

(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2017-513525

(P2017-513525A)

(43) 公表日 平成29年6月1日 (2017. 6. 1)

(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	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2017-506636 (P2017-506636)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月8日 (2016. 12. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/026338
 (87) 国際公開番号 W02015/161177
 (87) 国際公開日 平成27年10月22日 (2015. 10. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/981, 123
 (32) 優先日 平成26年4月17日 (2014. 4. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507044516
 プレジデント アンド フェローズ オブ
 ハーバード カレッジ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー
 ストリート 1 7
 (71) 出願人 511096639
 ザ ブロード インスティテュート, イ
 ンコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 4 2, ケンブリッジ, メイン ストリ
 ート 4 1 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液滴タグ化のためのシステムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は一般に、微小流体デバイス内で液滴をタグ化するためのシステムおよび方法を含む、かかるデバイスに関する。一部の態様では、微小流体液滴が、種々の異なる条件に液滴（または他の個別の実体）を曝露することによって操作される。液滴中に複数の核酸「タグ」を組み込み、次いで適宜これらの核酸を一緒にライゲーションさせることによって、液滴が曝露された条件は、これらの核酸タグによってコードされ得る。従って、異なる条件に曝露された液滴が一緒に混合される場合であっても依然として、各液滴が遭遇する条件は、例えば、これらの核酸を配列決定することによって決定され得る。

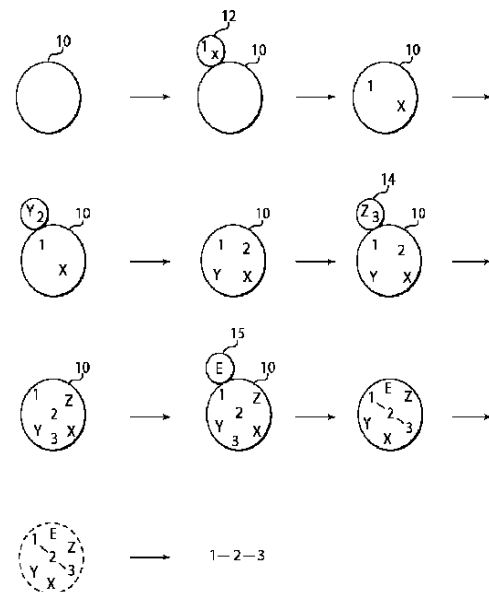


Fig. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 の条件に液滴を曝露し、前記液滴に第 1 の核酸を添加することであって、前記第 1 の核酸は、前記第 1 の条件をコードすること；

第 2 の条件に前記液滴を曝露し、前記液滴に第 2 の核酸を添加することであって、前記第 2 の核酸は、前記第 2 の条件をコードすること；ならびに

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸と一緒にライゲーションさせることを含む方法。

【請求項 2】

前記第 1 の条件に前記液滴を曝露し、前記液滴に前記第 1 の核酸を添加することが、前記液滴を、前記第 1 の核酸を含む第 2 の液滴に融合させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記第 1 の条件に前記液滴を曝露することが、分子種に前記液滴を曝露することを含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記分子種に前記液滴を曝露することが、前記液滴を、前記分子種を含む第 2 の液滴に融合させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 2 の液滴が、前記第 1 の核酸をさらに含み、それによって、前記液滴に前記第 2 の液滴が融合される際に、前記液滴に前記第 1 の核酸が添加される、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記第 2 の液滴が、前記液滴において誘導された双極子を介して、前記液滴に融合される、請求項 4 または 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 2 の液滴が、前記液滴上に配置された反対の電荷を介して、前記液滴に融合される、請求項 4 または 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記分子種に前記液滴を曝露することが、前記液滴に、前記分子種を含む流体を注入することを含む、請求項 3 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記分子種を含む前記流体が、前記第 1 の核酸をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記分子種および前記第 1 の核酸が、前記液滴に同時に添加される、請求項 3 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 の核酸が前記液滴に添加される前に、前記分子種が前記液滴に添加される、請求項 3 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 の核酸が前記液滴に添加された後に、前記分子種が前記液滴に添加される、請求項 3 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記第 1 の条件に前記液滴を曝露することが、外部物理条件に前記液滴を曝露することを含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

外部物理条件に前記液滴を曝露することが、所定の温度および / または所定の圧力に前記液滴を曝露することを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 の条件に前記液滴を曝露することが、前記液滴を、7 未満の pH および / また

50

は 7 よりも高い pH を有する第 2 の液滴に融合させることを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記液滴が、約 1 mm 未満の平均断面直径を有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記液滴が複数の液滴のうちの 1 つであり、前記複数の液滴の約 5 % 以下が、前記複数の液滴の全体的平均直径の約 90 % 未満の直径または約 110 % よりも大きい直径を有するような直径の分布を、前記複数の液滴が有する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 18】

第 3 の条件に前記液滴を曝露し、前記液滴に前記第 3 の核酸を添加することであって、前記第 3 の核酸は、前記第 3 の条件をコードすることをさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 3 の核酸を、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸のうち的一方または両方に結合させることをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸を結合させる行為が、前記液滴内で生じる、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記液滴の特性を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記特性に基づいて、前記液滴を選別することをさらに含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記特性が蛍光性である、請求項 21 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記特性が、前記液滴の平均断面直径である、請求項 21 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記特性が光吸収である、請求項 21 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記特性が、前記液滴内に含まれる薬剤の濃度である、請求項 21 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記特性が、前記液滴内に含まれる細胞の条件である、請求項 21 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記特性が、前記細胞が生きているか死んでいるかである、請求項 27 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記特性が、前記細胞によって生成および / または消費される薬剤の濃度である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記液滴から、結合した第 1 の核酸および第 2 の核酸を分離することをさらに含む、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記液滴を破裂させることをさらに含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

前記液滴が、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸を結合させた後に破裂される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記液滴が、超音波に前記液滴を曝露することによって破裂される、請求項 3 1 または 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記液滴が細胞を含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記細胞が癌細胞である、請求項 3 4 または 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記細胞が免疫細胞である、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記細胞が細菌細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記細胞が、天然に存在する細胞である、請求項 3 4 または 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第 1 の条件が、前記細胞の型である、請求項 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法

20

【請求項 4 1】

前記第 1 の条件が、前記細胞と相互作用することが可能であると疑われる薬物への曝露である、請求項 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 1 の条件が、細胞傷害性であると推定される薬物への曝露である、請求項 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

ライゲーションされた第 1 および第 2 の核酸を配列決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 4 4】

前記液滴が、微小流体チャネル内に含まれる、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

実質的に各々の液滴が、少なくとも 2 つの異なる条件に連続的に曝露されるように、複数の条件に複数の液滴を曝露することであって、液滴が条件に曝露される際に、前記条件をコードする核酸が、前記液滴に添加されることを含む方法。

【請求項 4 6】

液滴内に含まれる前記核酸のうちの少なくとも一部を互いに結合させることをさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

40

【請求項 4 7】

液滴内に含まれる前記核酸のうちの少なくとも一部を互いにライゲーションさせることをさらに含む、請求項 4 5 または 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記核酸のうちの少なくとも一部をライゲーションさせることが、前記核酸を互いにライゲーションさせることができる酵素に、前記核酸を曝露することを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

条件をコードする核酸が、前記核酸を含む第 2 の液滴に液滴を融合させることによって前記液滴に添加される、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 5 0】

条件をコードする核酸が、液滴中に、前記核酸を含む流体を注入することによって前記液滴に添加される、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記条件のうちの少なくとも 1 つが、外部物理条件への曝露である、請求項 4 5 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記条件のうちの少なくとも 1 つが、所定の温度および / または所定の圧力への曝露である、請求項 4 5 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記条件のうちの少なくとも 1 つが、分子種への曝露である、請求項 4 5 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記液滴のうちの少なくとも一部が、細胞を含む、請求項 4 5 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記細胞が実質的に同一である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が、同じ臓器から生じる、請求項 5 4 または 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記細胞が、同じ生物から生じる、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞が、異なる生物から生じる、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記細胞が、同じ生物学的種から生じる、請求項 5 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記細胞がヒト細胞を含む、請求項 5 4 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記条件のうちの少なくとも 1 つが、前記細胞のうちの少なくとも一部と相互作用することが可能であると疑われる薬物への曝露である、請求項 5 4 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

実質的に各々の液滴を、少なくとも 3 つの異なる条件に曝露することを含む、請求項 4 5 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記液滴の特性を決定することをさらに含む、請求項 4 5 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記特性に基づいて、前記液滴のうちの少なくとも一部を選別することをさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記特性が蛍光性である、請求項 6 3 または 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記特性が、前記液滴内に含まれる薬剤の濃度である、請求項 6 3 または 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記特性が、前記液滴内に含まれる細胞の条件である、請求項 6 3 または 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

前記液滴のうちの少なくとも一部から、前記核酸のうちの少なくとも一部を分離することをさらに含む、請求項 45～67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

前記液滴のうちの少なくとも一部を破裂させることをさらに含む、請求項 45～68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記核酸のうちの少なくとも一部を配列決定することをさらに含む、請求項 45～69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

複数の液滴を含む物品であって、前記液滴のうちの少なくとも一部は、前記少なくとも一部の液滴が曝露される複数の条件をコードする核酸を含む、物品。

【請求項 72】

前記核酸が、少なくとも 3 つの条件をコードする、請求項 71 に記載の物品。

【請求項 73】

前記核酸のうちの少なくとも一部が、前記液滴のうちの少なくとも一部内に含まれる分子種をコードする、請求項 71 または 72 のいずれか一項に記載の物品。

【請求項 74】

前記液滴のうちの少なくとも一部が、前記核酸によってコードされるそれぞれの前記分子種をさらに含む、請求項 73 に記載の物品。

【請求項 75】

実質的に各々の前記液滴が、少なくとも 2 つの分子種、および前記少なくとも 2 つの分子種をコードする核酸を含む、請求項 74 に記載の物品。

【請求項 76】

実質的に各々の前記液滴が、少なくとも 3 つの分子種、および前記少なくとも 3 つの分子種をコードする核酸を含む、請求項 74 または 75 のいずれか一項に記載の物品。

【請求項 77】

前記液滴のうちの少なくとも一部が、細胞をさらに含む、請求項 71～76 のいずれか一項に記載の物品。

【請求項 78】

前記細胞が実質的に同一である、請求項 77 に記載の物品。

【請求項 79】

前記液滴のうちの少なくとも一部が、DNA リガーゼをさらに含む、請求項 71～78 のいずれか一項に記載の物品。

【請求項 80】

第 1 の化学種に、液滴内に含まれる細胞を曝露し、前記液滴に第 1 の核酸を添加すること；

第 2 の化学種に前記細胞を曝露し、前記液滴に第 2 の核酸を添加すること；

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸と一緒にライゲーションさせること；

前記細胞の特性を決定すること；ならびに

前記細胞の特性に基づいて、前記液滴を選別すること

含む方法。

【請求項 81】

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸をライゲーションさせることが、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸を互いにライゲーションさせることができる酵素に、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸を曝露することを含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記液滴に前記第 1 の核酸を添加することが、前記液滴を、前記第 1 の核酸を含む第 2 の液滴に融合させることを含む、請求項 80 または 81 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

前記第 1 の分子種に前記液滴を曝露することが、前記液滴を、前記第 1 の分子種を含む第 2 の液滴に融合させることを含む、請求項 80 ~ 82 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 84】

前記第 2 の液滴が、前記第 1 の核酸をさらに含み、それによって、前記液滴に前記第 2 の液滴が融合される際に、前記液滴に前記第 1 の核酸が添加される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記第 1 の分子種に前記液滴を曝露することが、前記液滴に、前記第 1 の分子種を含む流体を注入することを含む、請求項 80 ~ 84 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 86】

前記第 1 の分子種を含む前記流体が、前記第 1 の核酸をさらに含む、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

前記液滴に、前記第 1 の核酸を含む第 2 の流体を注入することをさらに含む、請求項 85 または 86 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

第 3 の分子種に前記液滴を曝露し、前記液滴に第 3 の核酸を添加することをさらに含む、請求項 80 ~ 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

前記第 3 の核酸を、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸のうち的一方または両方に結合させることをさらに含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記特性が、前記細胞が生きているか死んでいるかである、請求項 80 ~ 89 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

前記特性が、前記細胞によって生成または消費される薬剤の濃度である、請求項 80 ~ 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記細胞の前記特性に基づいて、前記液滴を選別することをさらに含む、請求項 80 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記細胞の前記特性を、前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸と関連付けることをさらに含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記液滴から、結合した第 1 の核酸および第 2 の核酸を分離することをさらに含む、請求項 80 ~ 93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

前記液滴を破裂させることをさらに含む、請求項 80 ~ 94 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

前記第 1 の核酸および / または前記第 2 の核酸を決定することをさらに含む、請求項 80 ~ 95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

ライゲーションされた第 1 および第 2 の核酸を配列決定することをさらに含む、請求項 80 ~ 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記行為が、列挙された順序で実施される、請求項 80 ~ 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

複数の細胞型および複数の核酸を含む液滴のライブラリーを含む物品であって、実質的

10

20

30

40

50

に各々の前記細胞型が、独自の核酸配列によってコードされる、物品。

【請求項 1 0 0】

前記ライブラリーが、少なくとも 1 0 の独自の細胞型を含む、請求項 9 9 に記載の物品。

【請求項 1 0 1】

前記ライブラリーが、少なくとも 1 0 0 の独自の細胞型を含む、請求項 9 9 または 1 0 0 のいずれかに一項に記載の物品。

【請求項 1 0 2】

前記ライブラリーが、少なくとも 1 , 0 0 0 の独自の細胞型を含む、請求項 9 9 ~ 1 0 1 のいずれか一項に記載の物品。

【請求項 1 0 3】

実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、および前記ただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を封入することを含む方法。

【請求項 1 0 4】

実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、および前記ただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に少なくとも 1 0 の独自の細胞型および複数の核酸を封入することを含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、および前記ただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に少なくとも 1 0 0 の独自の細胞型および複数の核酸を封入することを含む、請求項 1 0 3 または 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、および前記ただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に少なくとも 1 0 0 0 の独自の細胞型および複数の核酸を封入することを含む、請求項 1 0 3 ~ 1 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

第 1 の条件に前記複数の液滴を曝露し、前記液滴に第 1 の核酸を添加すること、および前記コード核酸および前記第 1 の核酸と一緒にライゲーションさせることをさらに含む、請求項 1 0 3 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記第 1 の条件が、分子種への曝露である、請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記分子種が、前記細胞型のうちの少なくとも一部と相互作用することが可能であると疑われる薬物である、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記分子種が、複数の分子種から選択される、請求項 1 0 8 または 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記分子種が、実質的に各々の液滴が、前記複数の分子種から選択される前記分子種のうちの 1 つに曝露されるように、複数の少なくとも 1 0 の分子種から選択される、請求項 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記分子種が、実質的に各々の液滴が、前記複数の分子種から選択される前記分子種のうちの 1 つに曝露されるように、複数の少なくとも 1 0 0 の分子種から選択される、請求項 1 1 0 または 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記分子種が、実質的に各々の液滴が、前記複数の分子種から選択される前記分子種の

10

20

30

40

50

うちの１つに曝露されるように、複数の少なくとも１，０００の分子種から選択される、請求項１１０～１１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１４】

前記液滴内の前記細胞を溶解させることをさらに含む、請求項１０３～１１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１５】

溶解された細胞によって生成された核酸を、前記液滴内の前記コード核酸にライゲーションさせることをさらに含む、請求項１１４に記載の方法。

【請求項１１６】

溶解された細胞によって生成されたRNAを、前記液滴内の前記コード核酸にライゲーションさせることを含む、請求項１１５に記載の方法。

10

【請求項１１７】

前記RNAがRNA転写物である、請求項１１６に記載の方法。

【請求項１１８】

前記核酸のうちの少なくとも一部を配列決定する、請求項１１５～１１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１９】

デジタルRNA配列決定を使用して、前記核酸のうちの少なくとも一部を配列決定することを含む、請求項１１８に記載の方法。

【請求項１２０】

実質的に各々の液滴が、ただ１つの細胞型の１または複数の細胞、および前記ただ１つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を提供すること；

20

前記液滴内の細胞を溶解させて、前記細胞から細胞性核酸を放出させること；

前記コード核酸および前記細胞性核酸と一緒にライゲーションさせること；ならびにライゲーションされた核酸を配列決定すること

を含む方法。

【請求項１２１】

実質的に各々の液滴が、ただ１つの細胞型の１または複数の細胞、および前記ただ１つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を提供すること；

30

実質的に各々の液滴が、複数の化学種のうちの単一の化学種に曝露されるように、前記複数の化学種に前記複数の液滴を曝露し、前記単一の化学種をコードする第１の核酸をそれに添加すること；

前記液滴内の細胞を溶解させて、前記細胞から細胞性核酸を放出させること；

前記コード核酸、前記第１の核酸および前記細胞性核酸と一緒にライゲーションさせること；ならびに

ライゲーションされた核酸を配列決定すること

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、参照によって本明細書に組み込まれる、Bernsteinらによる表題「Systems and Methods for Droplet Tagging」の、２０１４年４月１７日出願の米国仮特許出願第６１／９８１，１２３号の利益を主張する。

【０００２】

政府の資金提供

本発明は、National Institutes of Healthによって授与された助成金番号P01GM096971、ならびにNational Science Foundationによって授与された助成金番号D

50

MR - 1006546 および DMR - 0820484 の下で、政府の支援によってなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

本発明は一般に、微小流体デバイス内で液滴をタグ化するためのシステムおよび方法を含む、かかるデバイスに関する。

【背景技術】

【0004】

各々その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開 WO 2004 / 091763、WO 2004 / 002627、WO 2006 / 096571、WO 2005 / 021151、WO 2010 / 033200 および WO 2011 / 056546 に開示されるものなどの、微小流体システム内で流体液滴を生成するための種々の技術が存在する。一部の場合には、比較的大きな数の液滴が生成され得、しばしば比較的速いスピードで、例えば、液滴は、少なくとも約 10 液滴 / 秒の速度で生成され得る。これらの液滴は、その中に種々の化学種もまた含み得る。しかし、特に、多数の液滴が生成される場合、および / または液滴が非常に高速度で生成される場合、かかる液滴を正確に追跡することは困難であり得る。さらに、かかる追跡は、液滴が種々の異なる条件に曝露される、異なる化学種を含むなど、液滴が全て同一なわけではないような場合には、複雑なものとなり得る。

【発明の概要】

【0005】

本発明は一般に、微小流体デバイス内で液滴をタグ化するためのシステムおよび方法を含む、かかるデバイスに関する。本発明の主題は、一部の場合には、相互関係のある製品、特定の問題に対する代替的解法、ならびに / または 1 もしくは複数のシステムおよび / もしくは物品の複数の異なる使用を伴う。

【0006】

一態様では、本発明は一般に、方法に関し、1 セットの実施形態によれば、この方法は、第 1 の条件に液滴を曝露し、この液滴に第 1 の核酸を添加することであって、この第 1 の核酸は、第 1 の条件をコードすること；第 2 の条件にこの液滴を曝露し、この液滴に第 2 の核酸を添加することであって、この第 2 の核酸は、第 2 の条件をコードすること；ならびにこの第 1 の核酸および第 2 の核酸と一緒にライゲーションさせることを含む。

【0007】

この方法は、別のセットの実施形態によれば、実質的に各々の液滴が、少なくとも 2 つの異なる条件に連続的に曝露されるように、複数の条件に複数の液滴を曝露する行為であって、液滴が条件に曝露される際に、その条件をコードする核酸が、その液滴に添加される行為を含む。

【0008】

なお別のセットの実施形態では、この方法は、第 1 の化学種に、液滴内に含まれる細胞を曝露し、この液滴に第 1 の核酸を添加する行為、第 2 の化学種にこの細胞を曝露し、この液滴に第 2 の核酸を添加する行為、この第 1 の核酸および第 2 の核酸と一緒にライゲーションさせる行為、細胞の特性を決定する行為、ならびにこの細胞の特性に基づいて、液滴を選別する行為を含む。

【0009】

さらに別のセットの実施形態は、一般に、実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、およびこのただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を封入する行為を含む方法に関する。

【0010】

この方法は、1 セットの実施形態では、実質的に各々の液滴が、ただ 1 つの細胞型の 1 または複数の細胞、およびこのただ 1 つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を提供する行為、この液滴内の細胞を溶解させて、細胞から細胞性核酸を放出させる行為、このコード核酸および細胞性核酸と一緒に

にライゲーションさせる行為、ならびにライゲーションされた核酸を配列決定する行為を含む。

【0011】

別のセットの実施形態では、この方法は、実質的に各々の液滴が、ただ1つの細胞型の1または複数の細胞、およびこのただ1つの細胞型をコードするコード核酸を含むように、複数の液滴中に複数の細胞型および複数の核酸を提供する行為；実質的に各々の液滴が、複数の化学種のうちの単一の化学種に曝露されるように、複数の化学種に複数の液滴を曝露し、この単一の化学種をコードする第1の核酸をそれに添加する行為；この液滴内の細胞を溶解させて、細胞から細胞性核酸を放出させる行為；このコード核酸、第1の核酸および細胞性核酸と一緒にライゲーションさせる行為；ならびにライゲーションされた核酸を配列決定する行為を含む。

10

【0012】

別の一態様では、本発明は一般に、複数の液滴に関する。一部の場合には、これらの液滴のうちの少なくとも一部は、これらの少なくとも一部の液滴が曝露された複数の条件をコードする核酸を含む。

【0013】

本発明は、別の一態様によれば、一般に、複数の細胞型および複数の核酸を含む液滴のライブラリーに関する。一部の実施形態では、実質的に各々のこれらの細胞型は、独自の核酸配列によってコードされる。

【0014】

別の一態様では、本発明は、本明細書に記載される実施形態のうちの1または複数を行う方法を包含する。なお別の一態様では、本発明は、本明細書に記載される実施形態のうちの1または複数を使用する方法を包含する。

20

【0015】

本発明の他の利点および新規特徴は、添付の図面と併せて検討したとき、本発明の種々の非限定的な実施形態の以下の詳細な説明から、明らかとなる。本明細書および参照によって組み込まれる文書が、矛盾する開示および/または一致しない開示を含む場合、本明細書が支配するものとする。参照によって組み込まれる2以上の文書が、互いに対して矛盾する開示および/または一致しない開示を含む場合、より最近の有効日を有する文書が支配するものとする。

30

【0016】

本発明の非限定的な実施形態は、模式的であって正確な縮尺を意図していない添付の図面を参照して、例として記載される。図中、示された各同一またはほぼ同一の構成要素は、典型的には、単一の数字によって示される。明確さを目的として、当業者に本発明を理解させるために例示が必要でない場合、全ての構成要素が全ての図において表示されるわけでも、本発明の各実施形態の全ての構成要素が示されるわけでもない。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～1Cは、本発明の種々の実施形態に従う、液滴をタグ化するための種々の方法を模式的に示す。

40

【図2】図2A～2Bは、本発明の特定の実施形態における、種々の核酸タグと一緒に繋ぐことを模式的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は一般に、微小流体デバイス内で液滴をタグ化するためのシステムおよび方法を含む、かかるデバイスに関する。一部の態様では、微小流体液滴は、種々の異なる条件に液滴（または他の実体）を曝露することによって操作される。液滴中に複数の「タグ」、例えば核酸「タグ」を組み込み、これらのタグと一緒に繋ぐことによって、液滴が曝露された条件がコードされ得る。従って、異なる条件に曝露された液滴と一緒に混合される場合であっても依然として、各液滴が遭遇する条件は、例えば、これらの核酸を配列決定す

50

ることによって決定され得る。

【0019】

最初に、特定の非限定的な例が、図1を参照して議論される。しかし、他の実施形態では、他の構成も同様に使用され得る。最初に図1Aを検討すると、種々の条件（例えば、薬物などの化学種）に曝露される液滴が示され、この液滴が条件に曝露されるたびに、その条件をコードする核酸が、この液滴に添加される。この条件は、化学種の添加である必要はなく、特定の温度への曝露などの物理条件でもあり得ることに、留意すべきである。液滴は図1を参照して議論されるが、これは、提示の容易さだけのためであることにさらに留意すべきである；他の実施形態では、マイクロウェルプレート中のマイクロウェルなどの、他の個別の実体が、これらの液滴の代わりに使用され得る。

10

【0020】

この例で示されるように、液滴10は、最初に、化学種Xおよび核酸1を含む液滴12に遭遇し、この液滴12に融合される。引き続いて、液滴10は、液滴13（化学種Yおよび核酸2を含む）および液滴14（化学種Zおよび核酸3を含む）に遭遇し、これらに融合される。次いで、酵素Eが、例えば別の液滴融合事象の一部として（ここでは液滴15で示される）、何らかの様式で液滴10中に導入され得、またはこの酵素は、液滴10、12、13または14のうちのいずれか1つ中に最初から見出され得る。この酵素は、ライゲーションされた核酸1-2-3で示されるように、核酸1、2および3と一緒にライゲーションさせるために使用され得る。次いで、この液滴は、ライゲーションされた核酸にアクセスするために破裂され得、この核酸は、液滴10の履歴を決定するために、配列決定または他の方法で決定され得る。

20

【0021】

一部の実施形態では、2以上の液滴が、図1Bに示されるような様式で処理され得る。例えば、2以上の液滴は、種々の異なる条件に曝露され得、液滴が条件に曝露されるたびに、その条件をコードする核酸が、この液滴に添加される。しかし、異なる履歴を有するかかる液滴が、コンテナ20中に示されるように、後に組み合わせられる（例えば、混合物中で）場合であっても、液滴の各々が曝露された条件は、各液滴中に含まれる異なる核酸を介してなおも決定可能である。これは、液滴自体が破裂される場合であっても、および/または内容物が一緒に混合される場合であっても、当てはまる。例えば、図1Bに示されるように、核酸1-2-3、4-5-6および7-8-9を決定することによって、コンテナ20中の少なくとも1つの液滴が、条件A、BおよびCに曝露され、少なくとも1つの液滴が、条件I、JおよびKに曝露され、少なくとも1つの液滴が、条件X、YおよびZに曝露されたことがわかる。さらに、コンテナ20中の液滴には、他のセットの条件に曝露されたものがなかったことを決定することも可能であり得る。例えば、コンテナ20中に配列1-2-9が存在しないので、条件X、YおよびKに曝露された液滴が存在しなかったことを決定することが可能である。

30

【0022】

図1Cに示されるように、本発明の特定の実施形態では、液滴の試験および/または選別もまた生じ得る。この図に示されるように、異なる条件（種々の番号によって示される、その中に含まれる核酸によってコードされる）に曝露された複数の液滴が、いくつかの基準に基づいて選別され得る。例えば、液滴がさらに細胞を含む場合、この細胞の特性（例えば、細胞が生きているか死んでいるか）が、2（またはそれ超）の集団へとこれらの液滴を選別するために使用され得る。次いで、各集団は、どの条件が異なる集団をもたらした可能性があるかを決定するために、例えば、その中に含まれる核酸を決定することによって、別々に分析され得る。例えば、図1C中では、液滴30の集団が、第1の群（A）および第2の群（B）に選別された。次いで、各群中の核酸は、配列決定され得る。従って、例えば、群Aのメンバーは各々、条件2および3を共通して有し、群Bのメンバーは、条件2および3を共通して有することはない（しかし、群Bの液滴のうちの一部には、条件2または3が別々に存在していてもよい）ことが、決定され得る。従って、これらの選別実験は、条件2および3の組み合わせが、ある化学種の影響が生じるのに必要であ

40

50

り（群 A）、両方が存在しない場合には、その影響は生じない（群 B）ことを、実証する。

【0023】

また、図 1 C 中で特筆すべきことは、かかる液滴が曝露される条件の数が、必ずしも同じでないことである；その代わり、これらの条件は、即ち、意図的に、または実験誤差もしくは不確実性に起因して、変動し得る。例えば、液滴 2 - 4 は、条件 2 および 4 に曝露され、液滴 1 - 2 - 3 - 6 は、条件 1、2、3 および 6 に曝露された。さらに、核酸を液滴から取り出す前の核酸のライゲーションに起因して、各液滴が曝露された条件は、これらの液滴および / または核酸が引き続いて一緒に混合される場合であっても、別々に維持および分析され得ることに、留意すべきである。従って、図 1 C に関して、核酸が一緒にライゲーションされていない場合、各群は、この例示的な例では、正確に同じ割合で同じ番号（条件を示す）を含むので、群 A および B の各々は、同一であるように見える。

10

【0024】

従って、本発明の特定の実施形態の 1 つの驚くべき特徴は、ライゲーションされた核酸により、単一の条件または複数の条件などのより複雑な条件が、容易に決定されることである。これは、例えば、処置または分析の容易さのために、液滴が破裂される場合であっても、または他の方法で一緒に組み合わせられる場合であっても、情報の喪失なしに達成され得る。対照的に、ライゲーションもタグと一緒に組み合わせる他の方法も用いずに、種々のタグが液滴中に別々に導入される技術では、これらの条件は、そう容易には分析できない；その代わり、（例えば、異なる液滴を破裂または一緒に融合させることによって）偶発的に組み合わせられる任意のタグは情報の喪失を生じるので、液滴の各々を別々に維持することに注意を払わなければならない。

20

【0025】

上記議論は、限定を意図しない；本発明の他の実施形態もまた、ここで議論されるように、液滴をタグ化することができる。例えば、本発明の種々の態様は、一般に、例えば、一緒に結合され得る核酸および他の「タグ」を使用して、微小流体デバイス内で液滴をタグ化または同定するためのシステムおよび方法に関する。タグと一緒に結合させることによって、このタグを含む液滴についての情報は、例えば、タグが液滴から分離され、および / または他の異なるタグと組み合わせられた後であっても、保持され得る。従って、例えば、異なる液滴（例えば、異なる条件に曝露された）由来の複数のタグは、一緒に組み合わせられ分析され得る。

30

【0026】

本発明の特定の実施形態は、例えば、実体の内容物が他の実体の内容物と容易に混合されない場合、複数の液滴または他の個別の実体の使用を伴う。例えば、個別の実体は、運搬流体、マイクロウェルプレートのマイクロウェル、スライドまたは他の表面上の個々のスポットなどの内部に含まれる液滴であり得る。本明細書で議論するように、これらの実体の各々は、他の実体と偶発的に混合することなく、1 または複数のタグまたは他の化学種を含み得る特定の場合であり得る。これらの実体は、一部の場合には比較的小さくてもよく、例えば、各実体は、約 1 ml 未満、約 300 マイクロリットル未満、約 100 マイクロリットル未満、約 30 マイクロリットル未満、約 10 マイクロリットル未満、約 3 マイクロリットル未満、約 1 マイクロリットル未満、約 500 nl 未満、約 300 nl 未満、約 100 nl 未満、約 50 nl 未満、約 30 nl 未満または約 10 nl 未満の容量を有し得る。

40

【0027】

一部の実施形態では、この液滴または他の実体は、種々の化学種、例えば、細胞、化学物質などを含み得る。化学種の他の例は、本明細書で議論される。例えば、この液滴または他の実体が 1 または複数の細胞を含む場合、それらの細胞は、実質的に同一または異なり得る。例えば、液滴または他の実体は、1 つよりも多い細胞または他の化学種を含み得、このとき、これらの細胞（または他の化学種）は、同じまたは異なる；異なる液滴または実体中の細胞（または他の化学種）もまた、同じまたは異なり得る。細胞が使用される

50

場合、それらの細胞はまた、一部の実施形態では、細胞の特定の集団由来、例えば、特定の臓器または組織由来（例えば、心臓細胞、免疫細胞、筋肉細胞、癌細胞など）、特定の個体または化学種由来の細胞（例えば、ヒト細胞、マウス細胞、細菌など）、異なる生物由来の細胞、天然に存在するサンプル（例えば、池の水、土壌など）由来の細胞などであり得る。

【0028】

従って、非限定的な例として、1つの特定の型の細胞（または複数の特定の型の細胞）に対する1または複数の条件の影響が、研究され得る。別の一例として、細胞の適切な集団に対する1つのある特定の条件（または複数の条件）の影響が、研究され得る。さらに、本発明が細胞の研究のみに限定されないことに留意すべきである。他の実施形態では、例えば、これらの液滴または他の実体は、種々の条件が適用される化学種を含み得る。例えば、この化学種は、化学的試薬、例えば、生物学的または非生物学的な、有機または無機などの試薬であり得る。例えば、この化学種は、ポリマー、核酸、タンパク質、薬物、小分子化合物（例えば、約1000Da未満または約2000Da未満の分子量を有する）、抗体、酵素、ペプチドなどであり得る。化学種の他の例は、以下でより詳細に議論される。

10

【0029】

1または複数のタグが、液滴（または他の実体）内に存在し得、その液滴の正体および/または履歴を決定するために分析され得る。一部の場合には、これらのタグは、液滴または他の実体の他の構成要素と比較して、比較的不活性であるように選択され得る。これらのタグは、液滴もしくは他の実体中に最初から存在し得、および/または、例えば、以下に記載されるようなプロセスを使用して、引き続いて添加され得る。例えば、タグは、液滴または他の実体が1または複数の条件に曝露される際に（またはかかる曝露に時間的に接近して）、添加され得る。一部の場合には、1よりも多いタグが、1つの液滴または他の実体中に存在し得る。

20

【0030】

本発明の特定の実施形態では、液滴または他の実体内のタグは、繋がれたタグを生成するために、例えば化学的に、一緒に繋がれ得る。任意の適切な技術が、例えば、液滴または実体からの取り出しの前に、タグと一緒に繋ぐために使用され得る。これらのタグは、任意の適切な技術を使用して繋がれ得る。例えば、これらのタグは、酵素、触媒または反応体を使用して一緒に繋がれ得、任意の適切な技術を使用して、液滴または他の実体に添加され得る。例えば、タグを含む液滴は、化学的薬剤を含む別の液滴に融合され得、または化学的反応体が、例えば、ピペッティングまたは他の技術を使用して、および一部の場合には自動化された技術を使用して、液滴または他の実体中に添加または挿入され得る。

30

【0031】

繋がれたタグを生成するために、液滴（または他の実体）中でタグと一緒に繋ぐことによって、この液滴の正体および/または履歴は、タグが液滴から分離されている場合であっても、または異なる液滴由来のタグと一緒に混合される場合であっても、繋がれたタグを維持することにより維持され得る。例えば、種々の液滴または実体由来の繋がれたタグは、一緒に収集され得、分析され得る。一部の実施形態では、一連の液滴または他の実体は、種々の特性に依存して種々の群へと分離され得、各群内のタグは、一緒に操作され得、および/またはかかる特性を有するかかる液滴もしくは実体を同定するために使用され得る。

40

【0032】

これらのタグには、例えば、リガーゼなどの、核酸と一緒にライゲーションさせることができる適切な酵素を使用して、一緒に繋ぐまたはライゲーションすることができる核酸が含まれ得る。リガーゼの非限定的な例には、DNAリガーゼ、例えば、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、T4 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、エシェリキア・コリ（E. coli）DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼなどが含まれる。多くのかかるリガーゼ

50

は、商業的に購入され得る。さらに、一部の実施形態では、2以上の核酸が、アニーリングまたはプライマー伸長法を使用して、一緒にライゲーションされ得る。

【0033】

本明細書で議論するように、核酸の種々の配列が、液滴または他の実体が曝露され得る特定の条件をコードするために使用され得、かかる核酸は、特定の実施形態によれば、条件へのかかる曝露を示すために、それに添加され得る。一部の場合には、液滴または他の実体内の核酸は、取り出し（例えば、液滴の破裂、スライドの洗浄の際など）の前に、一緒にライゲーションされ得る。異なる液滴または実体由来の異なる核酸は、一緒に混合され得る；しかし、かかる混合の後であっても、各核酸は、対応する液滴または実体が曝露された特定の条件を決定するために、個々に配列決定され得る。

10

【0034】

任意の適切なシステムが、コード化のために使用され得る。例えば、1セットの実施形態では、核酸タグは、ヌクレオチドのコード領域を含み得、および接続領域を含んでもよい。コード領域中のヌクレオチドは、特定の条件（または条件のセット）に対応し得る。任意の適切な数の条件が、かかる様式で任意にコードされ得、かかるコード領域によってコード可能な条件の数は、このコード領域中のヌクレオチドの数によって決定され得る。従って、例えば、長さ n を有するコード領域は、最大 4^n 個の領域（ヌクレオチドの4つの型に基づく）をコードできる。例えば、第1の条件は、Aでコードされ得、第2の条件は、T（または核酸がRNAの場合にはU）でコードされ得、第3の条件はGでコードされ得、第4の条件は、Cでコードされ得る、など。より複雑な一例として、3つのヌクレオチドを含むコード領域は、50を超える異なる条件（ $4^3 = 64$ であるので）をコードするのに十分である。1または複数のコード領域が使用され得る。さらに、このコード領域は、特定の実施形態では、誤差の検出および/または補正、冗長性などのために使用される他のヌクレオチドもまた含み得る。

20

【0035】

核酸タグは、一部の場合には、一緒にライゲーションされる1または複数の接続領域もまた含み得る。例えば、この接続領域は、特定の核酸のみが適切に一緒にライゲーションされ得るように、核酸の「粘着末端」またはオーバーハングを含み得る。例えば、図2Aに示されるように、第1の核酸タグ21（第1の条件をコードする）は、第2の核酸タグ22上の粘着末端には実質的に相補的であるが第3の核酸タグ23上の粘着末端には相補的でない第1の粘着末端を含み得る；同様に、第2の核酸22（第2の条件をコードする）は、第3の核酸タグ23（第3の条件をコードする）上の粘着末端には実質的に相補的であるが第1の核酸21上の粘着末端には相補的でない粘着末端を含み得る。従って、適切なりガーゼへの曝露の際に、第1、第2および第3の核酸は、核酸が不正確な順序で一緒に不正確にライゲーションされる（例えば、第1の核酸が別の第1の核酸にライゲーションされる）ことなく、引き続き研究に適切な順序で、一緒に繋がれまたはライゲーションされ得る。従って、最終的なライゲーションされた核酸を配列決定することによって、この核酸が、第1、第2および第3の条件に曝露された液滴または他の実体中に存在したことが決定され得る。

30

【0036】

しかし、他の実施形態では、核酸タグが特定の構成または順序で一緒にライゲーションされることを確実にする必要性がない場合があることを理解すべきである。例えば、図2Bに示されるように、核酸21、22および23は、任意の適切な順序で一緒にライゲーションされ得る；得られたライゲーションされた核酸は、この核酸が核酸21、22および23によってコードされる条件をコードしたことを決定するために、分析され得る。

40

【0037】

この核酸タグはまた、用途に応じて、任意の適切な長さまたは数のヌクレオチドを有し得る。例えば、核酸タグは、10nt、30nt、50nt、100nt、300nt、500nt、1000nt、3000nt、5000ntまたは10000ntなどよりも、短いまたは長い長さを有し得る。一部の場合には、核酸タグの他の部分は、例えば、

50

条件をコードすることに加えて、他の目的のためにも使用され得る。例えば、核酸タグの部分は、核酸タグの嵩を増加させるため（例えば、特異的配列またはナンセンス配列を使用する）、取り扱いを容易にするため（例えば、タグは、ポリ A テイルを含み得る）、結合の選択性を増加させるため（例えば、以下で議論される）、酵素（例えば、適切りガーゼ）による認識を促進するため、同定を促進するためなどに使用され得る。

【0038】

言及されるように、本発明の特定の態様では、1または複数の条件は、例えば、かかる条件に曝露された液滴または他の実体に添加されるなどして、かかるタグを使用してコードされ得る。従って、例えば、液滴は、第1の条件に曝露され得、第1のタグがこの液滴に添加され得、次いで、この液滴は、第2の条件に曝露され得、第2のタグがこの液滴に添加され得、次いで、この液滴は、第3の条件に曝露され得、第3のタグがこの液滴に添加され得、次いで、この液滴は、第4の条件に曝露され得、第4のタグがこの液滴に添加され得る、など。従って、任意の数の条件が存在し得、例えば、液滴または他の実体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ超の条件に曝露され得る。これらのタグはまた、以前に議論したように、この液滴または実体の履歴および/または正体をコードする繋がれたタグを生成するために、一緒に組み合わせられ（例えば、一緒にライゲーションされ）得る。

10

【0039】

任意の適切な条件が、これらのタグによってコードされ得る。例えば、1セットの実施形態では、この液滴または他の実体の正体は、1または複数のタグを使用してコードされ得る。例えば、各液滴または実体には、独自のタグ、またはタグの独自の組み合わせが割り当てられ得る。別の例として、この条件は、液滴または他の実体が内部からおよび/または外部から曝露される化学種であり得る。広範な種々の化学種のいずれかが、適切なタグによってコードされ得る。例えば、この化学種は、薬物（または疑似薬物）、細胞、ポリマー、ペプチド、タンパク質、酵素、ホルモン、抗生物質、ビタミン、炭水化物、糖、抗体、試薬、ガス、色素、イオン、ウイルス、細菌、pHレベル（例えば、酸性または塩基性条件）などであり得る。従って、例えば、複数の細胞または複数の細胞型は、独自のタグ、またはタグの独自の組み合わせを使用してコードされ得る。任意の数のタグが、用途に応じて、かかる条件をコードするために使用され得る。例えば、本明細書に記載されるもののいずれかなどの、類似の数の適切な条件を実質的にコードする、例えば、少なくとも10、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも300、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも3,000、少なくとも5,000、少なくとも10,000、少なくとも30,000、少なくとも50,000、少なくとも100,000またはそれ超の独自のタグが存在し得る。例えば、実質的に各々の液滴が、1つの細胞または1つの細胞型、および関連のタグ、例えば核酸を含むように、第1の条件として、複数の細胞または細胞型を含む液滴のライブラリーがコードされ得る。

20

30

【0040】

さらに、この条件はまた、一部の場合には、外部物理条件であり得る。例えば、この液滴または他の実体は、外部物理条件、例えば、特定のまたは所定の温度、圧力、電気的条件（例えば、電流、電圧など）などに曝露され得、適切なタグは、この外部物理条件への曝露の前、その間またはその後に、液滴または実体中に導入され得る。なお別の例として、この条件は、処理条件、例えば、濾過、沈降、遠心分離などであり得る。

40

【0041】

1セットの実施形態では、この条件は、液滴内に含まれ得る細胞を溶解させるために使用される条件であり得る。例えば、この条件は、溶解性の化学物質（例えば、純水、Triton-XまたはSDSなどの界面活性剤、リゾチームなどの酵素、リゾスタフィン、ザイモラーゼ（zymolase）、セルラーゼ、ムタノリシン（mutanolysin）、グリカナーゼ、プロテアーゼ、マンナーゼ（mannase）など）または物理条件（例えば、超音波、紫外線、機械的攪拌など）への曝露であり得る。一部の場合には、細胞を溶解させることは、その細胞が、その内容物、例えば、細胞性核酸、タンパク質、酵素、糖などを、放出させ

50

ることになる。一部の実施形態では、細胞性核酸のうちの一部もまた、液滴内に含まれる 1 または複数の核酸にライゲーションされ得る。例えば、1 セットの実施形態では、典型的には細胞内で生成される RNA 転写物が放出され得、次いで、核酸タグにライゲーションされ得る。

【0042】

これらおよび / または他の条件のいずれかの組み合わせもまた企図される。例えば、上述のように、液滴は、第 1 のタグによってコードされる第 1 の条件、第 2 のタグによってコードされる第 2 の条件、第 3 のタグによってコードされる第 3 の条件などに曝露され得る。これらの条件は、同じまたは異なり得る。さらに、液滴または他の実体は、任意の数の条件（例えば、1、2、3、4、5、6 など）に曝露され得、異なる液滴または実体は、同じ条件または同じ数の条件に曝露される必要はない。さらに、一部の実施形態では、複数の液滴（または他の実体）が、例えば、全ての液滴が全ての条件に曝露されとは限らないように、複数の条件にランダムに曝露され得る。上述のように、液滴または他の実体が条件に曝露される際、この条件をコードする核酸は、その液滴または実体の具体的な履歴が予め決定される必要がなく、ランダムに決定され得るように、この液滴または実体に添加され得る。例えば、複数の初期の実質的に同一な液滴（または他の実体）は、各初期の液滴が 1 または複数の第 2 の液滴にランダムに融合されるように、異なる化学種（および / または異なる濃度での 1 もしくは複数の化学種）を含む複数の第 2 の液滴に曝露され得る。

【0043】

さらに、一部の実施形態では、液滴または他の実体は、種々の特性に応じて種々の群へと分離または選別され得、各群内のタグは、一緒に操作され得、および / またはかかる特性を有するかかる液滴もしくは実体を同定するために使用され得る。従って、非限定的な例として、液滴（または他の実体）は、反応が液滴内で生じたか否かに応じて、第 1 の群または第 2 の群に選別され得、液滴は、液滴内に含まれる細胞または他の化学種の特性に基づいて選別され得る、など。2 以上の群中への選別もまた生じ得る。

【0044】

一部の場合には、液滴（または他の実体）の群のうちの一部または全ては、それらの群内の液滴もしくは実体の特徴を決定するため、および / または他の群からその群を分離する群内の液滴もしくは実体の特徴を決定するために、例えば、その中に含まれるタグを使用して、分析され得る。例えば、群のメンバーは、例えば、図 1 C に関して上で説明したように、他の群メンバーからそれらの群メンバーを分離する、1 もしくは複数のタグ、および / またはタグの 1 もしくは複数の特定の組み合わせを、共通して有し得る。かかるタグは、例えば、特定の成果を生じる 1 もしくは複数の条件を同定するため、またはその成果を生じない条件から、特定の成果を生じる 1 もしくは複数のかかる条件を識別するために、使用され得る。

【0045】

従って、1 セットの実施形態では、液滴または他の実体の特性が決定され、この液滴または他の実体は、その特性に基づいて選別される。この特性はまた、液滴または実体内に含まれる化学種、例えば細胞の特性であり得る。この特性は、決定され得る任意の物理的または化学的特性であり得る。例えば、液滴または他の実体（またはその中に含まれる化学種）の特性、例えば、蛍光性、透明度、密度、サイズ、容量などが、決定され得、選別目的のために使用され得る。一部の場合には、1 または複数の試薬もまた、例えば選別目的のために、例えば、決定され得る反応を開始または促進するために、この液滴または他の実体に添加され得る。

【0046】

一部の場合には、これらの液滴または他の実体は、タグにアクセスするために、破裂または破壊され得る。これは、任意の適切な時点、例えば、タグと一緒にライゲーションまたは繋ぐ前またはその後に、生じ得る。例えば、運搬流体中に含まれた液滴は、機械的破壊または超音波などの技術を使用して、破壊され得る。同様に、表面上の実体は、タグを

収集するために、化学的薬剤もしくは界面活性剤への曝露を使用して破壊され得、または洗浄もしくはリンスされ得る。

【0047】

次いで、これらのタグは、液滴（または他の実体）の正体および／または履歴を決定するために、例えば、その液滴または他の実体が曝露された条件を決定するために、決定され得る。任意の適切な方法が、使用されるタグの型に応じて、タグを決定するために使用され得る。例えば、蛍光粒子は、蛍光測定を使用して決定され得、または核酸は、種々の技術および機器を使用して配列決定され得、その多くは、商業的に容易に入手可能である。かかる技術の例には、鎖終結配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、Maxam-Gilbert配列決定、ダイターミネーター配列決定、鎖終結法、大規模並行シグネチャー（Massively Parallel Signature）配列決定（Lynx Therapeutics）、ポロニー（polony）配列決定、ピロシーケンス、ライゲーションによる配列決定、イオン半導体配列決定、DNAナノボール配列決定、単一分子リアルタイム配列決定、ナノポア配列決定、微小流体Sanger配列決定、デジタルRNA配列決定（「デジタルRNA-seq」）などが含まれるがこれらに限定されない。

10

【0048】

さらに、一部の場合には、1または複数の他の化学種は、例えば、共有結合によってそれと結合またはライゲーションされたタグと関連付けられ得る。例えば、以前に議論したように、一部の場合には、溶解された細胞によって放出された核酸は、1または複数のタグにライゲーションされ得る。これらには、例えば、染色体DNA、RNA転写物、tRNA、mRNA、ミトコンドリアDNAなどが含まれ得る。かかる核酸は、タグ自体を配列決定することに加えて配列決定され得、タグ、または対応する液滴もしくは細胞が曝露された条件と関連付けられ得る、細胞の核酸プロファイルについての情報を生じ得る。従って、非限定的な例として、細胞からのRNA転写物は、1または複数のタグにライゲーションすることができ、また配列決定し、対応する液滴または細胞が曝露された条件と関連付けて、アポトーシス遺伝子シグネチャー、増殖停止シグネチャー、免疫シグネチャー、代謝遺伝子セット、または他の公知の薬剤に対する感受性もしくは耐性を付与する遺伝子の発現などの情報を決定することができる。

20

【0049】

本明細書に記載されるものなどのタグは、種々の状況において、例えば、新たな薬物もしくは他の処置についてスクリーニングもしくはバイオプロスペクティングするため、ハイスループットスクリーニング技術として、種々の曝露条件が有する、細胞に対する影響を研究するためなどに、使用され得る。さらに、本発明が細胞研究のみに限定されないことを理解すべきである。例えば、液滴内に含まれる化学物質は、種々の異なる条件（例えば、潜在的な反応体または触媒、反応条件、イニシエーターなど）、およびその化学物質が関与できる反応を決定または最適化するためにタグ化された異なる条件に曝露され得る。一部の場合には、この化学物質は、生物学的に活性な化学物質（例えば、薬物、タンパク質、ポリマー、炭水化物など）であり得るが、他の場合には、この化学物質は、生物学的に関連する必要はない。例えば、この化学物質は、モノマーまたはポリマー、触媒、半導体材料などであり得る。

30

40

【0050】

非限定的な例として、1セットの実施形態では、複数の実質的に同一な細胞が、いずれの物質が細胞に対して有利な影響または有害な影響を有するかを決定するために、適宜種々の物理条件（例えば、種々の温度）下で、種々の物質（例えば、他の細胞、化学的化合物、土壌サンプル、天然に存在するサンプルなど）に曝露され得る。例えば、実質的に同一な細胞は、単独でもしくは組み合わせて抗癌特性もしくは抗腫瘍特性を有する物質を同定するために物質のパネルに対してスクリーニングされる癌細胞であり得、または実質的に同一な細胞は、それに対する特定の活性が所望される免疫細胞もしくは他の細胞であり得る。このパネルは、例えば、天然に存在する化合物、合成化合物、ライブラリー由来の化合物、特定の特性を共有する化合物などを含み得る。一部の場合には、これらの化合物

50

は、1つよりも多い濃度でも存在し得る。このパネルの各メンバーは、液滴（または他の実体）中の細胞の、パネルメンバーへの曝露の際に、適切な対応するタグが添加されるように、本明細書で議論したようにタグ化され得る。これらのタグはまた、一緒にライゲーションされ得るか、または他の方法で繋がれ得る。従って、例えば、実質的に同一な細胞は、種々の組み合わせで、種々の物質に曝露され得、引き続いて、死細胞から生細胞が選別される；生細胞（および/または死細胞）を含む液滴由来のタグは、これらの細胞を死滅させることができる条件またはパネルメンバーを決定するために、本明細書で議論したように分離および配列決定され得る。さらに、本発明は、実質的に同一な細胞のみに限定されない。例えば、別のセットの実施形態では、異なる細胞（または他の化学種、例えば化学物質）を含む液滴が使用され得る。

10

【0051】

例えば、液滴（または液滴内の化学種）を決定する、液滴を選別するなどのための、微小流体システムにおいて液滴を操作するためのシステムおよび方法に関するさらなる詳細は、以下である。例えば、液滴をスクリーニングおよび/または選別するための種々のシステムおよび方法は、参照によって本明細書に組み込まれる、2007年1月4日に米国特許出願公開第2007/000342号として公開された、Linkらによる表題「Electronic Control of Fluidic Species」の、2006年2月23日出願の米国特許出願第11/360,845号に記載されている。非限定的な例として、第1の電場（またはその一部分）を適用（または除去）することによって、液滴は、第1の領域またはチャンネルに導かれ得る；デバイス（またはその一部分）に第2の電場を適用（または除去）することによって、液滴は、第2の領域またはチャンネルに導かれ得る；デバイス（またはその一部分）に第3の電場を適用することによって、液滴は、第3の領域またはチャンネルに導かれ得る；などであり、ここで、これらの電場は、例えば、強度、方向、周波数、持続時間などにおいて、何らかの方法で異なり得る。

20

【0052】

本発明の特定の実施形態では、流体液滴の1または複数の特徴の決定を可能にするような様式で、流体液滴の1もしくは複数の特徴、および/または流体液滴を含む流体システム（例えば、流体液滴を取り囲む液体）の一部分の特徴を感知および/または決定できるセンサーが、提供される。液滴に関して決定可能であり、本発明において使用可能な特徴は、当業者によって同定され得る。かかる特徴の非限定的な例には、蛍光性、分光法（例えば、光学、赤外、紫外など）、放射活性、質量、容量、密度、温度、粘度、pH、生物学的物質（例えば、タンパク質、核酸など）などの物質の濃度、などが含まれる。

30

【0053】

一部の場合には、このセンサーは、プロセッサに接続され得、このプロセッサは、次に、例えば以前に記載したように、例えば、液滴を選別し、電荷を付加しまたは液滴から電荷を除去し、液滴を別の液滴に融合させ、液滴を分割し、液滴内で混合を生じさせることなどによって、流体液滴に対してオペレーションが実施されるようにする。例えば、流体液滴のセンサー測定に応答して、プロセッサは、流体液滴が分割されるようにし、第2の流体液滴と統合されるようにし得る、など。

【0054】

1または複数のセンサーおよび/またはプロセッサは、流体液滴と感知連絡するように位置させることができる。「感知連絡」とは、本明細書で使用する場合、流体システム内（例えば、チャンネル内）の流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの一部分が、何らかの様式で感知および/または決定され得るように、センサーが任意の場所に位置させることができることを意味する。例えば、センサーは、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの部分と、流体的に、光学的にまたは視覚的に、熱的に、空気圧で、電子工学的に、などで感知連絡し得る。センサーは、流体システムに接近して位置させることができる、例えば、チャンネルの壁内に包埋されもしくはチャンネルの壁と一体的に接続され得、または流体システムと離れてではあるが、流体液滴および/もしくは流体液滴を含む流体システム（例えば、チャンネルまたはマイクロチャンネル、流体液滴を含む

40

50

液体など)の一部を感知および/もしくは決定できるように、流体システムと物理的、電気的および/もしくは光学的に連絡するように位置させることができる。例えば、センサーは、液滴を含むチャンネルとの物理的接続が全くなくてもよいが、赤外線、紫外線または可視光などの、液滴または流体システムから生じる電磁放射線を検出するように位置させることができる。この電磁放射線は、液滴によって生成され得、および/または流体システムの他の部分から(流体システムの外部から)生じ得、例えば、吸収、反射、回折、屈折、蛍光、リン光、極性における変化、相転移、時間に対する変化などを介して、流体液滴の1または複数の特徴を示すような様式で、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの部分と相互作用し得る。一例として、レーザーが、流体液滴および/または流体液滴を取り囲む液体に向かって導かれ得、流体液滴および/または取り囲む液体の蛍光性が決定され得る。「感知連絡」はまた、本明細書で使用する場合、直接的または間接的であり得る。一例として、流体液滴からの光は、センサーに導かれ得るか、またはセンサーに導かれる前に、最初に光ファイバーシステム、導波管などを介して導かれ得る。

10

【0055】

本発明において有用なセンサーの非限定的な例には、光学または電磁気ベースのシステムが含まれる。例えば、このセンサーは、蛍光センサー(例えば、レーザーによって刺激される)、顕微鏡システム(カメラまたは他の記録デバイスを含み得る)などであり得る。別の例として、このセンサーは、電子センサー、例えば、電場または他の電気的特徴を決定することができるセンサーであり得る。例えば、このセンサーは、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの部分のキャパシタンス、インダクタンスなどを検出し得る。

20

【0056】

本明細書で使用する場合、「プロセッサー」または「マイクロプロセッサー」は、例えば、数式または電子回路もしくは計算回路を使用することによって、1もしくは複数のセンサーからのシグナルを受信し、シグナルを保存し、および/または1もしくは複数の応答を導く(例えば、上記のように)ことができる、任意の構成要素またはデバイスである。このシグナルは、センサーによって決定される環境因子を示す任意の適切なシグナル、例えば、空気圧シグナル、電子シグナル、光学シグナル、機械的シグナルなどであり得る。

【0057】

1セットの実施形態では、流体液滴は、液滴上に電荷および/または電気双極子を生じさせ、AC場、DC場などであり得る適用された電場を使用して液滴を操向することによって、導かれ得る。一例として、電場は、特定の領域に流体液滴を導く必要に応じて、選択的に適用および除去され得る(または異なる電場、例えば、逆電場が適用され得る)。この電場は、一部の実施形態では、流体液滴を含む液体の流れを実質的に変更することなしに、必要に応じて選択的に適用および除去され得る。例えば、液体は、実質的に定常状態を基準にして(即ち、流体液滴を含む液体の平均流速は、定常状態の流れまたは時間に対する液体の流れの予測された値の、20%未満または15%未満逸脱する、一部の場合には、この平均流速は、10%未満または5%未満逸脱し得る)、または本発明の流体システムを介して(例えば、チャンネルまたはマイクロチャンネルを介して)他の所定の基準で流れ得、この液体内に含まれる流体液滴は、流体システムを介した液体の流れを実質的に変更することなしに、例えば電場を使用して、種々の領域に導かれ得る。

30

40

【0058】

一部の実施形態では、これらの流体液滴は、液滴を含む液体の流れを変更させることによって、本発明の流体システム内でスクリーニングまたは選別され得る。例えば、1セットの実施形態では、流体液滴は、第1のチャンネル、第2のチャンネルなどの中に、流体液滴を取り囲む液体を導くことによって、操向または選別され得る。

【0059】

別のセットの実施形態では、流体システム内、例えば、異なるチャンネル内またはチャンネルの異なる部分内の圧力は、流体液滴の流れを導くために制御され得る。例えば、液滴は

50

、流れをさらに導く複数の選択肢を含むチャネル分岐合流点に向けて導かれ得る（例えば、適宜、下流のフローチャネルを規定するチャネル中の分枝またはフォークに向けて導かれる）。適宜の下流のフローチャネルのうちの１または複数内の圧力は、チャネルのうちの１つへと液滴を選択的に導くために制御され得、圧力における変化は、各連続的な液滴の下流の流路が独立して制御され得るように、連続的な液滴が分岐合流点に達するのに必要な時間のオーダーに影響を与え得る。１つの配置では、液体リザーバの拡張および／または収縮が、例えば、流体液滴を含む液体の導かれた動きを引き起こすことによって、チャネル中に流体液滴を操向または選別するために使用され得る。これらの液体リザーバは、起動された場合に、起動されたリザーバによって引き起こされる液体の動きが、液体を好ましい方向に流れさせ、流体液滴を好ましい方向に運搬するように、位置させることができる。例えば、液体リザーバの拡張は、リザーバに向かう液体の流れを引き起こし得るが、液体リザーバの収縮は、リザーバから離れる液体の流れを引き起こし得る。一部の場合には、この液体リザーバの拡張および／または収縮は、例えば本明細書に記載されるように、他の流れ制御デバイスおよび方法と組み合わせられ得る。液体リザーバの拡張および／または収縮を引き起こすことができるデバイスの非限定的な例には、ピストンおよび圧電性構成要素が含まれる。一部の場合には、圧電性構成要素は、例えば電気的シグナルに応答したその比較的迅速な応答時間に起因して、特に有用であり得る。一部の実施形態では、これらの流体液滴は、２つよりも多いチャネル中に選別され得る。

10

【００６０】

上述のように、特定の実施形態は、一般に、一部の場合には比較的高速度で、液体中の流体液滴を選別するためのシステムおよび方法に関する。例えば、液滴の特性は、何らかの様式（例えば、本明細書にさらに記載されるとおり）で感知および／または決定され得、次いで、この液滴は、例えば選別目的のために、微小流体チャネルなどのデバイスの特定の領域に向けて導かれ得る。一部の場合には、速い選別スピードは、本発明の特定のシステムおよび方法を使用して達成可能であり得る。例えば、一部の場合には、少なくとも約１０液滴／秒が決定および／または選別され得、他の場合には、少なくとも約２０液滴／秒、少なくとも約３０液滴／秒、少なくとも約１００液滴／秒、少なくとも約２００液滴／秒、少なくとも約３００液滴／秒、少なくとも約５００液滴／秒、少なくとも約７５０液滴／秒、少なくとも約１，０００液滴／秒、少なくとも約１，５００液滴／秒、少なくとも約２，０００液滴／秒、少なくとも約３，０００液滴／秒、少なくとも約５，０００液滴／秒、少なくとも約７，５００液滴／秒、少なくとも約１０，０００液滴／秒、少なくとも約１５，０００液滴／秒、少なくとも約２０，０００液滴／秒、少なくとも約３０，０００液滴／秒、少なくとも約５０，０００液滴／秒、少なくとも約７５，０００液滴／秒、少なくとも約１００，０００液滴／秒、少なくとも約１５０，０００液滴／秒、少なくとも約２００，０００液滴／秒、少なくとも約３００，０００液滴／秒、少なくとも約５００，０００液滴／秒、少なくとも約７５０，０００液滴／秒、少なくとも約１，０００，０００液滴／秒、少なくとも約１，５００，０００液滴／秒、少なくとも約２，０００，０００もしくはそれ超の液滴／秒、または少なくとも約３，０００，０００もしくはそれ超の液滴／秒が、決定および／または選別され得る。

20

30

【００６１】

一部の態様では、比較的小さい液滴の集団が使用され得る。特定の実施形態では、非限定的な例として、液滴の平均直径は、約１ｍｍ未満、約５００マイクロメートル未満、約３００マイクロメートル未満、約２００マイクロメートル未満、約１００マイクロメートル未満、約７５マイクロメートル未満、約５０マイクロメートル未満、約３０マイクロメートル未満、約２５マイクロメートル未満、約２０マイクロメートル未満、約１５マイクロメートル未満、約１０マイクロメートル未満、約５マイクロメートル未満、約３マイクロメートル未満、約２マイクロメートル未満、約１マイクロメートル未満、約５００ｎｍ未満、約３００ｎｍ未満、約１００ｎｍ未満または約５０ｎｍ未満であり得る。液滴の平均直径はまた、特定の場合には、少なくとも約３０ｎｍ、少なくとも約５０ｎｍ、少なくとも約１００ｎｍ、少なくとも約３００ｎｍ、少なくとも約５００ｎｍ、少なくとも約１

40

50

マイクロメートル、少なくとも約 2 マイクロメートル、少なくとも約 3 マイクロメートル、少なくとも約 5 マイクロメートル、少なくとも約 10 マイクロメートル、少なくとも約 15 マイクロメートルまたは少なくとも約 20 マイクロメートルであり得る。液滴の集団の「平均直径」は、液滴の直径の算術平均である。

【0062】

一部の実施形態では、これらの液滴は、特定の用途に応じて、実質的に同じ形状および/もしくはサイズ（即ち、「単分散」）のもの、または異なる形状および/もしくはサイズのものであり得る。一部の場合には、これらの液滴は、断面直径の均一な分布を有し得る、即ち、これらの液滴は、液滴の約 5 % 以下、約 2 % 以下または約 1 % 以下が、複数の液滴の全体的平均直径の約 90 % 未満（または約 95 % 未満または約 99 % 未満）の直径および/または約 110 % よりも大きい（または約 105 % よりも大きいまたは約 101 % よりも大きい）直径を有するような直径の分布を有し得る。液滴の断面直径の均一な分布を生じるためのいくつかの技術は、参照によって本明細書に組み込まれる、2004 年 10 月 28 日に WO 2004/091763 として公開された、Linkらによる表題「Formation and Control of Fluidic Species」の、2004 年 4 月 9 日出願の国際特許出願番号 PCT/US 2004/010903 に開示されている。

10

【0063】

当業者は、例えば、レーザー光散乱または他の公知の技術を使用して、液滴の集団の平均直径を決定することができる。そうして形成された液滴は、球状、または特定の場合には非球状であり得る。非球状液滴における液滴の直径は、非球状液滴と同じ容量を有する数学的に完全な球の直径と解釈され得る。

20

【0064】

一部の実施形態では、1 または複数の液滴は、液体によって取り囲まれた流体上に、液体内の個々の液滴へと流体を分離させ得る電荷を生じさせることによって、チャネル内で作製され得る。一部の実施形態では、電場を流体に適用して、液滴形成を引き起こすことができる。この流体は、液体内に、一連の個々の荷電した液滴および/または電氣的に誘導可能な液滴として存在し得る。電荷は、任意の適切な技術を使用して、例えば、電場（AC、DC などであり得る）内に流体を配置すること、および/または流体が電荷を有するようにする反応を引き起こすことによって、液体内の流体において生じさせることができる。

30

【0065】

電場は、一部の実施形態では、電場ジェネレーター、即ち、流体に適用され得る電場を生じさせることができるデバイスまたはシステムから生成される。この電場ジェネレーターは、AC 場（即ち、時間に対して周期的に変動するもの、例えば、正弦波、のこぎり波、矩形波など）、DC 場（即ち、時間に対して不変のもの）、パルス場などを生成し得る。適切な電場（AC、DC などであり得る）を生成するための技術は、当業者に公知である。例えば、一実施形態では、電場は、電場の少なくとも一部分がチャネルと相互作用するようにチャネルに接近して位置させることができる一対の電極間に電圧を適用することによって生成される。これらの電極は、銀、金、銅、炭素、白金、銅、タングステン、スズ、カドミウム、ニッケル、酸化インジウムスズ（「ITO」）などならびにそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の任意の適切な電極材料（単数または複数）から作られ得る。

40

【0066】

別のセットの実施形態では、流体の液滴は、流体を誘導して個々の液滴を形成させることができる様式で、チャネル寸法を変更することによって、チャネル内で液体によって取り囲まれた流体から作製され得る。このチャネルは、例えば、流体がチャネル壁に付着せず、その代わりに個々の液滴を形成するように、例えば、流れの方向に対して拡張するチャネル、または例えば、流体が個々の液滴へと合体するように仕向けられるように、流れの方向に対して狭まるチャネルであり得る。一部の場合には、チャネル寸法は、個々の液滴の形成を引き起こすような様式で、時間に対して（例えば、機械的にまたは電気機械的

50

に、空気圧で、など）変更され得る。例えば、このチャネルは、液滴形成を引き起こすために機械的に収縮（「圧搾」）され得、または流体流は、例えば、パッフルを動かすこと、刃を回転させることなどの使用を介して、液滴形成を引き起こすために機械的に破壊され得る。

【0067】

特定の実施形態は、一般に、1つの液滴を2以上の液滴へと分割するためのシステムおよび方法に関する。例えば、液滴は、適用された電場を使用して分割され得る。この液滴は、取り囲む液体よりも高い電気伝導率を有し得、一部の場合には、この液滴は、中性に荷電され得る。特定の実施形態では、適用された電場中で、電荷は、液滴の内部から表面へと移動して、その上に分布するように促され得、それによって、液滴の内部で受ける電場を相殺し得る。一部の実施形態では、液滴の表面上の電荷は、反対の極性を有する電荷を反対の方向に移動させる、適用された電場に起因した力もまた経験し得る。この電荷移動は、一部の場合には、小滴を2つの別々の液滴へと引き離し得る。

10

【0068】

本発明の一部の実施形態は、一般に、例えば、2以上の液滴が、通常、例えば、組成、表面張力、液滴サイズ、界面活性剤の存在または非存在などに起因して、融合または合体することができない場合の、2以上の液滴を1つの液滴に融合または合体させるためのシステムおよび方法に関する。特定の場合には、液滴のサイズに対する液滴の表面張力もまた、液滴の融合または合体が生じるのを防止し得る。

20

【0069】

非限定的な例として、2つの液滴には、液滴の融合または合体がそれらの反対の電荷に起因して生じ得るように、2つの液滴の電氣的相互作用を増加させ得る反対の電荷（即ち、同じ大きさである必要はない、正および負の電荷）が与えられ得る。例えば、電場が液滴に適用され得、これらの液滴はコンデンサーを通過し得、化学反応が液滴を荷電させ得る、など。これらの液滴は、一部の場合には、界面活性剤が液滴の表面張力を低下させるために適用される場合であっても、融合することができない可能性がある。しかし、液滴が反対の電荷（同じ大きさであってもよいが、同じ大きさである必要はない）で電氣的に荷電している場合、これらの液滴は、融合または合体できる可能性がある。別の例として、これらの液滴には、反対の電荷が必ずしも与えられない可能性があり（および、一部の場合には、いずれの電荷も与えられない可能性がある）、液滴を合体させる、液滴中で誘導された双極子の使用を介して融合され得る。また、合体される2以上の液滴は、「真正面から」ぶつかる必要は必ずしもない。液滴の少なくとも一部の融合が最初に生じる限り、どのような接触の角度でも十分である。例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2007年8月23日に米国特許出願公開第2007/0195127号として公開された、Ahnらによる表題「Fluidic Droplet Coalescence」の、2007年1月24日出願の米国特許出願第11/698,298号もまた参照のこと。

30

【0070】

1セットの実施形態では、流体は、液滴中に注入され得る。この流体は、一部の場合には、例えば、マイクロニードルまたは他のかかるデバイスを使用して、液滴中に微量注入され得る。他の場合には、この流体は、液滴が流体チャネルと接触するときに、その流体チャネルを使用して液滴中に直接注入され得る。流体注入の他の技術は、例えば、各々その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2010年12月29日にWO2010/151776として公開された、Weitzらによる表題「Fluid Injection」の、2010年6月25日出願の国際特許出願番号PCT/US2010/040006；または2010年7月15日にWO2010/080134として公開された、Weitzらによる表題「Particle-Assisted Nucleic Acid Sequencing」の、2009年12月18日出願の国際特許出願番号PCT/US2009/006649に開示されている。

40

【0071】

本発明の特定の実施形態に従う種々の材料および方法は、例えば、微小流体チャネルなどのチャネル、チャンバーなどの、本明細書に記載されるような物品または構成要素を形

50

成するために使用され得る。例えば、種々の物品または構成要素は、固体材料から形成され得、ここで、チャンネルは、微細加工、フィルム蒸着プロセス、例えば、スピンコーティングおよび化学的蒸着、レーザー製作、フォトリソグラフィー技術、湿式化学プロセスまたはプラズマプロセスを含むエッチング法などを介して形成され得る。例えば、Scientific American, 248:44-55, 1983 (Angell, et al)を参照のこと。

【0072】

1セットの実施形態では、本明細書に記載される物品の種々の構造または構成要素は、ポリマー、例えば、エラストマー性ポリマー、例えば、ポリジメチルシロキサン（「PDMS」）、ポリテトラフルオロエチレン（「PTFE」またはTeflon（登録商標））などで形成され得る。例えば、一実施形態によれば、微小流体チャンネルは、PDMSまたは他のソフトリソグラフィー技術を別々に使用して流体システムを製作することによって、実施され得る（この実施形態に適切なソフトリソグラフィー技術の詳細は、Annual Review of Material Science, 1998、第28巻、153～184頁で公開された、Younan Xia and George M. Whitesidesによる表題“Soft Lithography”ならびにAnnual Review of Biochemical Engineering, 2001、第3巻、335～373頁で公開された、George M. Whitesides, Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang and Donald E. Ingberによる表題“Soft Lithography in Biology and Biochemistry,”の参考文献において議論されている；これらの参考文献の各々は、参照によって本明細書に組み込まれる）。

10

【0073】

潜在的に適切なポリマーの他の例には、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリテトラフルオロエチレン、フッ素化ポリマー、シリコン、例えばポリジメチルシロキサン、ポリ塩化ビニリデン、ビス-ベンゾシクロブテン（「BCB」）、ポリイミド、ポリイミドのフッ素化誘導体などが含まれるがこれらに限定されない。上記のものを含むポリマー伴う組み合わせ、コポリマーまたはブレンドもまた、想定される。このデバイスは、複合材料、例えば、ポリマーおよび半導体材料の複合物からも形成され得る。

20

【0074】

一部の実施形態では、物品の種々の構造または構成要素は、ポリマー性および/または可撓性および/またはエラストマー性材料から製作され、硬化可能な流体から簡便に形成されて、成形（例えば、レプリカ成型、射出成型、鋳造成型など）を介した製作を促進し得る。この硬化可能な流体は、流体ネットワークにおけるおよび流体ネットワークとの使用のために企図された流体を含むおよび/または輸送することが可能な固体へと凝固するように誘導され得るまたは自発的に凝固する、本質的に任意の流体であり得る。一実施形態では、この硬化可能な流体は、ポリマー液体または液体ポリマー前駆体（即ち、「プレポリマー」）を含む。適切なポリマー液体には、例えば、それらの融点を上回って加熱された、熱可塑性ポリマー、熱硬化性ポリマー、ワックス、金属、またはそれらの混合物もしくは複合物が含まれ得る。別の例として、適切なポリマー液体には、適切な溶媒中の1または複数のポリマーの溶液が含まれ得、この溶液は、例えば蒸発による溶媒の除去の際に、固体ポリマー性材料を形成する。例えば、融解状態から、または溶媒蒸発によって凝固され得るかかるポリマー性材料は、当業者に周知である。その多くがエラストマー性である種々のポリマー性材料が適切であり、鋳型マスターの一方または両方がエラストマー性材料から構成される実施形態について、鋳型または鋳型マスターを形成するのにも適切である。かかるポリマーの例の非限定的なリストは、シリコンポリマー、エポキシポリマーおよびアクリレートポリマーの一般的なクラスのポリマーを含む。エポキシポリマーは、エポキシ基、1, 2-エポキシドまたはオキシランと一般に称される3員環式エーテル基の存在を特徴とする。例えば、芳香族アミン、トリアジンおよび脂環式骨格に基づく化合物に加えて、ビスフェノールAのジグリシジルエーテルが使用され得る。別の例には、周知のNovolacポリマーが含まれる。本発明に従う使用に適切なシリコンエラストマーの非限定的な例には、クロロシラン、例えば、メチルクロロシラン、エチルクロ

30

40

50

ロシラン、フェニルクロロシラン、ドデシルトリクロロシランなどを含む前駆体から形成されるものが含まれる。

【0075】

特定の実施形態では、シリコーンエラストマーポリジメチルシロキサンなどのシリコーンポリマーが使用される。PDMSポリマーの非限定的な例には、Dow Chemical Co.、Midland、MIによって商標Sylgardの下で販売されているもの、特に、Sylgard 182、Sylgard 184およびSylgard 186が含まれる。PDMSを含むシリコーンポリマーは、本発明の種々の構造の製作を単純化するいくつかの有益な特性を有する。例えば、かかる材料は、安価であり、容易に入手可能であり、熱によるキュアリングを介してプレポリマー液体から凝固され得る。例えば、PDMSは、例えば約1時間の曝露時間にわたる、約、例えば約65 ~ 75 の温度へのプレポリマー液体の曝露によって、典型的にはキュアリングさせることができる。また、PDMSなどのシリコーンポリマーは、エラストマー性であり得、従って、本発明の特定の実施形態において必要な比較的高いアスペクト比を有する非常に小さい特徴を形成するために有用であり得る。可撓性（例えば、エラストマー性）の鋳型またはマスターは、これに関して有利であり得る。

10

【0076】

PDMSなどのシリコーンポリマーから、微小流体構造またはチャネルなどの構造を形成することの1つの利点は、例えば、空気プラズマなどの酸素含有プラズマへの曝露によって酸化されて、その酸化された構造が、その表面において、他の酸化されたシリコーンポリマー表面と、または種々の他のポリマー性および非ポリマー性材料の酸化された表面と架橋することが可能な化学基を含むようになる、かかるポリマーの能力である。従って、構造は、製作され得、次いで酸化され得、別々の接着剤または他の密封手段を必要とすることなく、他のシリコーンポリマー表面に、または酸化されたシリコーンポリマー表面と反応性の他の基材の表面に、本質的に不可逆的に密封され得る。ほとんどの場合、密封は、密封を形成するために補助的な圧力を適用する必要なしに、酸化されたシリコーン表面を別の表面に接触させることによって、簡単に完了され得る。即ち、予め酸化されたシリコーン表面は、適切なあわせ面に対するコンタクト接着剤として作用する。具体的には、それ自体に対して不可逆的に密封可能であることに加えて、酸化されたシリコーン、例えば酸化されたPDMSは、PDMS表面と類似の様式で（例えば、酸素含有プラズマへの曝露を介して）酸化された、例えば、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素およびエポキシポリマーを含む、それ自体以外の広範な酸化された材料にも、不可逆的に密封され得る。本発明に関して有用な酸化および密封の方法、ならびに全体的成型技術は、例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、表題“Rapid Prototyping of Microfluidic Systems and Polydimethylsiloxane”、Anal. Chem.、70：474 ~ 480、1998（Duffy et al.）の論文で、当該分野で記載されている。

20

30

【0077】

従って、特定の実施形態では、物品の設計および/または製作は、例えば、比較的周知のソフトリソグラフィおよび本明細書に記載されるものなどの他の技術を使用することによって、比較的簡単であり得る。さらに、一部の実施形態では、物品の迅速なおよび/またはカスタマイズされた設計が、例えば、幾何学に関して可能である。1セットの実施形態では、この物品は、例えば、物品が、放射活性、毒性、有毒、反応性、バイオハザード性などである物質と共に使用される実施形態、および/または物質のプロファイル（例えば、毒物学プロファイル、放射活性プロファイルなど）が未知である実施形態では、使い捨てであるように生成され得る。酸化されたシリコーンポリマーからチャネルまたは他の構造（または内部の流体接触表面）を形成することの別の利点は、これらの表面が、典型的なエラストマー性ポリマーの表面よりもかなり高い親水性になり得ることである（親水性内部表面が所望される場合）。従って、かかる親水性チャネル表面は、典型的な未酸化のエラストマー性ポリマーまたは他の疎水性材料から構成された、構造ができるよりも

40

50

、より容易に満たされ湿らされ得る。

【0078】

以下の文書は、全ての目的のために、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる：国際特許出願公開WO 2004/091763、表題「Formation and Control of Fluidic Species」、Linkら；国際特許出願公開WO 2004/002627、表題「Method and Apparatus for Fluid Dispersion」、Stoneら；国際特許出願公開WO 2006/096571、表題「Method and Apparatus for Forming Multiple Emulsions」、Weitzら；国際特許出願公開WO 2005/021151、表題「Electronic Control of Fluidic Species」、Linkら；国際特許出願公開WO 2011/056546、表題「Droplet Creation Techniques」、Weitzら；国際特許出願公開WO 2010/033200、表題「Creation of Libraries of Droplets and Related Species」、Weitzら；米国特許出願公開第2012-0132288号、表題「Fluid Injection」、Weitzら；国際特許出願公開WO 2008/109176、表題「Assay And Other Reactions Involving Droplets」、Agrestiら；および国際特許出願公開WO 2010/151776、表題「Fluid Injection」、Weitzら。

10

【0079】

Bernsteinらによる、表題「Systems and Methods for Droplet Tagging」の、2014年4月17日出願の米国仮特許出願第61/981,123号もまた、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0080】

本発明のいくつかの実施形態が、本明細書で記載および説明されているが、当業者は、機能を果たすためおよび/または結果を得るための、種々の他の手段ならびに/あるいは構造ならびに/または本明細書に記載される1もしくは複数の利点を容易に想定し、かかるバリエーションおよび/または改変の各々は、本発明の範囲内であると判断される。より一般的には、当業者は、本明細書に記載される全てのパラメーター、寸法、材料および構成が、例示を意味すること、ならびに実際のパラメーター、寸法、材料および/または構成が、本発明の教示が使用される特定の用途（単数または複数）に応じること、を容易に理解する。当業者は、慣用的に過ぎない実験を使用して、本明細書に記載される発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を、認識するまたは確認できる。従って、上述の実施形態が、例として提示されているに過ぎないこと、ならびに添付の特許請求の範囲およびそれに対する均等物の範囲内で、具体的に記載および特許請求されたものとは別の方法で本発明が実施され得ることを、理解すべきである。本発明は、本明細書に記載される各個々の特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法に関する。さらに、2以上のかかる特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法の任意の組み合わせは、かかる特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法が相互に矛盾しない限り、本発明の範囲内に含まれる。

20

30

【0081】

本明細書で定義および使用される全ての定義は、辞書的定義、参照によって組み込まれる文書中の定義、および/または定義された用語の通常の意味を超えて支配すると理解すべきである。

40

【0082】

不定冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、本明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用する場合、明確に逆を示さない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解すべきである。

【0083】

語句「および/または」は、本明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用する場合、そのように結合された要素、即ち、ある場合には結合して存在するが、他の場合には分離して存在する要素の、「いずれかまたは両方」を意味すると理解すべきである。「および/または」を伴って列挙された複数の要素は、同じ様式で、即ち、そのように結合された要素の「1または複数」と解釈され得る。「および/または」節によって具体的

50

に指定された要素以外の他の要素が、具体的に指定された要素と関連しても関連しなくても、存在してもよい。従って、非限定的な例として、「Aおよび/またはB」への言及は、「含む (comprising)」などのオープンエンドの語と併せて使用される場合、一実施形態では、Aのみ (B以外の要素を含んでもよい) ; 別の実施形態では、Bのみ (A以外の要素を含んでもよい) ; なお別の実施形態では、AおよびBの両方 (他の要素を含んでもよい) ; などを指し得る。

【0084】

本明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用する場合、「または」は、上に定義したような「および/または」と同じ意味を有すると理解すべきである。例えば、リスト中の項目を分離する場合、「または」または「および/または」は、包括的である、即ち、いくつかの要素または要素のリストのうちの少なくとも1つを含むが、1つよりも多くもまた含み、列挙されていないさらなる項目もまた含んでもよいと解釈するものとする。明確にこれに反することを示す用語、例えば、「~のうちの1つだけ」もしくは「~のうちの正確に1つ」、または特許請求の範囲で使用する場合には「~からなる」だけが、いくつかの要素または要素のリストのうちの正確に1つの要素を含むことを指す。一般に、用語「または」は、本明細書で使用する場合、排他性の用語、例えば、「いずれか」、「~のうちの1つ」、「~のうちの1つだけ」または「~のうちの正確に1つ」が先行する場合にのみ、排他的選択肢 (即ち、「一方または他方であるが、両方ではない」を示すと解釈するものとする。「~から本質的になる」は、特許請求の範囲で使用する場合、特許法の分野において使用されるその通常の意味を有するものとする。

10

20

【0085】

本明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用する場合、語句「少なくとも1つ」とは、1または複数の要素のリストを参照して、要素のリスト中の要素のうちの任意の1または複数から選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解すべきであるが、要素のリスト内に具体的に列挙された各々および全ての要素のうちの少なくとも1つを必ずしも含まず、要素のリスト中の要素の任意の組み合わせを排除しない。この定義はまた、具体的に指定された要素と関連しても関連しなくても、語句「少なくとも1つ」が指す要素のリスト内の具体的に指定された要素以外の要素が適宜存在し得ることを許容する。従って、非限定的な例として、「AおよびBのうちの少なくとも1つ」 (または、同等に、「AまたはBのうちの少なくとも1つ」、または同等に、「Aおよび/またはBのうちの少なくとも1つ」) とは、一実施形態では、Bの存在を伴わない、1よりも多いAを含んでもよい、少なくとも1つのA (およびB以外の要素を含んでもよい) を指し得 ; 別の実施形態では、Aの存在を伴わない、1よりも多いBを含んでもよい少なくとも1つのB (およびA以外の要素を含んでもよい) を指し得 ; なお別の実施形態では、1よりも多いAを含んでもよい、少なくとも1つのA、および1よりも多いBを含んでもよい少なくとも1つのB (および他の要素を含んでもよい) を指し得る ; など。

30

【0086】

明確にこれに反することを示さない限り、1つよりも多いステップまたは行為を含む本明細書で特許請求された任意の方法において、この方法のステップまたは行為の順序は、この方法のステップまたは行為が列挙された順序に必ずしも限定されないこともまた、理解すべきである。

40

【0087】

特許請求の範囲ならびに上記本明細書において、全ての移行句、例えば、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「保有する (carrying)」、「有する (having)」、「含む (containing)」、「関与する (involving)」、「保持する (holding)」、「~から構成される (composed of)」などは、オープンエンド、即ち、~を含むがそれらに限定されないことを意味すると理解すべきである。移行句「~からなる」および「~から本質的になる」のみが、米国特許庁の審査基準のセクション2111.03に示されるように、それぞれ、クローズまたは半クローズの移行句とされる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/26338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C40B 20/00, 20/04, 40/06; C12P 19/34; G01N 35/02 (2015.01)

CPC - B01J 2219/00585, 2219/0059; C40B 40/06; C12Q 2521/501; G01N 2035/00752

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)
CPC: B01J 2219/00585, 2219/0059; C40B 40/06; C12Q 2521/501; G01N 2035/00752

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC: B01J 2219/00585, 2219/0059; C40B 40/06; C12Q 2521/501; G01N 2035/00752 (text search)
USPC: 506/2, 4, 16; 436/50; 435/91.52 (text search)

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

Electronic data bases: PatBase, Google Patents, Google Scholar

Search terms: microfluidic platform, droplet, nucleic acid tagging, single cell analysis, ligation, fusing or merging droplets, sequential barcode addition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0220494 A1 (SAMUELS et al.) 30 August 2012 (30.08.2012). Especially para [0006], [0014], [0015], [0243], [0302].	1-5, 45-48
A	WO 2013/134261 A1 (ROTEM et al.) 12 September 2013 (12.09.2013). Especially Pg 6 In 28-pg 7 In 4, pg 16 In 8-9, In 17 In 1-5	1-5, 45-48

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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 application or patent 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

3 August 2015 (03.08.2015)

Date of mailing of the international search report

08 SEP 2015

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-1774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/26338

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-44, 49-70, 76-79, 83-98, 102, 106-119
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—go to Extra Sheet for continuation—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-5, 45-48

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/26338

-----continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)-----

his application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-5, 45-48, drawn to a method comprising: exposing a droplet to a first condition and adding a first nucleic acid to the droplet, wherein the first nucleic acid encodes the first condition; exposing the droplet to a second condition and adding a second nucleic acid to the droplet, wherein the second nucleic acid encodes the second condition; and ligating the first nucleic acid and the second nucleic acid together.

Group II: Claims 71-75, drawn to an article comprising: a plurality of droplets, at least some of the droplets containing nucleic acids encoding a plurality of conditions that the at least some droplets were exposed to.

Group III: Claims 80-82, drawn to exposing a cell contained within a droplet to a first species, and adding a first nucleic acid to the droplet; exposing the cell to a second species, and adding a second nucleic acid to the droplet; ligating the first nucleic acid and the second nucleic acid together; determining a property of the cell; and sorting the droplet based on the property of the cell.

Group IV: Claims 99-101, drawn to an article, comprising: a library of droplets, containing a plurality of cell types and a plurality of nucleic acids, wherein substantially each of the cell types is encoded by a unique nucleic acid sequence.

Group V: Claims 103-105, 120 and 121, drawn to a method providing a plurality of cell types and a plurality of nucleic acids in a plurality of droplets such that substantially each droplet comprises one or more cells of only one cell type and an encoding nucleic acid encoding the only one cell type; exposing the plurality of droplets to a plurality of species such that substantially each droplet is exposed to a single species of the plurality of species, and adding a first nucleic acid encoding the single species thereto; lysing the cells within the droplets to release cellular nucleic acid from the cells; ligating the encoding nucleic acid, the first nucleic acid, and the cellular nucleic acid together; and sequencing the ligated nucleic acids.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Groups I, III and V are methods, not required by Groups II or IV.

Groups II and IV are articles (compositions), not required by Groups I, III or V.

Group I and III has the special technical feature of exposing an unlabeled droplet [i.e. no unique nucleic acid] to a first condition and adding a first nucleic acid to the droplet, where the first nucleic acid encodes a the first condition, then exposing the droplet to a second condition and adding a second nucleic acid to the droplet, wherein the second nucleic acid encodes the second condition, not required by Group V.

Groups III and V has the special technical feature of a droplet containing a cell(s), not required by Group I.

Group III has the special technical feature of determining a property of the cell, and sorting a droplet based on the property of the cell, not required by Groups I or V.

Group V has the special technical feature of a plurality of cell types and a plurality of nucleic acids in a plurality of droplets such that substantially each droplet comprises one or more cells of only one cell type and an encoding nucleic acid encoding the only one cell type, not required by Groups I or III.

Group V has the special technical feature of lysing the cells, and ligating the cellular nucleic acid to a specific species to which each droplet has been exposed and also ligating with the unique nucleic acid encoding the specific cell type, not required by Groups I or III.

Group V has the special technical feature of sequencing the ligated nucleic acid, not required by Groups I or III.

Group II has the special technical feature of a plurality of droplets, at least some of the droplets containing nucleic acids encoding a plurality of conditions that the at least some droplets were exposed to, not required by Group IV.

Group IV has the special technical feature of a library of droplets, containing a plurality of cell types and a plurality of nucleic acids, wherein substantially each of the cell types is encoded by a unique nucleic acid sequence, not required by Group II.

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/26338

---continued from previous sheet---

Common Technical Features:

1. Groups I-III, V share the common technical feature of a droplet(s) containing nucleic acids, each nucleic acid encoding each of a plurality of conditions that the at least some droplets were exposed to.
2. Groups III and V share the common technical feature of a plurality of droplets containing one or more cells.
3. Groups I, III and V share the common technical feature of ligating nucleic acids within droplets.
4. Groups I and III share the common technical feature of ligating nucleic acids indicative of exposure to two separate conditions.
5. Groups IV and V share the common technical feature of a plurality of cell types wherein substantially each of the cell types is isolated in a separate droplet and encoded by a unique nucleic acid sequence.

However, said common technical features do not represent a contribution over the prior art, and is obvious over WO 2013/134261 A1 to ROTEM et al. (hereinafter "Rotem").

Concerning common technical feature #1, Rotem teaches (pg 27 In 20-24; "To prepare a library of unique barcodes, the contents of a micro-titer well plate containing oligonucleotides (e.g., an oligonucleotide library) may be sequenced. In some cases, a randomized oligomer population can be encapsulated at no more than one in a drop and amplified inside each drop to create a homogenized oligomer drop catalog"; pg 31 In 15-25; "The droplets can be formed, refilled, thermo-cycled, merged, split, sorted, etc. [...] To analyze diverse populations, cells are encapsulated at about one per droplet and then each droplet is fused with another droplet containing billions of copies of a unique barcode used to tag the contents of the cell, e.g., contained within an adapter. After tagging each cell, the droplets are merged and downstream assays can be performed on the mix of barcoded cellular information before being sequenced"). An artisan of ordinary skill in the art would have recognized that the versatility of the droplet merging and barcoding, as taught by Rotem, would have enabled merged droplets encoding a plurality of exposure conditions.

Concerning common technical feature #2, Rotem teaches (pg 31 In 22-25; "To analyze diverse populations, cells are encapsulated at about one per droplet, and then each droplet is fused with another droplet containing billions of copies of a unique barcode used to tag the contents of the cell, e.g., contained within an adapter").

Concerning common technical feature #3, Rotem teaches (pg 4 In 29-30; "The DNA (still contained within the microfluidic droplets) is then barcoded or tagged using a ligation step with specific "adapters"").

Concerning common technical feature #4, Rotem teaches (pg 15 In 18; "adapters may be ligated directly to each other without any DNA in between"). An artisan of ordinary skill in the art would have recognized that the versatility of the droplet merging and barcoding, as taught by Rotem, would have enabled ligating barcoded adapters from merged droplets encoding a plurality of exposure conditions to keep a record of the circumstances of a particular droplet.

Concerning common technical feature #5, Rotem teaches (pg 27 In 1; "bar-coded" with identification sequences by their cell of origin"; pg 31 In 22-25; "To analyze diverse populations, cells are encapsulated at about one per droplet, and then each droplet is fused with another droplet containing billions of copies of a unique barcode used to tag the contents of the cell, e.g., contained within an adapter").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 6-44, 49-70, 76-79, 83-98, 102, 106-119 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71)出願人 516311515

ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレーション・ディノビー/エイ・マサチューセッツ・ジェネラル・ホスピタル

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION D/B/A MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL

アメリカ合衆国02199-8001マサチューセッツ州ボストン、フルート・ストリート55番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ブラッドリー・イー・バーンスタイン

アメリカ合衆国02138マサチューセッツ州ケンブリッジ、ラーチ・ロード146番

(72)発明者 ロバート・ニコル

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ピーオー・ボックス425083

(72)発明者 デイビッド・エイ・ウェイツ

アメリカ合衆国01740マサチューセッツ州ボルトン、グリーン・ロード213番

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR20 QR62 QS24 QS28

QS39 QS40 QX02