更、及び置換が今や当業者には思い浮かぶであろう。本発明を実施する際には、本願に記載される本発明の実施形態の種々の代替が何れかの組み合わせで使用され得ると言う事は理解される筈である。次の請求項が本発明の範囲を定義すると言う事と、此れ等の請求項の範囲内の方法及び構造並びに其れ等の均等物が其れ等に依ってカバーされると言う事とが意図されている。

〔付記 1〕

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通して流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は、物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい少なくとも 1 つの寸法の狭窄部を含み、

ii) トラップ堰を通して流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比が少なくとも 0.4 である、

マイクロ流体デバイス。

〔付記 2〕

流体抵抗の比が少なくとも 0.75 である、付記 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 3〕

流体抵抗の比が少なくとも 1.0 である、付記 1 又は 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 4〕

流体抵抗の比が少なくとも 1.25 である、付記 1～3 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 5〕

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通して流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、

ii) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する 1 つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する 1 又は 2 つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルはトラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し；

iii) 比 R_A / R_T が少なくとも 1.0 である、

マイクロ流体デバイス。

〔付記 6〕

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通して流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、

i i) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する 1 つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する 1 又は 2 つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルは、トラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し、

i i i) 流体は、トラップ堰が未占有である場合には第 1 の方向に、トラップ堰が物体に依って占有される場合には第 2 の方向に、隣り合う短いバイパスチャンネルを流れる、マイクロ流体デバイス。

〔付記 7〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 1 である、付記 5 又は 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 8〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 2 である、付記 5 ～ 7 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 9〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 3 である、付記 5 ～ 8 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 10〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 4 である、付記 5 ～ 9 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 11〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 45 である、付記 5 ～ 10 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 12〕

各トラップ堰が、物体の最も小さい寸法の約 2 分の 1 よりも小さい空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、付記 5 ～ 11 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 13〕

各トラップ堰が、懸濁物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、付記 5 ～ 12 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 14〕

各トラップ堰が、約 1. 5 μm から約 6 μm の範囲である空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、付記 5 ～ 13 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 15〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 2 であり、個々のトラップ堰が第 1 の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率が少なくとも 0. 36 である、付記 5 ～ 14 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 16〕

比 R_A / R_T が少なくとも 1. 45 であり、個々のトラップ堰が第 1 の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率が少なくとも 0. 60 である、付記 5 ～ 15 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 17〕

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造は、懸濁物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する 1 つ以上の狭窄部を含む、付記 5 ～ 16 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 18〕

複数のトラップ堰が少なくとも 100 個のトラップ堰を含む、付記 1 ～ 17 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 19〕

複数のトラップ堰が少なくとも1, 000個のトラップ堰を含む、付記1～18の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 20〕

複数のトラップ堰が少なくとも10, 000個のトラップ堰を含む、付記1～19の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 21〕

複数のトラップ堰が少なくとも100, 000個のトラップ堰を含む、付記1～20の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 22〕

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも20%である、付記1～21の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 23〕

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも50%である、付記1～21の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 24〕

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも80%である、付記1～23の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 25〕

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも90%である、付記1～24の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 26〕

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも95%である、付記1～25の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 27〕

更にb) 取り外し可能な蓋を含む、付記1～26の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 28〕

1つ以上のトラップ堰の内側領域が、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る固有の分子識別子を含む、付記1～27の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

〔付記 29〕

方法が、

a) 付記1～27の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイスを提供する事と、

b) 物体を含む流体をマイクロ流体デバイスに流して、物体を複数のトラップ堰の1つ以上にトラップする事と、

を含む、流体中の懸濁物体をトラップする為の方法。

〔付記 30〕

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造が、物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む、付記29に記載の方法。

〔付記 31〕

(b) の流す事が第1の流体力学的圧力で行われ、其れに依って、1つ以上のトラップ堰の入口領域の狭窄部に物体をトラップする、付記29又は30に記載の方法。

〔付記 32〕

物体が変形可能な物体を含み、方法が、1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部にトラップされた物体（単数又は複数）に第1の流体力学的圧力よりも高い第2の流体力学的圧力を掛ける事を更に含み、其れに依って、変形可能な物体（単数又は複数）を1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部から内側領域に押し込む、付記31に記載の方法。

〔付記 33〕

第 1 の流体力学的圧力が約 1 から約 1 0 0 m b a r の範囲である、付記 3 1 又は 3 2 に記載の方法。

〔付記 3 4〕

第 2 の流体力学的圧力が約 1 0 0 m b a r から約 1 , 0 0 0 m b a r の範囲である、付記 3 2 又は 3 3 に記載の方法。

〔付記 3 5〕

第 1 の流体力学的圧力に対する第 2 の流体力学的圧力の比が約 1 0 × から約 2 0 × の範囲である、付記 3 2 ～ 3 4 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 3 6〕

物体が細胞又はビーズである、付記 2 9 ～ 3 5 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 3 7〕

(b) の流す事が少なくとも 1 回反復され、其れに依って、少なくとも 2 つの物体が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められる事を許す、付記 3 2 ～ 3 6 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 3 8〕

(b) の流す事が、第 1 の場合に用いられた物と同じ物体を含む流体を用いて少なくとも 1 回反復される、付記 3 7 に記載の方法。

〔付記 3 9〕

(b) の流す事が、第 1 の場合に用いられた物とは異なる物体を含む流体を用いて少なくとも 1 回反復される、付記 3 7 に記載の方法。

〔付記 4 0〕

1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められた少なくとも 2 つの物体が、少なくとも 2 つの同じ細胞、少なくとも 2 つの異なる細胞、少なくとも 2 つの同じビーズ、少なくとも 2 つの異なるビーズ、又は少なくとも 1 つの細胞及び 1 つのビーズを含む、付記 3 7 ～ 3 9 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 1〕

非混和性の流体をマイクロ流体デバイスに流す事に依って複数のトラップ堰をシールする事を更に含む、付記 2 9 ～ 4 0 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 2〕

非混和性の流体が油又は空気である、付記 4 1 に記載の方法。

〔付記 4 3〕

物体が細胞であり、細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 日以上に渡って培養される、付記 3 2 ～ 4 2 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 4〕

細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 週以上の期間に渡って培養される、付記 4 3 に記載の方法。

〔付記 4 5〕

細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 ヶ月以上の期間に渡って培養される、付記 4 3 に記載の方法。

〔付記 4 6〕

物体が細胞であり、方法が、1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）の細胞を表現型解析する為のイメージング技術の使用を更に含む、付記 3 2 ～ 4 5 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 7〕

イメージング技術が、明視野イメージング、蛍光イメージング、2 光子蛍光イメージング、又は其れ等の何れかの組み合わせから成る群から選択される、付記 4 6 に記載の方法。

。

〔付記 4 8〕

複数のトラップ堰の内側領域が夫々固有の分子識別子を含み、此れ等は、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーシ

ョンさせられ得る、付記 3 2 ～ 4 7 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 9〕

分子コンポーネントが蛋白質、ペプチド、DNA 分子、RNA 分子、mRNA 分子、又は其れ等の何れかの組み合わせを含む、付記 4 8 に記載の方法。

〔付記 5 0〕

固有の分子識別子が、DNA シーケンシング、遺伝子発現分析、又はクロマチン分析を行う為に用いられる、付記 4 9 に記載の方法。

〔付記 5 1〕

外部から適用される電場が、固有の分子識別子に対する核酸分子コンポーネントのハイブリダイゼーションを容易化する為に用いられる、付記 5 0 に記載の方法。

〔付記 5 2〕

マイクロ流体デバイスが更に取り外し可能な蓋を含む、付記 3 2 ～ 5 1 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 5 3〕

変形可能な物体が細胞であり、1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於ける細胞（単数又は複数）のトラップ後に、生体適合性のハイドロゲルがマイクロ流体デバイス内に灌流され、重合する事を許される、付記 5 2 に記載の方法。

〔付記 5 4〕

ハイドロゲルの重合後に、マイクロ流体デバイスの蓋が取り外されて、トラップされた細胞へのアクセスを許す、付記 5 3 に記載の方法。

〔付記 5 5〕

生体適合性のハイドロゲルが、細胞のリシス時にトラップされた細胞のゲノム材料を閉じ込める為に用いられる、付記 5 3 ～ 5 4 の何れか 1 項に記載の方法。