



등록특허 10-2671480



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월31일
(11) 등록번호 10-2671480
(24) 등록일자 2024년05월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)
C40B 50/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1065 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7012104
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월24일
심사청구일자 2021년09월24일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월24일
- (65) 공개번호 10-2020-0120602
- (43) 공개일자 2020년10월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/052497
- (87) 국제공개번호 WO 2019/060857
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
62/562,912 2017년09월25일 미국(US)
62/562,905 2017년09월25일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
US20150105553 A1
(뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 20 항

- (73) 특허권자
플렉시움 인코포레이티드
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 수트 500 스크랜턴 로드 9330
- (72) 발명자
맥코넬 앤드류 보이드
미국 캘리포니아주 샌디에이고 스위트 에이 4202 소렌토 벨리 불러바드 플렉시움 인코포레이티드 내
비자얀 칸다스와미
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 스위트 에이 4202 소렌토 벨리 불러바드 플렉시움 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

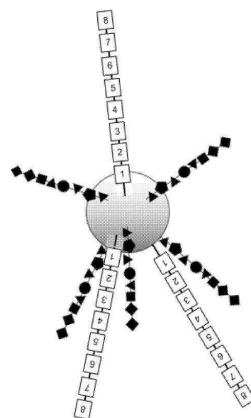
심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드 인코딩된 화학적 라이브러리

(57) 요약

본 출원은 공유 부착된 화학적 화합물 및 공유 부착된 DNA 바코드를 갖는 비드 및 이러한 비드를 사용하는 방법을 제공한다. 비드는 화학적 화합물의 다수의 실질적으로 동일한 카페 및 DNA 바코드의 다수의 실질적으로 동일한 카페를 갖는다. 화합물은 하나 이상의 화학적 단량체로 구성되고, 여기서 DNA 바코드는 바코드 모듈의 형태를 갖고, 여기서 각각의 모듈은 상응하는 화학적 단량체에 상응하고 이의 동정을 가능하게 한다. 핵산 바코드는 연접 구조 또는 직교 구조를 가질 수 있다. 비드-결합된 핵산 바코드의 시퀀싱, 화합물의 비드로부터의 절단 및 방출된 화합물의 생물학적 활성의 평가를 위한 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C40B 50/16 (2013.01)

C12Q 2563/179 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

로키키 조셉 프랭클린

미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 스위트 에이

4202 소렌토 밸리 불러바드 플렉시움 인코포레이터

드 내

반 응우옌 마이클

미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 스위트 에이

4202 소렌토 밸리 불러바드 플렉시움 인코포레이터

드 내

(56) 선행기술조사문헌

WO2017048975 A1

WO2014200767 A1

Lab on a Chip.vol. 16, no. 8,
1314-1331(2016.03.18)

Nature reviews Drug discovery. vol. 15, no. 3,
204-216(2015.12.16)

명세서

청구범위

청구항 1

세포를 섭동시키고(perturbing), 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는(capturing) 방법으로서,

(a) 피코웰(picowell)의 어레이 및 작용화된 섭동 비드의 라이브러리를 제공하는 단계로서, 상기 피코웰은 각각 적어도 하나의 세포 및 단일 작용화된 섭동 비드를 수용할 수 있고, 각각의 작용화된 섭동 비드는 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들의 카페, 상기 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들의 각 카페를 인코딩하는 복수의 뉴클레오타이드 바코드, 및 상기 뉴클레오타이드 바코드 각각에 연결된 RNA 포획체를 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 바코드는 상기 세포의 세포 내용물을 포획할 수 있는 작용화된 바코드이고, 상기 세포의 세포 내용물은 각각 각각의 작용화된 섭동 비드에 함유된 각각의 섭동에 대한 세포 반응을 포함하는, 상기 제공하는 단계;

(b) 적어도 하나의 세포를 상기 피코웰의 어레이의 각각의 피코웰에 포획하는 단계;

(c) 포획된 적어도 하나의 세포를 함유하는 각각의 피코웰에 각각의 뉴클레오타이드 바코드를 가진 단일 작용화된 섭동 비드를 포획하는 단계;

(d) 상기 작용화된 섭동 비드로부터 상기 화합물들의 부분을 방출시키고 상기 세포를 방출된 화합물들과 함께 배양(incubating)함으로써, 상기 세포의 각각에 각각의 섭동을 일으키는 단계;

(e) 상기 세포를 용해시켜, 상기 세포 내용물을 방출시키는 단계; 및

(f) 각각의 용해된 세포의 세포 내용물의 하나 이상의 성분을 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드에 포획하는 단계로서, 상기 포획은 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드를 상기 세포 내용물의 핵산 요소와 조합하는 혼성화 및 효소적 연장(enzymatic extension)을 포함함으로써, 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드와 상기 세포 내용물의 핵산 요소의 혼성체를 형성하는, 상기 포획하는 단계

를 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(g) 상기 혼성체를 방출하고, 상기 혼성체를 상기 작용화된 섭동 비드의 라이브러리로부터 수집하고, 상기 혼성체를 시퀀싱함으로써, 상기 섭동을 상기 각각의 섭동에 대한 상기 세포 반응에 관련시키는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 혼성체의 시퀀싱은 상기 세포 내용물의 상기 핵산 요소와 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드를 함께 시퀀싱하는 것을 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 시퀀싱은 상기 작용화된 섭동 비드에 부착된 상태에서 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드를 시퀀싱하는 것을 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내용물의 상기 핵산 요소는 mRNA를 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 뉴클레오타이드 바코드에 세포 반응을 카페하는 단계를

더 포함하되, 여기서 세포 반응을 카피하는 것은 세포 내용물의 핵산 요소를 각각의 뉴클레오티드 바코드와 조합하기 위한 혼성화 및 효소적 확장을 포함하는 것인, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들의 카피를 조합적으로 합성하는 (combinatorially synthesizing) 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 이후이면서 단계 (d) 전에, 상기 피코엘을 오일 매질로 덮는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작용화된 섭동 비드로부터 상기 화합물들의 부분을 방출시키기 전에, 포획된 세포 및 포획된 작용화된 섭동 비드를 하이드로겔에 포매(embedding)시키는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 용해 전에, 상기 작용화된 섭동 비드로부터 상기 뉴클레오티드 바코드를 방출하는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포를 방출된 화합물들과 함께 배양시킴과 동시에 또는 배양시킨 후, 상기 세포의 세포 표면에 상기 뉴클레오티드 바코드를 부착함으로써, 섭동되고 바코드 부착된 세포를 생성하는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 12

제11에 있어서, 상기 세포의 용해 전에, 상기 피코엘로부터 상기 섭동되고 바코드 부착된 세포를 방출하는 단계를 더 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 반응은 영상화 또는 계놈 분석을 이용해서 측정되는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 반응은 형태학적 반응(morphological response)으로서 시각으로 측정되는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 뉴클레오티드 바코드는 DNA 바코드인, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 섭동 비드는 각각 1천만개 내지 1억개의 실질적으로 동일한 DNA 바코드를 포함하는, 세포를 섭동시키고, 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법.

청구항 17

검정 배지(assay medium)로서,

(a) 용해된 세포; (b) 작용화된 섭동 비드로서, 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들의 카페, 상기 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들의 각 카페를 인코딩하는 복수의 뉴클레오타이드 바코드 및 상기 뉴클레오타이드 바코드에 연결된 RNA 포획체를 포함하는, 상기 작용화된 섭동 비드; 및 (c) 상기 용해된 세포로부터의 RNA를 포함하는, 검정 배지.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 복수의 뉴클레오타이드 바코드는 각각 상기 방출 가능한 화합물들의 동일성 또는 합성 이력을 인코딩하는, 검정 배지.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 RNA 포획체는 상기 뉴클레오타이드 바코드 중 하나에 연결되는, 검정 배지.

청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 복수의 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물들은 조합적으로 합성된 것인, 검정 배지.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 개시내용은 화합물의 라이브러리를 사용하는 대량신속처리 스크리닝(high-throughput screening)에 관한 것이고, 여기서 화합물은 비드에 결합되거나, 비드 내에 함유되고, 각각의 비드는 1종의 화합물의 다중 카페를 함유하고, 여기서 추가로, 비드는 또한 비드 내에 또는 상에 함유된 화합물의 동일성 또는 합성 이력을 인코딩하는 DNA 태그를 함유한다. 본 개시내용은 또한 피코웰(picowell)에서 수행되는 대량신속처리 검정에 관한 것이고, 여기서 피코웰은 화합물-함유된 비드 및 검정 물질을 함유한다. 본 개시내용은 추가로 비드-결합된 화합물을 방출하는 것 및 이들을 생물학적 활성에 대하여 스크리닝하는 것에 관한 것이다. 대체적으로, 본 개시내용은 비드가 화합물에 대한 전달-비히클로서 사용되는 검정, 및 이러한 화합물-함유된 비드를 생성하는 방법을 예상한다.

[0002]

본 개시내용은 각각의 화합물이 화학적 라이브러리에 속하는 하나 이상의 단량체로 제조된 비드-결합된 화합물에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 비드-결합된 DNA 바코드, 즉, 각각의 핵산의 서열이 하나의 특정한 화학적 라이브러리 단량체를 나타내는 코드(유전자 코드에 관한 것이 아님)인 핵산에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 비드-결합된 화합물을 방출한 다음, 방출된 화합물을 생물학적 활성에 대하여 스크리닝하는 것에 관한 것이다.

[0003]

본 개시내용은 또한 일반적으로 용량-제어된 화합물로 세포, 또는 약간의 세포를 섭동(perturbing)하고, RNA 및

/또는 단백질 분석에 의해 세포의 상태에서의 변화를 분석하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 방법은 대량신속처리 스크리닝, 표적 개발, 또는 진단, 및 다른 유사한 응용의 목적을 위하여 단일-세포 수준, 또는 복수의 세포에 적용될 수 있다.

[0004] 관련 사례에 대한 상호 참조

[0005] 본 출원은 2017년 9월 25일에 제출된 미국 가특허 출원 제62/562,905호, 및 2017년 9월 25일에 제출된 미국 가특허 출원 제62/562,912호의 이득 및 우선권을 청구하고, 이들의 내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

배경 기술

[0006] 예를 들면, 스플릿-앤파-풀(split-and-pool) 화학을 포함하는 조합 화학은 다량의 화합물을 합성하는데 사용될 수 있다. 이러한 방식으로 제조된 화합물은 화합물이 다양한 생화학적 활성에 대하여 스크리닝될 수 있는 의료 화학 분야에서 사용될 수 있다. 이러한 활성은 하나 이상의 단백질에 대한 결합을 포함하고, 여기서 단백질은 스크리닝 시험이 수행되는 시기에 공지된다. 대안적으로, 시험되는 화합물에 의해 결합되는 단백질은 결합 사건이 검출된 후에만 동정된다. 화합물은 또한 공지된 단백질을 억제하거나 활성화하는 이들의 활성에 대하여 스크리닝될 수 있다(이는 단순히 "결합" 활성에 대해서만 스크리닝되지 않는다). 대안적으로, 화합물은 세포 기능을 억제하거나 활성화하는 이들의 활성에 대하여 스크리닝될 수 있고, 여기서 분자 표적은 스크리닝의 시기에 연구자에게 공지되지 않는다.

[0007] 스플릿-앤파-풀 방법에 의해 제조된 화학물질의 거대한 라이브리리에 속한 화합물과 같은 화합물의 스크리닝은 수천 개의 마이크로웰, 나노웰, 또는 피코웰의 어레이로 스크리닝을 수행함으로써 촉진될 수 있다. 게다가, 스크리닝은 비드를 거쳐 각각의 피코웰에 상이한 화합물을 제공함으로써 촉진될 수 있고, 여기서 각각의 비드는 동일한 화합물의 수백 개의 카페를 함유하고, 여기서 동일한 비드는 또한 동일한 비드에 부착된 화합물을 동정하는데 사용될 수 있는 "DNA 바코드"의 수백 개의 카페를 함유한다. 게다가, 화합물의 스크리닝은 절단 가능한 링커를 사용하여 추가로 촉진되고, 여기서 절단 가능한 링커는 비드로부터 화합물의 제어된 방출을 허용하고, 그 다음, 여기서 방출된 화합물은 동일한 피코웰에서 생화학적 검정 또는 세포 기반의 검정을 위하여 사용된다.

[0008] 매우 작은, 국한된 부피(confined volume), 예를 들면, 소적, 피코웰 또는 미세유체 환경에서 화합물을 검정하는 것은, 예를 들면, 작은 부피의 검정 시약의 필요로 인하여, 따라서 조합적으로 생성된 화합물로 제한될 필요가 없기 때문에 대체적으로 유리하다. 화합물을 비드에 로딩할 수 있고, 따라서 나중에 비드로부터 화합물이 용리되도록 하는 임의의 방법은 비드-결합된 화합물을 작은, 국한된 부피의 검정으로 전달하기 위하여 사용될 수 있다. 혼산 바코드의 비드로의 첨가는 비드 내에 존재하는 화합물의 동일성이 검정 부피에 따라 담지되는 것을 허용한다. 이러한 방식으로, 매우 높은 처리량 검정은 마이크로타이터 플레이트에서 화합물의 로봇공학 또는 공간적 색인의 필요 없이 수행될 수 있다. 수백만 내지 수십억 개의 화합물은 하나의 작은 바이알에 보유될 수 있고, 화합물의 동일성은 각각의 개별적인 화합물을 함유하는 동일한 비드 상에 태깅된다.

[0009] 신약 개발을 위한 일반적인 방법은 흥미있는 표적을 선별하는 것 및 표적 단백질 또는 효소와 화학적 화합물의 큰 라이브리리의 상호작용을 모니터링하는 것을 포함한다. 많은 경우에, 다수의 초기 시도는 신체에 독성이거나 신체에서 다른 단백질과 교차 반응성이라는 것이 확인되고, 이는 표적 기반의 선택에 약물 스크리닝에 대하여 비효율적인 방법을 부여한다. 이는 잘 알려지고 이해되는 질환의 생물학적 기반을 필요로 하기 때문에 미리 선택된 표적에 대한 필요성은 또한 고유의 한계가 된다. 전체 유기체에 대한 화합물 스크리닝은 어렵고 비싸며 매우 낮은 처리량 과제이다.

[0010] 세포에 대한 통상적인 표현형 스크리닝은 질환-상태 세포의 모델을 생성하는 것, 세포를 다양한 약물 라이브리리와 접촉시키는 것, 및 질환 표현형이 측정 가능한 검정에 의해 보정되는지 여부를 모니터링하는 것을 포함하였다. 이러한 스크리닝 방법은 표현형 스크리닝으로 지칭되고, 이는 근본적인 생물학적 메커니즘이 시작시 반드시 꼭 이해되지 않지만, 치료 반응을 나타내는 측정 가능한 표현형 변화가 관련된 계량으로 고려되기 때문이다. 다양한 기준선 질환 세포 상태를 반영하는 많은 수의 세포주 및 질환 모델이 오늘날 이용 가능하다. 또한 다수의 화합물 라이브리리 및 생물학적 약물 후보가 이용 가능하다. 표현형 반응을 구하는 상이한 약물 후보와 상이한 세포 모델을 조합하는 명백한 스크리닝 캠페인은 검정이 마이크로타이터 플레이트 형식 및 영상 기법으로 제한되기 때문에 기술적 한계가 많고, 이를 둘 다는 처리량을 극심하게 제한한다.

[0011] 처리량 한계를 극복하는 하나의 방법은 대량신속처리 단일-세포 스크리닝 접근법을 신약 개발에 채택하는 것이다(예를 들면, 문헌[Heath et al., *Nat Rev Drug Discov.* 15:204-216, 2016] 참조). 이러한 접근법에서, 단일

세포는 개별적인 검정이 각각의 세포 상에서 수행될 수 있는 구획으로 분리 및 단리된다. 예를 들면, 소적 캡슐화를 사용하는 단일 세포의 mRNA 시퀀싱을 통한 계놈 분석은 양상을 측정에서 숨겨진 복잡한 세부사항을 드러내는 인기있는 방법이다(예를 들면, 문헌[Macosko et al., *Cell* 161:1202-1214, 2015 and Ziegenhain et al., *Mol Cell* 65:631-643, 2017] 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 현재 최신 기술의 단일-세포 분석 형식은 단일-세포 분해로 mRNA 전사체의 정량을 가능하게 하여 이들의 전사 상태를 기반으로 세포를 특성화하고 지문화하였다. 이러한 접근법은 대상체로부터 추출하거나 실험에서 제조한 조직 샘플 사이의 비교, 및 단일-세포 전사, 및 따라서, 단백질 발현 상태를 시험할 수 있게 한다. 전사체 시퀀싱 및 프로파일링에 의한 단일-세포 mRNA의 측정은 질환 진행 동안 세포의 가계 표현형뿐만 아니라 약물 효능, 저항성, 및 치료적 표적의 발견의 문자 메커니즘을 조사하는데 중요한 접근법이다(예를 들면, 문헌[Chu et al., *Cell Biol and Toxicol* 33:83-97, 2017, Wang, *Cell Biol Toxicol* 32:359-361, 2016, and Wang et al., *Cell Biol Toxicol* 33:423-427, 2017] 참조). 단일-세포 RNA 시퀀싱의 적용은 전사체 세포-대-세포 변이에 의해 증명된 세포간 이질성을 규정하는데 사용되었고, 이는 약물 효능 및 특이성, 전사 확률성, 전사체 가소성, 및 계놈 진화와 극도로 관련이 있다. 피코웰에서 캡슐화는 또한 증명되었다(예를 들면, 문헌[Gierahn et al., *Nat Methods* 14:395-398, 2017] 참조). 단일 세포 단백질 측정은 또한 유사한 단리 방법을 사용하여 가능하다(Butnik et al., *BioRxiv*, Jan. 2017, Su et al., *Proteomics* 17:3-4, 2017).

[0012] 플루이드(Fluidigm) C1, 10X 게노믹스(Genomics) 또는 1CellBio 시스템과 같은 자동화된 형식의 상업화된 버전을 포함하는 대량신속처리 단일-세포 RNA-시퀀싱(RNA-seq) 방법의 빠른 성장에도 불구하고, 표적 애그노스틱 대량신속처리 약물 스크리닝 및 표적 발견에 대한 단일-세포 RNA 프로파일링의 적용은 상이한 세포에 상이한 약물을 효율적으로 분할할 수 있는 방법의 부족에 의해 제한된다. 웰 플레이트에서 상이한 섭동하에 세포 또는 조직을 배양한 후, 단일-세포 분석 및 전사체 프로파일 사이의 비교를 수행할 수 있고, 시험될 수 있는 약물의 수는 플레이트 용량에 의해 제한된다. 추가로, 각각의 샘플로부터 바코딩(barcoding)된 mRNA를 개별적으로 제조한 다음, 모든 샘플에 대하여 포괄적인 RNA 프로파일을 수행할 필요성은 또한 주요 장애물을 생성한다.

발명의 내용

[0013] 간략하게 설명하면, 본 개시내용은, 하기를 포함하는, 화학적 화합물을 스크리닝하는 시스템을 제공한다: (a) 복수의 피코웰을 포함하는 피코웰 어레이 플레이트로서, 여기서 각각의 피코웰은 피코웰의 상부에서 개구를 규정하는 상부 애퍼처(aperture), 바닥에 의해 규정되는 하부를 갖고, 여기서 상부 애퍼처는 바닥으로부터 분리되고, 여기서 벽은 상부 애퍼처와 바닥 사이에 존재하는, 플레이트; (b) 피코웰에 배치된 비드로서, 여기서 비드는 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드, 및 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물을 포함하는, 비드, (c) 여기서 비드는 연접 DNA 바코드 또는 직교 DNA 바코드의 형태를 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 포함하고, 여기서 DNA 바코드가 연접 DNA 바코드의 형태를 갖는 경우, 연접 DNA 바코드는 (i) 클릭(click) 화학을 사용하거나, (ii) 단계의 반복 주기를 사용하는 방법에 의해 제조되고, 여기서 단계의 반복 주기는 부분적으로 제조된 비드-결합된 DNA 바코드에 혼성화될 수 있는 스플린트 올리고뉴클레오타이드(스플린트 올리고)를 사용하는 것을 포함하고, 여기서 혼성화는 스플린트 올리고 상의 어닐링 부위 및 부분적으로 제조된 비드-결합된 DNA 바코드에서 상응하는 상보적 어닐링 분위에 의해 매개되고, 여기서 어닐링된 스플린트 올리고는 DNA 중합효소를 사용하는 부분적으로 제조된 DNA 바코드를 연장하기 위한 주형으로서 사용되고, 여기서 스플린트 올리고는 부분적으로 제조된 DNA 바코드에 중합되는 DNA 바코드 모듈에 상보적인 염기를 함유하고, (d) 여기서 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물 중 각각의 하나는 하나 이상의 화학적 라이브러리 단량체를 포함하고, 여기서 각각의 비드-결합된 DNA 바코드 모듈은 상응하는 화학적 라이브러리 단량체를 동정하고, 여기서 용어 "화합물"은 하나 이상의 화학적 라이브러리 멤버를 포함하는 완성된 생성물을 지칭하는데 사용되고, 여기서 완성된 DNA 바코드는 화합물을 동정한다.

[0014] 마이크로웰, 나노웰, 또는 피코웰의 파닥은 평평할 필요가 없다. 바닥은 유리 시험관 또는 금속 원심분리기 판의 하부의 방식과 같이 곡선일 수 있다. 또한, 바닥은 원뿔형 원심분리기 판과 같이 원뿔형일 수 있다. 바닥은 평평하지만 노치, 예를 들면, 피코웰에 있는 임의의 비드의 하부 부근에 검정 용액 또는 세포 배양 용액의 이동을 촉진하는 노치가 있을 수 있다. 평평한-바닥 실시형태에 있어서, 본 시스템 및 방법은 평평한 바닥을 필요로 할 수 있다.

[0015] 연접 DNA 바코드는 전적으로 유기 화학의 방법, 예를 들면, 클릭 화학으로 제조될 수 있다. 또한, 직교 DNA 바코드는 전적으로, 예를 들면, 클릭 화학을 포함하는 유기 화학의 방법으로 제조될 수 있다.

[0016] 또한 제공되는 것은 복수의 캡을 더 포함하고, 각각의 캡이 상이한 피코웰의 개구에 끼워맞출될 수 있고, 각각

의 캡이 피코웰의 내부에서 유체의 증발을 최소화하거나 방지할 수 있고, 각각이 피코웰의 내부에서 유체의 누출을 최소화하거나 방지할 수 있는, 상기 시스템이다.

[0017] 게다가, 포함되는 것은 연접 DNA 바코드가 (i) 클릭 화학 및 스플린트 올리고를 사용하는 단계의 반복 주기 둘다; (ii) 클릭 화학 및 클릭 화학 방법이 아닌 화학적 방법 둘 다; (iii) 오직 클릭 화학만; 또는 (iv) 오직 스플린트 올리고를 사용하는 단계의 반복 주기만을 사용하는 방법에 의해 제조되는, 상기 시스템이다. 이러한 특정한 실시형태에 있어서, 문제의 "연접 DNA 바코드"는 핵산을 비드에 직접적으로 커플링시키는데 사용되는 임의의 화학적 커플러를 포함하지 않는다.

[0018] 구형 캡(spherical cap) 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 복수의 구형 캡을 더 포함하고, 여기서 각각의 캡이 피코웰의 애퍼처에 끼워맞춤될 수 있고, 여기서 애퍼처가 원형이고, 각각의 캡이 피코웰 내부에서 유체의 증발을 최소화하거나 방지할 수 있고, 각각의 캡이 피코웰 내부에서 유체의 누출을 최소화하거나 방지할 수 있는, 상기 시스템이다.

[0019] 반응 요소 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 피코웰에 배치된 적어도 하나의 비드가 상기 적어도 하나의 비드에 커플링되는 적어도 하나의 반응 포획 요소(response capture element)를 포함하는, 상기 시스템이다. 또한, 예상되는 것은 적어도 하나의 피코웰에 배치된 적어도 하나의 비드가 상기 적어도 하나의 비드에 커플링되는 적어도 하나의 반응 포획 요소를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 반응 포획 요소가 (a) 폴리(dT) 또는 (b) 액순-표적화 RNA 프로브를 포함하는, 상기 시스템이다.

[0020] 또한 예상되는 것은 DNA 바코드가 연접 DNA 바코드 또는 직교 DNA 바코드이고, 여기서 DNA 바코드가 하나 이상의 DNA 바코드 모듈을 포함하고, 여기서 각각의 하나 이상의 DNA 바코드 모듈이 화학적 라이브러리 단량체를 동정하는 정보를 인코딩하고, 여기서 연접 DNA 바코드 또는 직교 DNA 바코드가 (a) 하나 이상의 기능성 핵산; 및 (b) 화학적 라이브러리 단량체의 동일성이 아닌 유형의 정보를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 중 하나 또는 둘다를 더 포함하는, 상기 시스템이다.

[0021] 하기는 DNA 바코드를 구성하는 비드-결합된 DNA 바코드 모듈의 수에 적용되는 바와 같이, "그것만으로 구성된" 실시형태 및 "포함하는" 실시형태를 개시한다. 제공되는 것은 DNA 바코드가 오직 1개의 DNA 바코드 모듈, 또는 오직 2개의 DNA 바코드 모듈만으로 구성되거나, 오직 3개의 DNA 바코드 모듈, 또는 오직 4개의 DNA 바코드 모듈 등을 함유하는 실시형태, 또는 DNA 바코드가 적어도 1개의 DNA 바코드 모듈을 포함하거나, 적어도 2개의 DNA 바코드 모듈을 포함하거나, 적어도 3개의 DNA 바코드 모듈을 포함하거나, 적어도 4개의 DNA 바코드 모듈 등을 포함하는 실시형태이다.

[0022] 또한 포함되는 것은 비드-결합된 연접 DNA 바코드가 (i) 제1 DNA 바코드 모듈; 또는 (i) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 및 제2 DNA 바코드 모듈; 또는 (ii) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 및 제3 DNA 바코드 모듈; 또는 (iii) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 제3 DNA 바코드 모듈, 제3 어닐링 부위, 및 제4 DNA 바코드 모듈; 또는 (iv) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 제3 DNA 바코드 모듈, 제3 어닐링 부위, 제4 DNA 바코드 모듈, 제4 어닐링 부위, 및 제5 DNA 바코드 모듈; 또는 (v) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 제3 DNA 바코드 모듈, 제3 어닐링 부위, 제4 DNA 바코드 모듈, 제4 어닐링 부위, 제5 DNA 바코드 모듈, 제5 어닐링 부위, 및 제6 DNA 바코드 모듈을 포함하는, 시스템이다.

[0023] 게다가, 예상되는 것은 DNA 시퀀싱 프라이머를 결합시킬 수 있는 프라이머 결합 부위를 더 포함하고, 상기 프라이머 결합 부위가 제1 DNA 바코드 모듈, 제2 DNA 바코드 모듈, 제3 DNA 바코드 모듈, 제4 DNA 바코드 모듈, 제5 DNA 바코드 모듈, 또는 제6 DNA 바코드 모듈 중 하나 이상의 시퀀싱을 안내할 수 있고, 프라이머 결합 부위가 제1 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머, 제2 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머, 제3 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머, 제4 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머, 제5 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머, 또는 제6 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라이머에 위치하거나, 프라이머 결합 부위가 제1과 제2 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제2와 제3 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제3과 제4 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제4와 제5 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제5와 제6 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하는, 상기 시스템이다.

[0024] 추가로, 제공되는 것은 프라이머 결합 부위가 제1과 제2 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제2와 제3 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제3과 제4 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제4와 제5 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하거나, 제5와 제6 DNA 바코드 모듈 사이에 위치하는, 상기 시스템이다. 프라이머 결합 부위의 위치에

관한 실시형태에 있어서, 업스트림 DNA 바코드 모듈에 관하여, 그리고 다운스트림 DNA 바코드 모듈에 관하여, 제공되는 것은 프라이머 결합 부위가 연속적인 DNA 바코드 모듈의 각각 및 모든 쌍 사이에 위치하는, 상기 시스템이다.

[0025] 추가로, 제공되는 것은 비드가 **직교 DNA 바코드**인 DNA 바코드를 포함하고, 비드가 외부 표면을 포함하고, 직교 DNA 바코드가 (a) 제1 DNA 바코드 모듈 및 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위를 포함하는 제1 핵산으로서, 여기서 제1 핵산은 제1 위치에서 비드에 커플링되는, 핵산, (b) 제2 DNA 바코드 모듈 및 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위를 포함하는 제2 핵산으로서, 여기서 제2 핵산은 제2 위치에서 비드에 커플링되는, 핵산, 및 (c) 제3 DNA 바코드 모듈 및 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위를 포함하는 제3 핵산으로서, 여기서 제2 핵산은 제3 위치에서 비드에 커플링되는, 핵산을 포함하고, 여기서 비드 상의 제1, 제2, 및 제3 위치는 비드의 외부 표면 상의 상이한 위치에 각각 위치하는, 상기 시스템이다.

[0026] 인코딩 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 DNA 바코드가 임의의 화학적 라이브러리 단량체를 동정하지 않지만, 대신에 (a) 비드에 절단 가능하게 부착되는 화학적 화합물의 부류; (b) 유기 합성의 다단계 경로에서 단계 번호; (c) 비드-결합된 화합물이 합성된 날짜; (d) 비드-결합된 화합물이 치료하는 것이 의도되는 질환; (e) 비드-결합된 화합물이 자극하거나 억제하는 것이 의도되는 세포성 사건; 또는 (f) 주어진 화학적 라이브러리 단량체를 비드에 커플링하는데 사용된 반응 조건을 동정하는 하나 이상의 핵산을 포함하는, 상기 시스템이다.

[0027] 링커 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 각각의 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물이 절단 가능한 링커를 거쳐 비드에 커플링되는, 상기 시스템이다. 또한 각각의 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물이 광-절단 가능한 링커를 거쳐 비드에 커플링되는, 상기 시스템이 제공된다. 또한 각각의 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물이 비-절단 가능한 링커를 거쳐 비드에 커플링되는, 상기 시스템이 제공된다.

[0028] 텐타겔(TentaGel)® 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 비드가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 그 위에 그래프팅된 저 가교결합 폴리스타이レン 매트릭스로 구성되는 그래프팅된 공중합체를 포함하는, 상기 시스템이다.

[0029] 방출-모니터(release-monitor) 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 적어도 하나의 피코웰이 방출-모니터 비드를 함유하고 임의의 다른 유형의 비드를 함유하지 않고, 방출-모니터 비드가 비드-결합된 소광제 및 비드-결합된 형광단을 포함하고, 비드-결합된 소광제가 비드-결합된 형광단의 바로 부근에 소광적으로 위치하고 비드-결합된 형광단의 형광의 적어도 50%(또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%, 또는 적어도 99.9%)를 소광할 수 있고, 비드-결합된 형광단이 제1 광-절단 가능한 링커를 거쳐 결합되고, 방출-모니터 비드를 함유하는 피코웰이 제1 피코웰이고, 여기서 **제1 피코웰이 제1 용액을 함유하고, 제1 피코웰을 절단 조건에 노출시키는 것은 광-절단 가능한 링커를 절단하고 제1 피코웰의 제1 용액으로 방출할 수 있고, 노출은 제1 피코웰에서 제1 용액 전체에서 형광단의 확산을 야기하고, 확산된 형광단을 포함하는 제1 용액을 함유하는 제1 피코웰 상에 광을 비출으로써 획득한 형광성 신호는 사용자가 형광성 신호를 사용하여 방출-모니터 비드로부터의 비드-결합된 형광단의 페센트 방출을 계산하는 것을 가능하게 하며, 이는 계산된 페센트 방출에 대한 값을 야기하고, 제2 피코웰이 제1 광-절단 가능한 링커와 동일한 유형의 광-절단 가능한 링커와 커플링된 비드-결합된 화합물을 함유하고, 제2 피코웰이 제2 용액을 함유하고, 제1 피코웰에서 방출-모니터 비드로부터의 계산된 페센트 방출에 대한 값이 제2 피코웰의 제2 용액 중의 방출된 화합물의 농도의 계산을 가능하게 하는, 상기 시스템을 제공한다.**

[0030] 주어진 비드에 결합된 모든 화합물의 동일성에 관한 실시형태 또는 주어진 비드에 결합된 모든 DNA 바코드의 동일성에 관한 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 비드가 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드를 포함하고, 복수가 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드의 1천만 내지 1억개 카페인, 상기 시스템이다. 또한 적어도 하나의 비드가 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물을 포함하고, 복수가 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물의 1천만 내지 1억개 카페인 상기 시스템이 제공된다.

[0031] 세포(예를 들면, 포유동물 세포, 암 세포, 박테리아 세포)에 관한 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 피코웰이 적어도 하나의 세포를 포함하고, 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물이 절단 가능한 링커를 거쳐 적어도 하나의 비드에 결합되고, 절단 가능한 링커의 절단이 비드-결합된 화합물을 비드로부터 방출시켜 방출된 화합물을 생성하고, 여기서 방출된 화합물이 적어도 하나의 세포와 접촉할 수 있는, 상기 시스템이다. 다른 세포 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 피코웰이 적어도 하나의 세포를 포함하고, 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물이 절단 가능한 링커를 거쳐 적어도 하나의 비드에 결합되고, 절단 가능한 링커의 절단이 비드-결합된 화합물을 비드로부터 방출시켜 방출된 화합물을 생성하고, 방출된 화합물

이 적어도 하나의 세포와 접촉할 수 있고, 적어도 하나의 세포가 (i) 암 세포가 아닌 포유동물 세포, (ii) 포유동물 암 세포, (iii) 죽은 포유동물 세포, (iv) 아폽토시스 포유동물 세포, (v) 괴사 포유동물 세포, (vi) 박테리아 세포, (vii) 말라리아 원충 세포, (viii) 대사적으로 활성이지만 가교결합된 게놈을 갖고 세포 분열을 겪을 수 없는 세포, 또는 (ix) 바이러스에 감염된 포유동물 세포인, 상기 시스템이다.

[0032] 장치 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 각각의 피코웰이 피코웰의 상부에서 개구를 규정하는 상부 애퍼처, 바닥에 의해 규정되는 하부를 갖고, 상부 애퍼처가 바닥으로부터 분리되고, 벽이 상부 애퍼처와 바닥 사이에 존재하고, 애퍼처가 등근형이고, 바닥이 등근형이고, 벽이 원뿔대의 형태를 갖고, 애퍼처가 제1 직경을 갖고, 바닥이 제2 직경을 갖고, 제1 직경이 제2 직경보다 큰, 상기 시스템이다.

[0033] 다른 장치 관련된 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 각각의 피코웰이 피코웰의 상부에서 개구를 규정하는 상부 애퍼처, 바닥에 의해 규정되는 하부를 갖고, 상부 애퍼처가 바닥으로부터 분리되고, 벽이 상부 애퍼처와 바닥 사이에 존재하고, 애퍼처가 등근형이고, 바닥이 등근형이고, 벽이 원뿔대의 형태를 갖고, 애퍼처가 제1 직경을 갖고, 바닥이 제2 직경을 갖고, 제1 직경이 제2 직경보다 크고, 애퍼처에 꼭 맞는 캡을 더 포함하고, 애퍼처가 더 큰 듀로미터(더 경성임)를 갖는 중합체로 구성되고, 캡이 더 작은 듀로미터(더 연성임)를 갖는 중합체로 구성되고, 캡 및 애퍼처의 상대적인 듀로미터가 애퍼처에 가역적으로 꼭 맞는 캡을 가능하게 하고, 캡이 (i) 피코웰을 막고 누출을 방지하는 것만이 의도된 캡, (ii) 수동형 캡이고, 세포 배지 중의 세포가 피코웰에서 배양되는 상황에서, 세포에 의해 방출되는 대사물질을 흡수할 수 있는 캡, (iii) 능동형 캡이고, 복수의 본질적으로 동일한 화합물을 포함하는 비드의 형태를 갖는 캡으로서, 각각의 복수의 본질적으로 동일한 화합물이 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되는, 캡; (iv) 능동형 캡이고, 복수의 동일한 시약을 포함하는 비드의 형태를 갖는 캡으로서, 각각의 복수의 본질적으로 동일한 시약이 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되는, 캡이다. 또한 캡이 구형이거나 캡이 비-구형인, 상기 시스템이 제공된다.

[0034] 매트 실시형태에 있어서, 상기 시스템은 일반적으로 평면인 위 표면, 각각의 피코웰이 피코웰의 상부에서 개구를 규정하는 상부 애퍼처를 갖는 복수의 피코웰, 바닥에 의해 규정되는 하부를 포함하는 피코웰 어레이 플레이트를 포함하고, 여기서 상부 애퍼처는 벽에 의해 바닥으로부터 분리되고, 여기서 벽은 상부 애퍼처와 바닥 사이에 존재하고, 선택적으로, 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드를 포함하는, 상기 복수의 피코웰 중 적어도 하나에 배치된 비드, 및 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물을 포함하고, 여기서 피코웰 어레이 플레이트는 적어도 하나의 또는 모든 복수의 피코웰의 상부에서 개구를 안전하게 덮을 수 있거나, 적어도 하나의 또는 모든 복수의 피코웰의 상부에서 개구를 능동적으로 안전하게 덮을 수 있는 매트를 더 포함하고, 여기서 안전하게 덮는 것은 가역적이고, 여기서 매트는 (a) 피코웰 어레이 플레이트의 일반적으로 평면인 위 표면과 접촉하여 위치하는 경우, 복수의 피코웰 중 하나 이상으로 구성될 수 있는 임의의 대사물질, 생화학물질, 또는 단백질을 흡수할 수 있는 흡수성 표면, (b) 피코웰 어레이 플레이트의 일반적으로 평면인 위 표면에 가역적인 접착을 유지할 수 있는 접착성 표면 중 하나 또는 모두를 선택적으로 포함한다.

[0035] 생화학적 검정 실시형태에 있어서, 포함되는 것은 적어도 하나의 피코웰을 포함하고, 적어도 하나의 피코웰이 복수의 실질적으로 동일한 화합물 및 복수의 실질적으로 동일한 바코드를 포함하는 비드를 포함하고, 적어도 하나의 피코웰이 세레브론 E3 유비퀴틴 리가아제, 세레브론 E3 유비퀴틴 리가아제의 기질, 예를 들면, **이카로스**(Ikaros) 또는 **아이올로스**(Aiolos)를 포함하는 검정 배지(assay medium)를 포함하고, 시스템이 세레브론의 E3 유비퀴틴 리가아제 활성을 활성화시키는 화합물에 대하여 스크리닝할 수 있고, 따라서 **이카로스** 또는 **아이올로스**의 세포내 농도를 감소시킬 수 있는, 상기 시스템이다.

[0036] 또 다른 생화학적 검정 실시형태에 있어서, 예상되는 것은 적어도 하나의 피코웰을 포함하고, 적어도 하나의 피코웰이 복수의 실질적으로 동일한 화합물 및 복수의 실질적으로 동일한 바코드를 포함하는 비드를 포함하고, 적어도 하나의 피코웰이 MDM2 E3 유비퀴틴 리가아제, MDM2 E3 유비퀴틴 리가아제의 기질, 예를 들면, **p53**을 포함하는 검정 배지를 포함하고, 시스템이 MDM2의 E3 유비퀴틴 리가아제 활성을 활성화시키는 화합물에 대하여 스크리닝할 수 있고, 따라서 **p53**의 세포내 농도를 증가시킬 수 있는, 상기 시스템이다.

[0037] 추가의 바코딩 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 DNA 바코드가 임의의 화학적 단량체를 인코딩하지 않지만, 대신에 (a) 비드에 절단 가능하게 부착되는 화학적 화합물의 부류; (b) 유기 합성의 다단계 경로에서 단계 번호로서, 여기서 비드-결합된 핵산은 비드-결합된 화합물을 제조하는데 사용되는 주어진 화학적 단량체에 상응하고, 여기서 주어진 화학적 단량체에 상응하는 비드-결합된 핵산은 화학적 단량체를 동정하는, 단계 번호; (c) 비드-결합된 화합물이 합성된 날짜; (d) 비드-결합된 화합물이 치료하는 것이 의도되는 질환; (e) 비드-결합된 화합물이 자극하거나 억제하는 것이 의도되는 세포성 사건 중 하나 이상을 동정하는 하나 이상의 핵산을 포함하는,

상기 시스템이다.

[0038] 임의의 헤드피스가 없는 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 적어도 하나의 비드가 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물을 포함하고, 또한 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드를 포함하고, 임의의 비드-결합된 화합물을 임의의 비드-결합된 DNA 바코드에 연결하는 임의의 헤드피스가 존재하지 않는, 상기 시스템이다.

[0039] 게다가, 예상되는 것은 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드의 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%가 동일한 구조를 갖는, 상기 시스템이다. 추가로, 예상되는 것은 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물의 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%가 동일한 구조를 갖는, 상기 시스템이다.

[0040] 추가로, 공급되는 것은 연접 DNA 바코드가 DNA 바코드 모듈인 적어도 하나의 핵산을 포함하는 상기 시스템, 또는 연접 DNA 바코드가 DNA 바코드 모듈인 오직 하나의 핵산을 포함하는 상기 시스템이다.

[0041] 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 **연접 DNA 바코드**가 DNA 바코드 모듈인 적어도 하나의 핵산, 및 (a) 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위로서 사용될 수 있거나, (b) 헤어핀 구조를 형성할 수 있고, 헤어핀 구조는 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위, 및 헤어핀 구조에서 벤드를 포함하고, 벤드가 시퀀싱 프라이머에 대하여 5-프라임이고 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위에 대하여 3-프라임이거나, (c) 스페이서 핵산인 적어도 하나의 기능성 핵산을 포함하는, 상기 시스템이다.

[0042] 다른 시퀀싱 프라이머 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 여기서 **직교 DNA 바코드**가 복수의 DNA 바코드 모듈을 함유하고, 각각의 DNA 바코드 모듈이 직접적으로 또는 링커를 통해 비드 상의 상이한 부위에 커플링되고, 각각의 복수의 DNA 바코드 모듈이 (a) 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위로서 사용될 수 있거나, (a) 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위로서 사용될 수 있거나, (b) 헤어핀 구조를 형성할 수 있고, 헤어핀 구조가 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위, 및 헤어핀 구조에서 벤드를 포함하고, 벤드가 시퀀싱 프라이머에 대하여 5-프라임이고 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위에 대하여 3-프라임이거나, (c) 스페이서 핵산인 적어도 하나의 기능성 핵산을 함유하는, 상기 시스템이다.

[0043] 스플린트 올리고에 대한 기능적 언어를 기재하는 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 **연접 DNA 바코드**를 포함하는 비드이고, 연접 DNA 바코드가 (a) 제1 DNA 바코드 모듈 및 제1 스플린트 올리고뉴클레오타이드(스플린트 올리고)를 위한 제1 어닐링 부위로서, 여기서 스플린트 올리고는 3개의 핵산을 포함하고, 여기서 3개의 핵산은 제1 어닐링 부위에 혼성화 보체인 핵산, 제2 DNA 바코드 모듈에 혼성화 보체인 핵산, 및 제2 어닐링 부위인 핵산인 것, 및 (b) 제2 DNA 바코드 모듈 및 제2 스플린트 올리고를 위한 제2 어닐링 부위로서, 여기서 제2 스플린트 올리고는 3개의 핵산을 포함하고, 여기서 3개의 핵산은 제2 어닐링 부위에 혼성화 보체인 핵산, 제3 DNA 바코드 모듈인 핵산, 제3 어닐링 부위인 핵산인 것을 포함한다.

[0044] 스플린트 올리고에 관한 기능적 언어를 함유하는 또 다른 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 제3 DNA 바코드 모듈 및 제3 스플린트 올리고를 위한 제3 어닐링 부위를 더 포함하고, 제3 스플린트 올리고가 3개의 핵산을 포함하고, 3개의 핵산이 제3 어닐링 부위에 혼성화 보체인 핵산, 제4 DNA 바코드 모듈인 핵산, 및 제4 어닐링 부위인 핵산인, 상기 비드이다.

[0045] 게다가, 스플린트 올리고에 관한 기능적 언어를 함유하는 또 다른 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 (i) 제4 DNA 바코드 모듈 및 제4 스플린트 올리고를 위한 제4 어닐링 부위로서, 여기서 제4 스플린트 올리고는 3개의 핵산을 포함하고, 여기서 3개의 핵산은 제4 어닐링 부위에 혼성화 보체인 핵산, 제5 DNA 바코드 모듈인 핵산, 및 제5 어닐링 부위인 핵산인 것, (ii) 반응 포획 요소, (iii) 방출 모니터 중 하나 이상을 더 포함하는, 상기 비드이다.

[0046] 링커 실시형태에 있어서, 포함되는 것은 연접 DNA 바코드가 비드에 커플링되지만, (i) 임의의 광 절단 가능한 링커를 거쳐 비드에 커플링되지 않거나, (ii) 임의의 효소적으로 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되지 않거나; (iii) 임의의 종류의 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되지 않는, 상기 비드이다.

[0047] 별개의 커플링 위치에 관한 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 연접 DNA 바코드가 비드 상의 제1 위치에 커플링되고, 비드가 또한 비드 상의 제2 위치에 커플링되는 화합물을 포함하고, 제1 위치가 제2 위치와 동일하지 않은, 상기 비드이다.

[0048] 표면 실시형태(내부 및 외부 표면)에 있어서, 제공되는 것은 비드가 외부 표면 및 내부 표면을 포함하고, 비드

가 비드에 커플링된 적어도 10,000개의 실질적으로 동일한 연접 DNA 바코드를 포함하고, 적어도 10,000개의 실질적으로 동일한 연접 DNA 바코드의 적어도 90%가 외부 표면에 커플링되는, 상기 비드이다.

[0049] 본 개시내용을 다른 실시형태와 구별할 수 있는 배제 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 이것이 임의의 폴리아크릴아마이드를 포함하지 않고, 연접 DNA 바코드가 (i) 프로모터인 임의의 핵산을 포함하지 않거나; (ii) 폴리A인 임의의 핵산을 포함하지 않거나; (iii) 프로모터인 임의의 핵산을 포함하지 않고 폴리A인 임의의 핵산을 포함하지 않는, 상기 비드이다.

[0050] 방출-모니터 비드 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 수성 매질 중에 기능할 수 있는 방출-모니터 비드를 공급하고, 여기서 방출-모니터 비드는 비드-결합된 소광제 및 비드-결합된 형광단을 포함하고, 여기서 비드-결합된 소광제는 비드-결합된 형광단 바로 부근에 소광적으로 위치하고, 비드-결합된 형광단의 형광의 적어도 50%를 소광할 수 있고, 여기서 비드-결합된 형광단은 제1 광-절단 가능한 링커를 거쳐 결합되고, 여기서 방출-모니터 비드를 함유하는 피코웰은 제1 피코웰이고, 여기서 제1 피코웰은 제1 용액을 함유하고, 여기서 제1 피코웰을 절단 조건에 노출시키는 것은 광-절단 가능한 링커를 절단하고 형광단을 제1 피코웰의 제1 용액으로 방출할 수 있고, 여기서 노출은 제1 피코웰에서 제1 용액 전체에서 형광단의 확산을 야기하고, 여기서 확산된 형광단을 포함하는 제1 용액을 함유하는 제1 피코웰 상에 빛을 비출으로써 획득된 형광성 신호는 사용자가 형광성 신호를 사용하여 계산된 퍼센트 방출에 대한 값을 야기하는 방출-모니터 비드로부터 비드-결합된 형광단의 퍼센트 방출을 계산하는 것을 가능하게 하고, 여기서 제2 피코웰은 제1 광-절단 가능한 링커와 동일한 유형의 광-절단 가능한 링커와 커플링된 비드-결합된 화합물을 함유하고, 여기서 제2 피코웰은 제2 용액을 함유하고, 여기서 제1 피코웰에서 방출-모니터 비드로부터 계산된 퍼센트 방출에 대한 값은 제2 피코웰의 제2 용액 중의 방출된 화합물의 농도의 계산을 가능하게 한다. 다른 방출-모니터 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 형광단이 TAMRA이고 소광제가 QSY7인 방출-모니터 비드, 도 9에 도시된 구조를 갖는 방출-모니터 비드, 도 10에 도시된 구조를 갖는 방출-모니터 비드, 및 적어도 90%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.9%를 소광할 수 있는 방출-모니터 비드이다.

[0051] 제조 방법 실시형태에 있어서, 포함되는 것은 방출-모니터 비드의 합성 방법으로서, 방출-모니터 비드가 비드, 소광제, 형광단, 및 형광단을 비드에 커플링시키는 광 절단 가능한 링커를 포함하고, (i) 수지를 제공하는 단계, (ii) 리신 링커를 수지에 커플링시키는 단계로서, 리신 링커를 함유하는 시약이 L-Fmoc-Lys(4-메틸트라이틸)-OH인, 단계, (iii) Fmoc 보호기를 제거하는 단계, (iv) 소광제의 공급원으로서 소광제-N-하이드록시석신이미드(소광제-NHS)인 시약을 사용하여 소광제를 커플링시키는 단계, (v) 트라이플루오로아세트산을 포함하는 시약을 사용하여 4-메틸트라이틸 보호기를 제거하는 단계, (vi) 광 절단 가능한 링커를 리신의 엡실론 아미노기에 커플링시키는 단계로서, 여기서 광 절단 가능한 링커는 Fmoc-광 절단 가능한 링커-OH인 시약에 의해 제공되는, 단계, 및 (vii) 형광단을 커플링시키는 단계를 이러한 순서로 포함하는, 방법이다. 또한 단계의 순서에 관한 것을 제외한 상기 실시형태가 제공된다. 다른 방법 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 형광단이 TAMRA이고 소광제가 QSY7인 상기 방법이다.

[0052] 방출-모니터 비드의 유용성에 관한 방법에 있어서, 제공되는 것은 피코웰에 존재하는 용액 중의 화합물의 농도를 제어하는 방법이고, 여기서 방법은 피코웰에서 비드-결합된 화합물을 적용되고, 여기서 피코웰은 용액을 함유하고, 여기서 비드-결합된 화합물은 절단 가능한 링커를 거쳐 비드에 커플링되고, 방법은 (a) 절단 가능한 링커의 절단 및 비드-결합된 화합물의 비드로부터의 방출을 수행하는 조건에 노출시켜 방출된 화합물을 생성하는 것으로서, 여기서 방출 후 용액 중에 방출된 화합물의 확산 또는 분산은 뒤따라 용액 중의 화합물의 실질적으로 실질적으로 균일한 농도를 야기하는 것, (b) 조건이 절단 가능한 링커를 절단할 수 있는 빛을 포함하는 것, (c) 조건이 실질적으로 균일한 농도의 결정된 농도를 생성하도록 조절되는 것, (d) 결정된 농도가 비드-결합된 방출-모니터로부터 방출되는 방출된 형광단의 농도에 관하여 만들어지는 것을 포함한다. 또한, 조건이 빛의 하나 이상의 파장, 빛의 강도, 및 빛 노출의 기간을 조절함으로써 조절되는 상기 방법, 비드-결합된 방출-모니터로부터 방출되는 방출된 형광단의 농도가 비드로부터 비드-결합된 화합물의 방출을 수행하여 방출된 화합물을 생성하는 것과 동시에 결정되는 상기 방법, 및 비드-결합된 방출-모니터로부터 방출되는 방출된 형광단의 농도가 비드로부터 비드-결합된 화합물을 수행하여 방출된 화합물을 생성하는 것보다 실질적으로 전의 시간에 결정되는 상기 방법이 제공된다.

[0053] 용어 "결정된"은 비드를 빛에 노출시키기 전에 원하는 농도로 예정되고 결정되는 농도를 의미할 수 있다. 또한, 용어 "결정된"은 비드를 빛에 노출시키는 것과 동시에 결정되는 농도인 "실시간"으로 결정되는 농도를 의미할 수 있다.

[0054] 캡 실시형태에 있어서, 포함되는 것은 복수의 피코웰을 포함하는 피코웰 플레이트와 조합인 캡이고, 여기서 캡

은 복수의 피코웰을 포함하는 피코웰 플레이트와 함께 사용할 수 있고, 여기서 각각의 복수의 피코웰은 애피처, 바닥, 및 벽에 의해 규정될 수 있고, 여기서 벽은 상부 상의 애피처 및 하부 상의 바닥에 의해 규정되고, 여기서 애피처는 등근형이고, 여기서 바닥은 등근형이고, 여기서 벽은 원뿔대의 표면의 형태를 갖고, 여기서 애피처는 제1 직경을 갖고, 바닥은 제2 직경을 갖고, 여기서 제1 직경은 제2 직경보다 크고, 여기서 캡은 애피처에 꼭 끼워맞출될 수 있는 구형 캡이고, 여기서 애피처는 더 큰 듀로미터를 갖는(더 경성인) 중합체로 구성되고, 여기서 캡은 더 작은 듀로미터를 갖는(더 연성인) 중합체로 제조되고, 여기서 캡 및 애피처의 상대적인 듀로미터는 애피처에 가역적으로 꼭 맞는 구형 캡을 가능하게 하고, 여기서 캡은 (i) 피코웰을 막고 누출을 방지할 수 있고, (ii) 세포 배지 중의 세포가 피코웰에서 배양되는 상황에서, 세포에 의해 방출되는 대사물질을 흡수할 수 있는 수동형 캡이고, (iii) 복수의 본질적으로 동일한 화합물을 포함하는 비드의 형태를 갖고, 각각의 복수의 본질적으로 동일한 화합물이 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되고, 절단 가능한 링커의 절단이 복수의 화합물의 적어도 일부를 비드로부터 방출시키는 능동형 캡이고, (iv) 복수의 동일한 시약을 포함하는 비드의 형태를 갖고, 각각의 복수의 본질적으로 동일한 시약이 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링되고, 절단 가능한 링커이 절단이 복수의 시약의 적어도 일부를 비드로부터 방출시키는 능동형 캡이다.

[0055]

다공성 캡 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 피코웰 플레이트 및 고체 중합체 코팅과 조합인 복수의 다공성 캡이고, 여기서 각각의 복수의 다공성 캡은 위 표면 및 아래 표면을 포함하고, 여기서 피코웰 플레이트는 복수의 피코웰을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 다공성 캡은 피코웰과 접촉하고 피코웰에 가역적으로 꼭 맞고, 여기서 피코웰 플레이트 및 복수의 다공성 캡의 각각의 위 표면은 고체 중합체 코팅으로 덮이고, 여기서 고체 중합체 코팅은 각각의 캡의 위 표면의 적어도 일부와 접촉하고 위 표면의 상기 적어도 일부에 접착적으로 부착되고, 여기서 (i) 각각의 복수의 피코웰은 수성 용액을 보유할 수 있고, 여기서 반응의 생성물은 용액 중에서 발생하고, 여기서 생성물의 적어도 일부는 복수의 다공성 캡의 각각의 아래 표면에 의해 흡수되고, (ii) 여기서 중합 할 수 있는 중합 가능한 시약의 용액은 피코웰 플레이트와 조합인 복수의 다공성 캡에 부어지고, 여기서 중합 가능한 시약은 중합되어, 피코웰 플레이트의 실질적으로 모든 상부 표면을 코팅하고, 따라서 복수의 다공성 캡의 각각에 중합된 시약을 고정하는, 실질적으로 평면인 표면을 형성하고, (iii) 여기서 모든 복수의 다공성 캡은 복수의 피코웰로부터 박리의 작용에 의해 제거될 수 있고, 여기서 접착은 복수의 다공성 캡과 중합된 시약 사이에 유지되고, 이로써 각각의 캡의 위 표면을 부분적으로 갖는 접착 캡의 어레이가 중합된 시약에 포매되고 (embedded), 각각의 캡의 아래 표면이 임의의 흡수된 반응 생성물의 분석에 접근 가능해진다.

[0056]

이는 DNA 바코드의 효소적 합성을 안내하는 스플린트 올리고의 사용을 위한 제조 방법 실시형태를 제공한다. 제공되는 것은 비드-결합된 연접 DNA 바코드의 제조 방법이고, 여기서 비드-결합된 연접 DNA 바코드는 복수의 DNA 바코드 모듈, 및 선택적으로 하나 이상의 기능성 핵산, 및 선택적으로 화학적 라이브러리 단량체의 동일성이 아닌 어떤 것의 동일성을 인코딩하는 하나 이상의 동일성-인코딩 핵산을 포함하고, 방법은 (a) 제1 DNA 바코드 모듈 및 제1 어닐링 부위를 포함하는 커플링된 폴리뉴클레오타이드를 갖는 비드를 제공하는 단계로서, 여기서 제1 어닐링 부위는 제1 스플린트 올리고뉴클레오타이드(스플린트 올리고)와 혼성화될 수 있고, 제1 스플린트 올리고는 DNA 중합효소에 대한 주형으로서 제공되어 커플링된 폴리뉴클레오타이드에 대한 중합을 촉매 작용할 수 있고, 여기서 뉴클레오타이드는 혼성화된 제1 스플린트 올리고의 것들에 상보적이고, 여기서 중합 후 혼성화된 제1 스플린트 올리고의 것들에 상보적인 중합된 뉴클레오타이드는 비드-결합된 제2 DNA 바코드 모듈 및 제2 어닐링 부위를 포함하는, 단계; (b) 상기 제1 스플린트 올리고와 커플링된 폴리뉴클레오타이드를 갖는 상기 비드를 제공하고, 상기 제1 스플린트 올리고가 상기 커플링된 폴리뉴클레오타이드와 혼성화되도록 하는 단계; (c) DNA 중합효소 및 테옥시뉴클레오타이드 트라이포스페이트(dNTP)를 첨가하고 DNA 중합효소가 커플링된 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 dNTP의 중합을 촉매 작용하는 단계로서, 여기서 커플링된 폴리뉴클레오타이드는 유리 3'-말단을 갖고, 여기서 중합은 유리 3'-말단에 대한 것인, 단계, (d) 제1 스플린트 올리고를 세척하는 단계를 포함한다. 또한 제1 스플린트 올리고가 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 및 제2 어닐링 부위를 포함하는 상기 방법이 예상된다.

[0057]

추가의 제조 방법 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 제1 스플린트 올리고가 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 및 제1 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위를 인코딩하는 핵산을 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위가 시퀀싱 프라이머에 대하여 혼성화되어 혼성화된 시퀀싱 프라이머를 야기할 수 있고, 혼성화된 시퀀싱 프라이머가 제2 DNA 바코드 모듈 및 제1 DNA 바코드 모듈의 시퀀싱을 지시할 수 있는, 상기 방법이다.

[0058]

게다가, 예상되는 것은 제1 스플린트 올리고, DNA 중합효소, 및 dNTP가 모두 동시에 첨가되거나, 제1 스플린트 올리고, DNA 중합효소, 및 dNTP가 분리된 시간에 각각 첨가되는, 상기 방법이다.

- [0059] 비드 상의 내부 대 외부 위치에 대하여, 제공되는 것은 비드가 외부 위치 및 내부 위치를 포함하고, 비드-결합된 연접 DNA 바코드가 실질적으로 비드의 외부에 있는 위치 및 드물게 비드의 내부 위치에서 비드에 커플링되고, 비드가 또한 복수의 커플링된 화합물을 포함하고, 서로 비교시, 모든 복수의 커플링된 화합물이 실질적으로 동일한 구조를 갖고, 비드가 실질적으로 소수성 중합체로 구성되는, 상기 방법이다.
- [0060] 추가의 방법 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 (a) 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드, 및 제2 어닐링 부위를 포함하는 커플링된 제1 더 긴 폴리뉴클레오타이드를 갖는 비드를 제공하는 단계로서, 여기서 제2 어닐링 부위는 제2 스플린트 올리고와 혼성화될 수 있고, 제2 스플린트 올리고는 DNA 중합효소에 대한 주형으로서 제공되어 커플링된 제1 더 긴 폴리뉴클레오타이드에 대한 중합을 촉매 작용할 수 있고, 여기서 뉴클레오타이드는 혼성화된 제2 스플린트 올리고의 것들에 상보적이고, 여기서 중합 후 혼성화된 제2 스플린트 올리고의 것들에 상보적인 중합된 뉴클레오타이드는 비드-결합된 제3 DNA 바코드 모듈 및 제3 어닐링 부위를 포함하는, 단계; (b) 상기 제2 스플린트 올리고와 커플링된 폴리뉴클레오타이드를 갖는 상기 비드를 제공하고, 상기 제2 스플린트 올리고가 상기 커플링된 제1 더 긴 폴리뉴클레오타이드와 혼성화되도록 하는 단계; (c) DNA 중합효소 및 데옥시뉴클레오타이드 트라이포스페이트(dNTP)를 첨가하고, DNA 중합효소가 커플링된 더 긴 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 dNTP의 중합을 촉매 작용하도록 하는 단계로서, 여기서 커플링된 더 긴 폴리뉴클레오타이드는 유리 3'-말단을 갖고, 여기서 중합은 유리 3'-말단에 대한 것인, 단계, (d) 제2 스플린트 올리고를 세척하는 단계를 더 포함하는, 상기 방법이다.
- [0061] 이는 전체 DNA 바코드의 제조를 위한 제1 DNA 바코드 모듈, 제2 DNA 바코드 모듈, 제3 DNA 바코드 모듈 등의 일련 번호화에 관한 것이다. 이는 또한 전체 DNA 바코드의 제조에서 방법 단계의 주기를 계속 반복하는 것에 관한 것이다. 제공되는 것은 각각의 상기 복수의 DNA 바코드 모듈이 번호에 의해 동정되거나 명명되는 상기 방법이고, 여기서 방법은 기재된 단계를 반복하는 것을 더 포함하고, 제1 반복의 경우, DNA 바코드 모듈의 명칭은 기존의 명칭에 하나의 숫자를 추가함으로써 증가되고, 어닐링 부위의 명칭은 기존의 명칭에 하나의 숫자를 추가함으로써 증가되고, 스플린트 올리고의 명칭은 기존의 디지털 말단 DNA 바코드 모듈의 명칭에 하나의 숫자를 추가함으로써 증가되고, "제1 더 긴 폴리뉴클레오타이드"의 명칭은 기존의 명칭에 하나의 숫자를 추가함으로써 변화하고, 여기서 기재된 단계의 반복을 포함하는 것은 1회 반복, 또는 2회 반복, 또는 3회 반복, 또는 4회 반복, 또는 5회 반복, 또는 5회 이상의 반복, 또는 10회 이상의 반복이다.
- [0062] 또한 복수의 스플린트 올리고를 포함하고, 각각의 스플린트 올리고가 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위를 포함하고, 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위가 시퀀싱 프라이머에 혼성화되어 혼성화된 시퀀싱 프라이머를 야기할 수 있고, 혼성화된 시퀀싱 프라이머가 적어도 하나의 비드-결합된 DNA 바코드 모듈 및 적어도 하나의 비드-결합된 DNA 바코드 모듈의 시퀀싱을 지시할 수 있는, 상기 방법이 예상된다.
- [0063] 이는 DNA 중합효소가 기능성 핵산 및 다양한 유형의 정보성 핵산을 합성하도록 안내하는 스플린트 올리고에 관한 실시형태에 관한 것이다. 제공되는 것은 적어도 하나의 스플린트 올리고가 기능성 핵산을 포함하거나, 적어도 하나의 스플린트 올리고가 화학적 라이브러리 단량체 상의 정보가 아닌 정보를 인코딩하는, 상기 방법이다. 제공되는 것은 클릭 화학을 거쳐 적어도 하나의 DNA 바코드 모듈을 커플링하는 단계를 더 포함하는 상기 방법이고, 여기서 단계는 임의의 스플린트 올리고를 사용하지 않는다.
- [0064] 간략하게 기술하면, 본 개시내용은 스크리닝 화학적 화합물을 스크리닝하는 시스템으로서, (a) 복수의 피코웰을 포함하는 피코웰 어레이 플레이트로서, 여기서 각각의 피코웰은 피코웰의 상부에서 개구를 규정하는 상부 애피처, 바닥에 의해 규정되는 하부를 갖고, 여기서 상부 애피처는 바닥으로부터 분리되고, 여기서 벽은 상부 애피처와 바닥 사이에 존재하는 것; (b) 적어도 하나의 피코웰에 배치된 적어도 하나의 비드로서, 여기서 적어도 하나의 비드는 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 DNA 바코드, 및 복수의 실질적으로 동일한 비드-결합된 화합물을 포함하는 것, (c) 여기서 적어도 하나의 비드는 연접 DNA 바코드 또는 직교 DNA 바코드의 형태를 갖는 DNA 바코드를 포함하고, 여기서 DNA 바코드가 연접 DNA 바코드의 형태를 갖는 경우, 연접 DNA 바코드는 하기 방법을 사용하여 제조되는 것을 포함하는 시스템을 제공한다: (i) 클릭 화학을 사용하거나, (ii) 단계의 반복 주기를 사용하고, 여기서 반복 주기에서 단계는 부분적으로 제조된 DNA 바코드에 대한 어닐링을 위하여 스플린트 올리고를 사용하는 것을 포함하고, 여기서 어닐링된 스플린트 올리고는 DNA 중합효소를 사용하여 부분적으로 제조된 DNA 바코드를 연장하기 위한 주형으로서 사용되고, 여기서 스플린트 올리고는 부분적으로 제조된 DNA 바코드에 중합되는 DNA 바코드 모듈에 상보적인 염기를 함유한다.
- [0065] 또 다른 측면에 있어서, 제공되는 것은 DNA 바코드가 (a) 각각의 하나 이상의 DNA 바코드 모듈이 화학적 라이브러리 단량체의 동일성에 대한 정보를 인코딩하는 하나 이상의 DNA 바코드 모듈, 및 (b) 선택적으로 하나 이상의

기능성 핵산, 및 (c) 선택적으로, 화학적 라이브러리 단량체의 동일성에 대한 정보가 아닌 유형의 정보를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는, 상기 시스템이다.

[0066] 게다가, 제공되는 것은 각각이 상이한 피코웰의 개구에 끼워맞출될 수 있고, 각각이 피코웰의 내부에 있는 유체의 증발을 최소화하거나 방지할 수 있고, 각각이 피코웰의 내부에 있는 유체의 누출을 최소화하거나 방지할 수 있는 복수의 캡을 더 포함하는, 상기 시스템이다.

[0067] 또한 포함되는 것은 각각이 애퍼처가 원형인 피코웰의 애퍼처에 끼워맞출될 수 있고, 각각이 피코웰의 내부에 있는 유체의 증발을 최소화하거나 방지할 수 있고, 각각이 피코웰의 내부에 있는 유체의 누출을 최소화하거나 방지할 수 있는 복수의 구형 캡을 더 포함하는, 상기 시스템이다.

[0068] 또한 적어도 하나의 비드가 연접 DNA 바코드의 형태를 갖는 DNA 바코드를 포함하는 경우, 연접 DNA 바코드가 (i) 시퀀싱 프라이머 결합 부위, (ii) 제1 DNA 바코드 모듈, (iii) 제1 올리고뉴클레오타이드 스플린트와 혼성화될 수 있는 제1 어닐링 부위로서, 제1 올리고뉴클레오타이드 스플린트가 제2 DNA 바코드 모듈의 효소적 합성을 안내하는데 사용될 수 있는 것, (iv) 제2 DNA 바코드 모듈, (v) 제2 올리고뉴클레오타이드 스플린트와 혼성화될 수 있는 제2 어닐링 부위로서, 제2 올리고뉴클레오타이드 스플린트가 제3 DNA 바코드의 합성을 안내하는데 사용될 수 있는 것, (vi) 제3 DNA 바코드 모듈, (vii) 제3 올리고뉴클레오타이드 스플린트와 혼성화될 수 있는 제3 어닐링 부위로서, 제3 올리고뉴클레오타이드 스플린트가 제4 DNA 바코드를 합성하는데 사용될 수 있는 것을 포함하는, 상기 시스템이 예상된다.

[0069] 방법 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 원하는 성질을 갖는 화합물을 위하여 화합물 라이브러리를 스크리닝하는 방법으로서, (a) 복수의 비드를 제공하는 단계로서, 각각의 비드가 비드 표면에 부착된 복수의 올리고뉴클레오타이드 및 비드 표면에 부착된 복수의 실질적으로 관련된 화합물을 포함하고, 비드에 부착된 올리고뉴클레오타이드의 서열이 비드 표면에 부착된 복수의 실질적으로 관련된 화합물의 합성 이력을 인코딩하는, 단계; (b) 화합물 라이브러리에서 화합물의 원하는 성질을 위하여 검정에서 복수의 비드를 도입하는 단계; (c) 적어도 하나의 비드로부터 신호를 포획하는 단계로서, 신호가 검정에서 비드 상의 화합물의 성능을 반영하는, 단계; (d) 비드로부터 올리고뉴클레오타이드를 제거하지 않고 검정 신호가 또한 포획된 적어도 하나의 비드에 부착된 복수의 올리고뉴클레오타이드를 시퀀싱하는 단계; 및 (e) 단계 (d)의 시퀀싱 판독으로부터 적어도 하나의 화합물을 동정하고 이를 단계 (c)의 신호에서 포획된 이의 상응하는 검정 성능과 관련시키는 단계를 포함하는 방법이다.

[0070] 더 상세히 설명하면, 포함되는 것은 검정이 결합 검정을 포함하거나, 검정이 활성 검정을 포함하거나, 검정이 경쟁적 결합 검정 또는 경쟁적 억제 검정을 포함하거나, 검정이 테더링되지 않은 화합물과 다른 검정 시약의 상호작용을 포함하거나, 테더링되지 않은 화합물이 비드 표면으로부터 방출된 화합물이거나, 화합물이 화합물을 비드에 연결시키는 절단 가능한 링커를 절단함으로써 방출되거나, 검정이 복수의 국한된 부피로 발생하거나, 명목상 하나의 비드가 국한된 부피에 대하여 분산되는, 상기 방법이다.

[0071] 또 다른 측면에 있어서, 추가로 예상되는 것은 국한된 부피가 수성 소적을 포함하거나, 수성 소적이 오일 매질 또는 소수성 액체 매질 중에 혼탁되거나, 국한된 부피가 피코웰을 포함하거나, 피코웰이 규칙적인 어레이에서 조직화되거나, 복수의 국한된 부피가 규칙적인 어레이에서 조직화되는, 상기 방법이다.

[0072] 게다가, 추가로 포함되는 것은 국한된 부피가 비드 근처의 부착성 수성 매질의 총을 포함하고, 비드가 소수성 매질 중에 혼탁되는, 상기 방법, 및 검정 시약이 올리고뉴클레오타이드의 시퀀싱 전에 세척되는, 상기 방법이다. 그리고 시퀀싱 단계 (d)가 검정 단계 (b) 전에 수행되는 상기 방법이다. 또한 제공되는 것은 비드 상의 올리고뉴클레오타이드가 시퀀싱 단계 후에, 검정 단계 전에 제거되는 상기 방법이다. 게다가, 올리고뉴클레오타이드의 제거가 효소적 소화, 화학적 절단, 열적 분해 또는 물리적 전단을 포함하는 상기 방법, 및 결합 검정이 비드에 대한 RNA 문자의 결합을 포함하는 상기 방법, 및 비드가 결합된 RNA 문자의 시퀀싱을 포함하는 상기 방법이 추가로 예상된다.

[0073] 또 다른 측면에 있어서, 제공되는 것은 결합 검정이 형광 표지 결합 검정을 포함하고, 비드 상의 화합물에 대한 문자 결합이 형광단을 포함하는, 상기 방법, 또는 결합 검정이 핵산 표지 결합 검정을 포함하고, 비드 상의 화합물에 대한 문자 결합이 핵산 태그를 포함하고, 추가로 검정으로부터의 신호가 비드 상의 화합물에 대한 문자 결합에 부착된 핵산 태그의 시퀀싱을 포함하는, 상기 방법이다.

[0074] 추가로 성질에 관한 방법 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 원하는 성질이 (i) 효소의 촉매 활성의 억제 또는 자극, (ii) 세포 기반의 검정 또는 생체내 검정에 의해 측정 가능한 바, Th1형 면역 반응의 자극, (iii) 세포 기반의 검정 또는 생체내 검정에 의해 측정 가능한 바, Th2형 면역 반응의 자극, (iv) 세포 기반의 검정 또는

생체내 검정에 의해 측정 가능한 바, Th1형 면역 반응의 억제, (v) 세포 기반의 검정 또는 생체내 검정에 의해 측정 가능한 바, Th2형 면역 반응의 억제, (vi) 세포 기반의 검정 또는 생체내 검정에 의해 측정 가능한 바, 단백질의 유비퀴틴-매개된 분해의 자극 또는 억제 중 하나 이상을 포함하는, 상기 방법이다.

[0075] 시스템 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 원하는 활성을 갖는 화합물에 대한 화합물 라이브러리를 스크리닝하는 시스템으로서, (a) 복수의 화합물-부착된, 올리고뉴클레오타이드-인코딩된 비드를 수용하기 위한 샘플 구획; (b) 샘플 구획 내의 복수의 캡슐화 구획으로서, 각각의 캡슐화 구획은 검정 배지에 분산된 단일 비드를 명목상 포함하고, 추가로 검정 배지가 비드 상의 화합물과의 상호작용이 검정되어 측정 가능한 신호를 야기하는 시약을 포함하는, 구획; (c) 신호 측정용 검출기; (d) 시퀀싱 플랫폼; 및 (e) 사용자로부터 하나 이상의 명령을 수신하기 위한 사용자 인터페이스를 포함하는 시스템이다. 캡슐화 구획이 액체 소적을 포함하는 상기 시스템이 또한 제공된다. 또 다른 측면에 있어서, 캡슐화 구획이 피코웰을 포함하거나, 추가로 캡슐화 구획이 검정 시약을 포함하거나, 검출기가 광학 검출기를 포함하거나, 시퀀서가 광학 검출기를 포함하는, 상기 시스템이 제공된다.

[0076] 하나의 측면에 있어서, 본 개시내용은 (a) 핵산 인코딩된 섭동을 제공하고, 세포를 핵산 인코딩된 섭동으로 국한하고; (b) 세포를 국한된 부피의 핵산 인코딩된 섭동과 접촉시키고, 여기서 섭동 개시 및 투여가 제어되고; (c) 세포를 핵산 인코딩된 섭동과 특정된 기간의 시간 동안 배양하고; (d) 핵산 인코딩된 섭동을 인코딩하는 핵산을 세포로 전달함으로써, 세포를 섭동하는 방법을 특징으로 한다.

[0077] 이러한 측면의 몇몇 실시형태에 있어서, 핵산 인코딩된 섭동은 핵산 인코딩된 화합물 또는 약물 분자이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 핵산 인코딩된 섭동은 DNA-인코딩된 라이브러리이다.

[0078] 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 및 섭동을 인코딩하는 핵산은 부착되지 않고 용액에서 자유롭다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 및 섭동을 인코딩하는 핵산은 서로 부착된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 및 섭동을 인코딩하는 핵산은 동일한 기질에 부착되지만 서로 부착되지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 기질에 대한 섭동의 부착 및 기질에 대한 핵산의 부착은 절단 가능한 부착이다. 특정한 실시형태에 있어서, 절단 가능한 부착은 광 절단 가능한 부착, 온도 절단 가능한 부착, pH 감응성 부착, 산 절단 가능한 부착, 염기 절단 가능한 부착, 음파 절단 가능한 부착, 염 절단 가능한 부착, 산화환원 감응성 부착, 또는 물리적으로 절단 가능한 부착으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] 개시내용의 이러한 측면의 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 및 섭동의 국한은 소적 캡슐화, 에멀션 캡슐화, 피코웰 캡슐화, 매크로웰 캡슐화, 물리적 부착, 버블 캡슐화, 또는 미세유체 컨파인먼트(confinement)를 포함한다.

[0080] 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동에 대한 제어는 광 노출의 제어, 온도 노출의 제어, pH 노출의 제어, 시간 노출의 제어, 음파 노출의 제어, 염 노출의 제어, 화학적 또는 물리적 산화환원 전위의 제어, 또는 기계적 교반 노출의 제어를 포함한다.

[0081] 특정한 실시형태에 있어서, 배양은 섭동을 기질로부터 절단한 후 또는 핵산을 기질로부터 절단한 후, 세포를 섭동에 노출시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 배양은 섭동을 기질로부터 절단하지 않거나 핵산을 섭동으로부터 절단하지 않고 세포를 섭동에 노출시키는 것을 포함한다.

[0082] 몇몇 실시형태에 있어서, 핵산 인코딩된 섭동을 인코딩하는 핵산을 세포에 전달하는 것은 핵산을 세포의 세포 표면에 부착하는 것을 포함한다. 특정한 실시형태에 있어서, 핵산을 세포의 세포 표면에 부착하는 것은 핵산을 세포막에 삽입하는 것을 포함한다. 특정한 실시형태에 있어서, 핵산을 세포의 세포 표면에 부착하는 것은 핵산을 세포 표면 상의 생체분자에 부착하는 것을 포함한다. 특정한 실시형태에 있어서, 생체분자는 단백질 또는 탄수화물이다. 다른 실시형태에 있어서, 핵산을 세포의 세포 표면에 부착하는 것은 핵산 상의 임의의 태그를 통해 부착하는 것을 포함한다.

[0083] 또 다른 측면에 있어서, 본 개시내용은 세포를 섭동으로 섭동하고 섭동의 동일성으로 인코딩하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 (a) 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리를 제공하는 단계; (b) 세포를 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리로 국한하는 단계로서, 여기서 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리는 조합적으로 합성된 화합물(combinatorially synthesized compound)의 하나 이상의 카페 및 인코딩 핵산 태그의 하나 이상의 카페를 포함하고, 여기서 화합물 및 인코딩 핵산은 비드에 부착되고, 여기서 인코딩 핵산은 화합물의 동일성을 인코딩하고, 여기서 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리 및 세포는 국한 부피로 국한되는, 단계; (c) 화합물을 비드로부터 방출하고, 화합물을 국한 부피 내의 세포와 함께 배양하는 단계; (d) 선택적으로 인코딩 핵산 태그를 비드로부터 방출하는 단계; 및 (e) 인코딩 핵산 태그를 세포에 부착하여, 이로써 세포에 부착된 인코딩 핵산 태그를 통해 화합물의 동일성을 보존하는 단계를 포함한다.

[0084]

또 다른 측면에 있어서, 본 개시내용은 세포를 섭동하고, 세포를 섭동의 동일성으로 인코딩하고, 섭동에 대한 세포의 반응을 측정하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 (a) 세포를 제1 국한된 부피로 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리와 접촉시키는 단계로서, 여기서 비드-결합된 DNA 인코딩된 라이브러리는 조합적으로 합성된 화합물의 하나 이상의 카페 및 인코딩 핵산 태그의 하나 이상의 카페를 포함하고, 여기서 화합물 및 인코딩 핵산은 비드에 부착되고, 여기서 인코딩 핵산은 화합물의 동일성을 인코딩하는, 단계; (b) 라이브러리의 화합물을 비드로부터 방출하고, 라이브러리의 화합물을 제1 국한된 부피로 세포와 함께 배양하는 단계; (c) 선택적으로 인코딩 핵산 태그를 제1 국한된 부피로 비드로부터 방출하는 단계; (d) 세포의 세포 표면에 대한 인코딩 핵산 태그를 포획하여, 이로써 세포가 라이브러리의 화합물에 노출되고, 노출된 화합물의 동일성이 세포 표면 상에 포획되는 단계; (e) 세포를 제1 국한 부피로부터 방출시키는 단계로서, 여기서 인코딩 핵산 태그는 세포에 부착되고, 인코딩 핵산 태그는 세포가 노출된 화합물의 동일성을 인코딩하는, 단계; (f) 이전에 섭동되고 핵산 태깅된 세포를 제2 국한된 부피로 반응-검출 비드와 함께 포획하는 단계로서, 여기서 세포는 세포의 세포 내용물을 반응-포획 비드에 노출시키는 용해 조건에 노출되고, 여기서 반응-포획 비드는 이전에 섭동되고 핵산 태깅된 세포에서 섭동을 인코딩하는 세포 내용물 및 핵산 태그를 포획하는 포획 프로브를 포함하는, 단계; (g) 반응-포획 비드를 제2 국한 부피로 용해된 세포와 함께 배양하여, 이로써 반응-포획 비드에 대한 섭동을 인코딩하는 세포 내용물 및 핵산 태그 둘 다를 포획하는 단계; (h) 선택적으로 섭동에 대한 세포의 반응을 핵산 신호로 전환하는 단계로서, 여기서 섭동에 대한 세포의 반응은 핵산 신호가 아닌, 단계; 및 (i) 반응-포획 비드에 부착된 핵산 태그를 시퀀싱하여, 이로써 섭동의 동일성과 섭동에 대한 세포의 반응의 상관관계를 분석하는 단계를 포함한다.

[0085]

또 다른 측면에 있어서, 본 개시내용은 (a) 피코웰의 어레이 및 작용화된 섭동 비드의 라이브러리를 제공하고, 여기서 피코웰은 단일 세포 및 단일 작용화된 섭동 비드를 수용할 수 있고, 여기서 각각의 작용화된 섭동 비드는 상이한 복수의 실질적으로 동일한 방출 가능한 화합물 및 화합물을 인코딩하는 복수의 뉴클레오파이드 바코드를 포함하고, 여기서 뉴클레오파이드 바코드는 세포의 세포 내용물을 포획할 수 있는 작용화된 바코드이고, 여기서 세포의 세포 내용물은 작용화된 섭동 비드에 함유된 섭동에 대한 세포 반응을 포함하고; (b) 단일 세포를 피코웰 어레이의 각각의 피코웰에 포획하고; (c) 단일 작용화된 섭동 비드를 단일 세포를 함유하는 피코웰에 포획하고; (d) 화합물을 작용화된 섭동 비드로부터 방출하고, 세포를 방출된 화합물과 함께 배양하고, 여기서 피코웰 사이의 화합물을 최소 확산을 갖고; (e) 세포를 용해시켜 세포 내용물을 방출하고; (f) 작용화된 섭동 비드 상의 작용화된 올리고뉴클레오파이드 상에 세포 내용물의 하나 이상의 구성분을 포획하고, 여기서 포획은 뉴클레오파이드 바코드를 세포 내용물의 핵산 요소와 조합하여, 이로써 뉴클레오파이드 바코드와 세포 내용물의 핵산 요소의 혼성체를 형성하는 혼성화 및 효소적 연장을 포함하고; (g) 혼성체를 방출하고, 작용화된 섭동 비드의 라이브러리로부터 혼성체를 수집하고, 혼성체를 시퀀싱하여, 이로써 섭동을 섭동에 대한 세포 반응과 연관시킴으로써, 세포를 섭동하고 섭동에 대한 세포의 반응을 포획하는 방법을 특징으로 한다.

도면의 간단한 설명

[0086]

도 1. 연접형 비드. 연접형 비드에서, DNA 바코드는 스페이서로서 프라이머 어닐링 부위와 같은 기능을 갖는 임의의 다른 핵산 또는 제조 일자에 대한 정보와 함께, 단일 사슬에서 서로 연결된 모든 DNA 바코드 모듈의 형태를 갖는다. 이 도면에서 번호는 구조 번호가 아니다. 번호는 DNA 바코드에서 "DNA 바코드 모듈"의 순서를 지칭한다.

도 2. 직교형 비드. 직교형 비드에서, DNA 바코드는 모든 DNA 바코드 모듈의 형태를 갖고, 여기서 DNA 바코드 모듈은 단일 사슬에서 함께 발생하지 않지만, 대신에 비드 상의 상이한 위치에 따로 연결되어 발생한다. 이 도면에서 번호는 구조 번호가 아니다. 번호는 DNA 바코드에서 "DNA 바코드 모듈"의 순서를 지칭한다.

도 3. 절단 가능한 링커, 절단을 위한 조건(UV 광 또는 화학물질), 및 절단 생성물. 문헌[Yinliang Yang (2014) Design of Cleavable Linkers and Applications in Chemical Proteomics. Technische Universität München Lehrstuhl für Chemie der BioPolymere]으로부터의 정보. 각각의 링커의 좌측에 대한 알파벳 문자는 이러한 참조로부터 온 것이다.

도 4. 본 개시내용의 조성을 및 방법을 위한 예시적인 아미노산 유도체.

도 5. 사진은 첨가된 레날리도마이드의 증가하는 농도와 함께 HeLa 세포 내부의 융합 단백질의 분해에서의 증가를 개시한다. 상부: IKZF1/GFP 융합 단백질의 발현. 하부: mScarlett® 대조군의 발현. 레날리도마이드는 0, 0.1, 1.0, 또는 10 마이크로몰로 첨가되었다.

도 6. 사진은 첨가된 레날리도마이드의 증가하는 농도와 함께 HeLa 세포 내부의 융합 단백질의 분해에서의 증가를 개시한다. 상부: IKZF3/GFP 융합 단백질의 발현. 하부: mScarlett 대조군의 발현. 레날리도마이드는 0, 0.1, 1.0, 또는 10 마이크로몰로 첨가되었다.

도 7. 비드-결합된 DNA 바코드의 생성을 위한 방법 및 시약. "DNA 바코드"의 가장 정확한 설명은 모든 DNA 바코드 모듈의 총합에 포함되는 모든 정보의 총합이다. 하지만 편의상, 용어 "DNA 바코드"는 본 명세서에서 모든 DNA 바코드 모듈의 모든 정보의 총합, 및 단계 번호와 같은 정보를 제공하는 임의의 추가의 핵산, 또는 비드-결합된 화합물을 구성하는 화학적 단량체의 일반형, 및 링커, 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 갖는 헤어핀, 또는 스페이서와 같은 기능을 제공하는 임의의 추가의 핵산을 더하여 지칭하는데 사용된다. DNA 바코드가, 적어도 부분적으로, 클릭 화학에 의해 만들어지는 경우, DNA 바코드는 클릭 화학 반응으로부터의 잔여 화학기를 포함할 수 있다.

도 8. 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 488의 구조. 이 도면의 목표는 상표명을 사용하는 것에 의존하지 않고 화합물을 동정하는 것이다.

도 9. 비드-결합된 방출-모니터의 단순화된 다이어그램. 방출-모니터는 사용자에게 가용성 화합물의 농도의 측정 후, 비드로부터 화합물의 UV-유도된 방출을 제공한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 하나의 유형의 비드는 방출-모니터에 대하여 전용이고, 즉, 이러한 비드는 비드-결합된 화합물을 함유하지도 않고 비드-결합된 DNA 라이브러리를 함유하지도 않는다. "PCL"은 광 절단 가능한 링커이다.

도 10. 비드 방출-모니터의 상세한 다이어그램.

도 11. 비드 방출-모니터의 화학적 합성.

도 12. 이작용성 링커를 갖는 아민-작용화된 비드로서, 여기서 링커는 리신 잔기를 포함한다.

도 13. 제1 유형의 카복실기에 의해 개질된 레날리도마이드의 화학적 합성의 단계.

도 14. 제2 유형의 카복실기에 의해 개질된 레날리도마이드의 화학적 합성의 단계.

도 15. 제3 유형의 카복실기에 의해 개질된 레날리도마이드의 화학적 합성의 단계.

도 16A, 도 16B, 도 16C. 레날리도마이드 유사체.

도 17. DNA 바코드의 클릭-화학 합성에 적합한 데옥시시티딘 유사체의 화학적 합성의 단계.

도 18A, B, C. 피코웰의 상부에 위치하고 피코웰을 밀봉하기 위한 캡. 도 18A는 화합물이 절단 가능한 링커를 거쳐 방출 가능한 능동형 캡을 나타낸다. 도 18B는 항체와 같은 시약이 결합되는 능동형 캡의 또 다른 유형을 나타낸다. 결합된 시약은 영구적으로 연결될 수 있거나, 이는 절단 가능한 링커에 의하여 연결될 수 있거나, 이는 수소 결합을 통해 결합되고 단지 피코웰에서 용액에 대한 노출 후, 능동형 캡으로부터 이러한 용액으로 확산에 의해 방출 가능할 수 있다. 도 18C은 피코웰에서 용액으로부터 대사물질을 흡수하거나 흡착하거나 수집하거나 포획하는데 사용될 수 있는 수동형 캡을 나타낸다. 흡수된 대사물질은 후속적으로 분석될 수 있다.

도 19a, b, c. 도 19a. 피코웰 위에 캡이 없는 피코웰 플레이트. 도 19b. 각각의 피코웰 위에 캡이 있는 피코웰 플레이트. 도 19c. 각각의 피코웰 위에 안전하게 고정된 하나의 캡을 갖는 피코웰 플레이트 위에 부어진 폴리아크릴아마이드 용액. 그 다음, 폴리아크릴아마이드는 다공성 캡에 스며들고, 고체화되고, 각각의 캡에 안정한 접착을 형성한다. 도 19d. 그 다음, 고체화된 폴리아크릴아마이드 "루프(roof)"를 피코웰 플레이트로부터 벗겨내고, 각각의 캡을 같이 온다. 그 다음, 피코웰 용액으로부터 전달되고 각각의 캡으로 흡수된 대사물질을 분석할 수 있다. 바람직하게는, 피코웰 플레이트 위와 비드 위에 부어지는 용액은 하이드로겔이 되고, 바람직하게는 비드는 하이드로겔로 만들어진다.

배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 적어도 하나의 웰이 캡핑되고, 액체 중합체 용액이 플레이트 위와 캡핑된 웰 위에 부어지는, 마이크로웰, 나노웰, 또는 피코웰을 갖는 시스템, 마이크로타이터 플레이트, 마이크로타이터 플레이트, 및 관련 방법을 배제할 수 있다. 또한, 배제될 수 있는 것은 액체 중합체가 중합되어 각각의 캡에 접착되는 고체 중합체를 형성하는 상기의 것이다. 또한, 배제될 수 있는 것은 고체 중합체가 떼어져 이것과 함께 접착 캡이 제거되는 방법 및 수득된 조성물이다.

도 20. IKZF1 유전자를 세포의 계놈에 통합시키기 위하여 사용되는 원형 플라스미드의 맵. 플라스미드는 IKZF1-mNEON-p2a-mScarlet-w3-2FB(9081 염기 쌍)이다. IKZF1은 이카루스(Ikarus) 단백질을 인코딩한다.

도 21. IKZF3 유전자를 세포의 게놈에 통합시키기 위하여 사용되는 원형 플라스미드의 맵. 플라스미드는 IKZF3 mNeon-p2a-mScarlet-w3-2FB(9051 bp)이다. IKZF3은 아이울로스 단백질을 인코딩한다.

도 22. 화학적 단량체(화합물 1 내지 6) 및 이의 DNA 바코드.

도 23. 화학적 단량체(화합물 7 내지 10) 및 이의 DNA 바코드.

도 24. 화학적 단량체(화합물 11 내지 16) 및 이의 DNA 바코드.

도 25. 화학적 단량체(화합물 17 내지 21) 및 이의 DNA 바코드.

도 26. 화학적 단량체(화합물 22 내지 16) 및 이의 DNA 바코드.

도 27. 화학적 단량체(화합물 27 내지 30) 및 이의 DNA 바코드.

도 28. 비드-결합된 DNA 바코드의 시퀀싱. 도면은 5개의 연속 염기 각각에 대한 형광성 신호의 강도를 개시하고, 여기서 5개의 연속 염기는 비드-결합된 DNA 바코드의 부분이다.

도 29. 단계화된 피코웰.

도 30. 비드로부터 형광단의 방출의 시간 과정. 이는 $t = 0$ 초, $t = 1$ 초, $t = 11$ 초, 및 $t = 71$ 초에서 비드-결합된 방출 모니터의 작동, 형광성 데이터의 획득을 나타낸다.

도 31. 소광제-형광단 기질 상의 아스파르til 프로테아제의 촉매 작용 후 수득된 방출 데이터.

도 32. 다양한 단계를 예시화하는 피코웰의 단면도이다.

도 33. UV 투여에서의 증가가 어떻게 비드로부터 형광단의 더 큰 절단을 야기하는지를 보여주는 적정 데이터. 비전문가의 용어로, 이는 형광단을 비드로부터 절단하는 도끼 영향의 스윙이 얼마나 더 강력한지를 나타낸다(UV 투여의 힘은 제곱센티미터당 출로 측정된다). 표기 "노출"은 사진을 찍을 때의 파라미터만을 지칭한다. 이는 단지 사진을 찍을 때의 노출 시간이다(이는 절단을 수행하는 광 또는 촉발을 수행하는 광의 노출 시간을 지칭하는 것이 아니다).

도 34. TAMRA 농도 대 광속. 도시된 것은 365nm의 UV 광에 노출 후 방출 후, 유리 TAMRA의 농도이다.

도 35는 소광제-형광단 기질, 및 효소에 의한 이러한 기질의 절단의 순으로 그린 그림을 그 결과 효소의 억제와 함께 제공한다. 또한 비드-결합된 웨스타틴-A, 및 비드-결합된 Fmoc-발린(음성 대조군)의 분자 구조를 나타낸다.

도 36. cDNA 라이브러리의 후속적인 제조와 함께 용해된 세포로부터의 mRNA의 최종적인 포획에서 사용을 위한 비드를 제조하는 단계. 이 도면은 또한 이로부터 본 출원의 우선권이 청구되는 가출원 중 하나(Compositions and Method for Screening Compound Libraries on Single Cells)에서 발생한다.

도 37. 세포를 DNA 바코드로 태깅하는데, 여기서 태깅은 세포막에 포매되는 지질을 경유한다. 이 도면은 또한 이로부터 본 출원의 우선권이 청구되는 가출원 중 하나(Compositions and Method for Screening Compound Libraries on Single Cells)에서 발생한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 첨부된 청구항을 포함하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단어의 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 기재하지 않는 한 이의 상응하는 복수의 지시대상을 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 참조는 각각의 개별적인 특허, 및 공개된 특허 출원뿐만 아니라, 도표, 도면, 서열 목록, 컴팩트 디스크 등이 참조로서 포함된다고 구체적이며 개별적으로 기재된 것과 동일한 정도로 참조로서 포함된다.

[0088] 약어

표 1은 약어 및 비제한적인 정의를 제공한다.

표 1

약어 및 비제한적인 정의	
ACN	아세토나이트릴
AMPSO	3-[1,1-다이메틸-2-하이드록시에틸] 아미노]-2-하이드록시프로판설폰산. AMPSO는 "우수한 버퍼" 중 하나이다((1966). Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochemistry. 5:467-477).
애퍼처	본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 애퍼처는 개구를 규정하는 물리적 성분 및, 더 구체적으로, 개구를 규정할 수 있는 최소량의 물리적 성분을 지칭하는데 사용된다. 임의의 제한을 암시하지 않으면서, 이러한 최소량의 물리적 성분은 바람직하게는 벽의 고리 형상 색션의 형태를 갖는다. 제한 없이, 애퍼처는 벽의 고리 형상 색션으로 간주될 수 있고, 여기서 색션의 두께는 약 0.2mm, 약 0.5mm, 약 10mm, 약 20mm, 약 50mm, 약 100mm, 약 200mm, 약 500mm, 약 1 마이크로미터(μm), 약 2μm, 약 5μm 등이고, 여기서 이 두께 측정은 축으로부터 연장되는 방사 방향이고, 여기서 측은 개구에 의해 규정된다.
1-AP	1-아지도피렌
ATB	활동성 결핵
바코드	용어 "DNA 바코드"는 이의 전체로서 화학적 화합물을 동정하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있고, 대조적으로, "DNA 바코드 모듈"은 화학적 화합물을 구성하는 단량체 중 오직 하나를 지칭할 수 있다. "DNA 바코드 모듈"의 짧은 정의는 이것이 화학적 라이브러리 단량체를 동정한다는 것이다. 그러나, "DNA 바코드 모듈"은 그 특정한 단량체를 만드는 이력을 동정하는데 사용될 수 있다. "DNA 바코드 모듈"의 더 긴 정의는 하기와 같다. 하기 화학적 라이브러리 단량체는 각각 상이한 "DNA 바코드 모듈"에 의해 동정될 필요가 있다. 심지어 제1 반응 및 제2 반응이 동일한 반응물(A 및 B)을 갖는 경우에도 상이한 DNA 바코드 모듈이 사용되고, 이는 생성물이 상이하기 때문이다(생성물은 C 또는 D이다). 또한, 심지어 제1 반응 및 제3 반응이 동일한 생성물(생성물은 "C"이다)을 야기하는 경우에도, 상이한 DNA 바코드 모듈이 사용되고, 이는 반응물이 상이하기 때문이다(반응물은 A + B, 또는 X + Y이다).
	반응 조건
A + B → C	반응 조건 A, 예를 들면, 메탄 용매와 함께
A + B → D	반응 조건 A, 예를 들면, 염화메틸렌 용매와 함께
X + Y → C	

BiNAP	BiNAP는 제1 나프탈렌의 1-탄소와 제2 나프탈렌의 1-탄소 사이의 탄소-탄소 결합을 거쳐 서로 부착된 2개의 나프탈렌기의 형태를 갖는다. 각각의 나프탈렌기는 또한 부착된 PPh_2 기를 함유하고, 여기서 PPh_2 기는 나프탈렌의 2-탄소에 부착된다. PPh_2 는 이에 2개의 폐닐기가 부착된 포스페이트기의 형태를 갖는다. BiNAP에서, 포스페이트는 나프탈렌과 PPh_2 사이에 위치한다.	
BTPBB	비스-트리스 프로판 파괴 버퍼	
BTPLB	비스-트리스 프로판 결찰 버퍼	
BTFWB	비스-트리스 프로판 세척 버퍼	
Cap	캡은 마이크로웰, 나노웰, 또는 피코웰과 안정한 접촉을 위하여 플러그, 스토퍼, 밀봉 등의 역할을 할 수 있는 물체이다. 캡은 구형, 타원형, 정육면체, 둥근 모서리의 정육면체, 피라미드형, 둥근 모서리의 피라미드형 등일 수 있다. 달리 기재되지 않는 한, 기재된 형상은 피코웰로의 부분적인 삽입 전 또는 완전한 삽입 전 형상이다. 바람직하게는, 사용될 때, 캡은 피코웰에 부분적으로 삽입되어 밀봉을 형성한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡은 임의의 부분적인 삽입 없이 피코웰의 상부에 느슨하게 위치할 수 있다.	
화합물	용어 "화합물"은 본 명세서에서, 임의의 제한을 암시하지 않고, 비드 상의 고체상 합성을 거쳐, 복수의 화학적 단량체를 서로 연결함으로써 합성되는 완성된 화학물질을 지칭하는데 사용된다. 일반적으로, 용어 "화합물"은 검정을 거쳐 활성에 대하여 시험되는 완성된 화학물질을 지칭한다. 용어 "화합물"은 비드에 대한 완성된 화합물의 결합을 매개하는 임의의 링커를 포함하는 것을 의도하지 않고, 보호기를 갖는 "화합물"이 약제학적 활성을 가질 수 있다는 것이 이해되지만, 결단될 것인 임의의 보호기를 포함하는 것을 의도하지 않는다. 용어 "화합물"은 모든 화학적 단량체가 연결된 것이 아닌 비드-결합된 화학물질을 지칭하는데 사용되지 않는다. 용어 "화합물"이 본원의 일부 다른 문맥에서 사용되는 경우, 숙련된 기술자는 이러한 기재가 관련이 있는지 없는지 여부를 결정할 수 있을 것이다.	
COMU	1-사이아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시) 다이메틸아미노-모르폴리노-카르베늄 혼사플루오로포스페이트(CAS 번호 1075198-30-9)	
연접 바코드	핵산 바코드	"연접"인 DNA 바코드는 모든 DNA 바코드 모듈이 동일한 중합체의 부분인 형태를 갖는다. 연접 형태를 갖는 DNA 바코드를 함유하는 경우, 모든 구성요소 DNA 바코드 모듈로부터의 모든 정보는 비드 상의 단일 부착 부위에 부착된 중합체 상에 존재한다. 연접 DNA는 "말단-대-말단 결찰" 또는 "말단-대-말단 연결"을 나타낸다(Farzaneh(1988) Nucleic Acids Res. 16:11319-11326; Boyer (1999) Virology. 263:307-312). 대조적으로, 단어 "연쇄"는 서로 사슬로서 연결된 DNA의 2개의 원을 나타낸다(Baird (1999) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 96:13685-13690).

CuAAC	구리-촉매 작용된 아자이드-알킨 고리첨가
CRB	클릭 반응 버퍼
DAF	다이아조플루오렌
DBCO	다이벤조사이클로옥坦
DBU	1,8-다이아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔
DCE	1,2-다이클로로에탄
DCM	다이클로로메탄
DESPS	DNA 인코딩된 고체상 합성
DIC	다이아이소프로필 카보다이이미드
DIEA	N,N'-다이아이소프로필에틸아민
DMA	다이메틸아세트아마이드
DMAP	4-다이메틸아미노피리딘
DMF	다이메틸폼아마이드
DI	탈이온화
DTT	다이티오토레이톨
EDC	에틸-다이메틸아미노프로필-카보다이이미드
ELISA	효소 연결 면역흡착 검정
FMOC	9-플루오레닐메톡시카보닐
FMOC-PCL-OH	4-[4-[1-(9-플루오레닐메틸옥시카보닐아미노)에틸]-2-메티옥시-5-나이트로페녹시] 부탄산(CAS 번호 162827-98-7)
기능성 핵산	비드-결합된 DNA 바코드의 문맥, 및 비드-결합된 DNA 바코드의 제조의 문맥에서, 용어 "기능성 핵산"은 활성 생화학적 기능(수소 결합, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 효소와의 상호작용 등의 이점을 갖는 기능)을 갖는 핵산을 지칭한다. 기능은 소수성 비드와 프라이머 결합 부위 사이의 거리를 확립하는 스페이서일 수 있다. 프라이머 결합 부위는 바람직하게는 DNA 중합효소의 활성을 지지하는 친수성 환경에서 발생한다. 또한, 기능은 프라이머 결합 부위, 헤어핀 벤드, 또는 "스플린트 올리고"를 위한 어닐링 부위일 수 있다. 이는 상응하는 화학적 단량체의 동일성에 대한 정보를 저장하는(인코딩하는) "정보성 핵산"과 대조적이다.
HDNA	헤드피스 DNA
HTS	대량신속처리 스크리닝
INA	5-아이오도나프탈렌-1-아자이드
LC	액체 크로마토그래피
LTB	잠복성 결핵
MDM2	뮤린 쌍염색체(Double Minute) 2

[0092]

Mtt	4-메틸트라이틸
NCL 히트; NCL 풀	NCL은 간복성 결핵 환자로부터의 혈청(이는 문자 "L"로 설명됨)과 음성 대조군, 건강한 사람 대상체로부터의 혈청(이는 문자 "NC"로 설명됨)의 혼합물을 지칭한다.
NHS	N-하이드록시석신이미드. NHS 화학은, 예를 들면, 항체의 유리 아미노기에 테트라진을 부착하는데 사용될 수 있다(van Buggenum, Gerlach, Mulder (2016) Scientific Reports. 6:22675.
핵산	용어 "핵산"은 단일 핵산 분자, 또는 개질된 핵산, 예를 들면, 형광성 태그를 갖는 핵산을 지칭할 수 있다. 또한, 용어 "핵산"은 더 긴 폴리뉴클레오타이드 내의 뉴클레오타이드의 개별적인 인접한 구간을 지칭하는데 사용될 수 있다. 여기서, 용어 "핵산"은 이것이, 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드가 프라이머-결합 부위인 제1 핵산, DNA 바코드 모듈인 제2 핵산, 및 합성의 다단계 경로에서 단계 번호를 동정하는 제3 핵산을 포함하는 경우와 같이, 더 긴 폴리뉴클레오타이드 내의 이러한 개별적인 구간을 지칭하는 것을 더 편리하게 만든다.
OP	올리고 쌍. 올리고 쌍은 슬립형(slipped) 헤테로듀플렉스의 형태를 갖는 시약, 예를 들면, 슬립 헤테로듀플렉스의 수성 용액을 지칭할 수 있다.
직교 바코드 핵산	"직교"인 DNA 바코드는 각각의 DNA 바코드 모듈이 비드 상의 상이한 부착 부위를 차지하는 형태를 갖는다. 직교 형태를 갖는 DNA 바코드를 함유하는 경우, 화합물의 DNA 바코드의 모든 정보의 획득은 각각의 부착된 DNA 바코드 모듈을 개별적으로 시퀀싱하는 것을 필요로 한다. 다시 말해서, "직교" 핵산 바코드의 경우, DNA 바코드를 구성하는 DNA 바코드 모듈의 각각 및 모두는 동일한 비드 상의 상이한 부착 부위에 분산된다.
OSu(OSu는 NHS와 동일하다)	N-하이드록시석신이미드
OXYMA	에틸 2-사이아노-2-(하이드록시아미노)아세테이트
평행적	용어 "평행"은 화학적 단량체가 비드에 하나씩 공유적으로 부착되어 비드-결합된 화합물을 생성하고, 핵산 바코드 모듈이 또한 동일한 비드에 하나씩 공유적으로 부착되어 비드-결합된 핵산 바코드를 생성하는 상황을 지칭한다. 각각의 화학적 단량체를 부착하는 화학적 반응은 각각의 핵산 바코드 모듈을 부착하는 반응(화학적 또는 효소적)과 정확히 동시에 수행되지는 않는다. 대신에, 이들 2개의 반응은 엇갈리고, 따라서 평행 합성은 먼저 화학적 단량체의 부착 후, 상응하는 핵산 바코드 모듈의 부착을 포함한다. 대안적으로, 엇갈린 반응은 먼저 핵산의 부착 후, 상응하는 화학적 단량체의 부착을 포함할 수 있다. 이러한 상황에서 상응하는 것은 각각의 핵산 바코드 모듈이 평행

[0093]

	합성의 동일한 라운드에서 부착되는 화학적 단량체를 동정하는 역할을 하는 것이다.
PCL	광 절단 가능한 링커
PEG	폴리에틸렌 글리콜
접동	본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "접동"은 조사될 것인 소분자 화학적 화합물, 캡타이드, 항체, 거대고리 또는 세포 또는 검정에서 영향을 미치는 임의의 분자 라이브러리를 모두 포함하는데 대체적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "접동 비드" 및 "화합물 비드"는 접동을 함유하는 비드뿐만 아니라 접동의 합성 이력 및/또는 접동의 화합물을 동일성을 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드 바코드를 나타내는데 상호교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화합물-바코드" 및 "접동-바코드"는 접동 비드에 부착된 화합물의 합성 이력 및/또는 동일성을 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드 태그를 나타내는데 상호교환적으로 사용된다.
PDMS	폴리다이메틸실록산
qPCR	정성적 중합효소 연쇄 반응
피코웰	본 개시내용에 대한 임의의 제한을 암시하지 않으면서, 용어 "피코웰"은 피코웰의 어레이, 예를 들면, 50,000개의 피코웰, 100,000개의 피코웰, 200,000개의 피코웰, 500,000개의 피코웰 등을 함유하는 플레이트에서 웰 또는 공동을 나타내는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 피코웰의 부피(피코웰에 있을 수 있는 임의의 비드의 부피를 포함하지 않음)는 약 0.2 피코리터(pL), 약 0.5pL, 약 1.0pL, 약 2.0pL, 약 5.0pL, 약 10pL, 약 20pL, 약 30pL, 약 40pL, 약 50pL, 약 75pL, 약 100pL, 약 200pL, 약 300pL, 약 400pL, 약 500pL, 약 600pL, 약 700pL, 약 800pL, 약 1000pL, 약 10,000pL, 약 100,000pL, 약 1,000,000pL, 또는 임의의 상기 2개의 값에 의해 정의된 부피 범위, 예를 들면, 약 0.5 내지 2.0pL이다. 임의의 "나노웰" 및 "마이크로웰"에 대한 부피는 상기와 같이 설정될 수 있다(용어 "피코"가 나노 또는 마이크로로 대체되는 것을 제외하고). 달리 명백하게 또는 문맥에 의해 명시되지 않는 한, 본 개시내용은 (나노웰 또는 마이크로웰보다는) 피코웰을 나타낸다.
RAM	링크 아마이드
RCA	회전환 중폭
RT	실온
SPS	고체상 합성
슬립형 헤테로듀플렉	슬립형 헤테로듀플렉스 구조는 ssDNA의 제1 가닥 및 ssDNA의 제2 가닥의 형태를 갖고, 여기서 ssDNA의 제1 가닥의 5'-말단에서 12개의 뉴클레오타이드는

[0094]

스 구조	ssDNA의 제2 가닥의 5'-말단에서 12개의 뉴클레오파이드에 상보적이고, 여기서 ssDNA의 제1 가닥은 ssDNA의 제2 가닥에 각각의 5'-말단을 포함하는 12개의 상보적 염기 쌍을 통해 결합된다. "12개"라는 숫자는 순수하게 예시적이며, 제한적이지 않다. 대안적으로, 슬립형 혜테로듀플렉스 구조는 ssDNA의 제1 가닥의 3'-말단 및 ssDNA의 제2 가닥의 3'-말단에서 상보적 염기 쌍을 통해 혼성화된 듀플렉스로서 유지될 수 있다. 용어 "슬립형 혜테로듀플렉스 구조"는 대안적으로 "엇갈린 혜테로듀플렉스 구조"로 지칭될 수 있다. 용어 "슬립형"은 올리고[C]가 올리고[G]에 혼성화되는 경우, 또는 올리고[A]가 올리고[T]에 혼성화되는 경우에 형성된 듀플렉스를 갖는 경우와 마찬가지로 혜테로듀플렉스가 미끄럽다(위치를 이동할 수 있다)는 것을 암시하지 않는다
TB	결핵
TBE	트리스 보레이트 EDTA
TBAI	테트라부틸 암모늄 아이오다이드
TBTA	트리스[(1-벤질-1H-1,2,3-트라이아졸-4-일) 메틸] 아민
TCEP	트리스(2-카복시에틸)포스핀. 이황화 결합을 절단할 수 있는 시약.
TCO	트랜스-사이클로옥тен
TEAA	트라이에틸암모늄 아세테이트
TEV	타바코 에치 바이러스(Tobacco Etch Virus) 프로테아제
프로테아제	
TFA	트라이플루오로아세트산
TID	3-(트라이플루오로메틸)-3-(m-아이오도페닐)다이아지린
TIPS	트라이아이소프로필 실란
TM	용융 온도
TMF	2,4,6-트라이메틸페리딘
QSY7	크산틸륨, 9-[2-[[4-[[2,5-다이옥소-1-페롤리딘일]옥시]카보닐]-1-페페리딘일]설포닐]-3,6-비스(메틸페닐아미노)-, 클로라이드(CAS 번호 304014-12-8)
TAMRA	5(6)카복시테트라메틸 로다민

[0095]

시약, 키트, 효소, 버퍼, 살아있는 세포, 장치 등이 획득될 수 있다. 예를 들면, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재); 오크우드 케미칼(Oakwood Chemical, 미국 사우스캐롤라이나주 에스틸 소재); 에피센터(Epicentre, 미국 위스콘신 주 매디슨 소재); 인비트로젠(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재); 프로메가(ProMega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재); 라이프 테크놀로지스(Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재); 씨모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific, 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재); 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs, 미국 매사추세츠주 임스위치 소재); 어메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection: ATCC, 미국 버지니아주 머내서스 소재); 벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스); 일루미나(Illumina, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재); 10X 게노믹스(10X Genomics, 미국 캘리포니아주 플래전턴 소재)를 참조한다.

[0097]

바코드된 젤 비드, 바코드되지 않은 젤 비드, 및 미세유체 칩은 1CellBio(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)로부터 이용 가능하다. 유세포 분석을 위한 지침 및 장치가 이용 가능하다(예를 들면, FACSCalibur®, BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 산호세 소재), BD FACSaria II® 사용자 안내서, 부분 번호 643245, Rev.A, 2007년 12월, 344 페이지 참조).

[0098]

"표지화된" 조성물은 직접적으로 또는 간접적으로, 분광분석적, 광화학적, 형광분석적, 생화학적, 면역화학적, 동위원소적, 또는 화학적 방법뿐만 아니라 플라스몬 나노입자를 포함하는 방법에 의해 검출 가능하다. 예를 들면, 유용한 표지는, 예를 들면, 효소 연결 면역검정, 또는 플로렛(fluorette)에서 사용되는 바와 같이, ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹⁴C, ³H, ¹²⁵I, 안정한 동위원소, 에피토프 태그, 형광성 염료, 라만 태그, 전자 밀도 시약, 기질, 또는 효소를 포함한다(Rozinov and Nolan (1998) Chem. Biol. 5:713-728).

상세한 설명에 대한 목차

(I) 비드

- [0101] (II) 하나의 비드 하나의 화합물(OBOC)
- [0102] (III) 핵산의 비드에 대한 커플링
- [0103] (IV) DNA 바코드
- [0104] (V) 화학적 화합물의 비드에 대한 커플링
- [0105] (VI) 화학적 단량체를 서로 커플링시켜 화합물을 제조
- [0106] (VII) 스플릿 앤드 풀 합성 및 평행 합성
- [0107] (VIII) 피코웰의 제조
- [0108] (IX) 비드의 피코웰로의 증착
- [0109] (X) 피코웰에서 비드-결합된 핵산의 시퀀싱
- [0110] (XI) 비드로부터 비드-결합된 화합물의 방출
- [0111] (XII) 화합물에 대한 생화학적 검정
- [0112] (XIII) 화합물에 대한 세포 기반의 검정
- [0113] (XIV) 세포에 대한 섭동-반응 분석
- [0114] (I) 비드
- [0115] 본 개시내용의 방법 및 조성물은 비드, 예를 들면, 단일크기 텐타겔® M NH₂ 비드(10, 20, 30 마이크로미터 등 의 직경), 표준 텐타겔® 아미노 수지(90, 130 마이크로미터 등의 직경), 텐타겔 매크로비즈(Microbeads)® (280-320 마이크로미터의 직경)(상기는 모두 라프 폴리미어(Rapp Polymere, 독일 72072 튀빙겐 소재)로부터 이용 가능함)를 사용한다. 이들은 폴리에틸렌 글리콜에 의해 유도된 폴리스타이렌 코어를 갖는다(Paulick et al (2006) J. Comb. Chem. 8:417-426). 텐타겔® 수지는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 그 위에 그래프팅되는 저 가교 결합 폴리스타이렌 매트릭스로 구성되는 그래프팅된 공중합체이다. 따라서, 본 개시내용은 DNA 바코드 및 화합물 중 하나 또는 둘 다를 포함하도록 개질된 비드 또는 수지를 제공하고, 여기서 개질되지 않은 비드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 그 위에 그래프팅되는 저 가교결합 폴리스타이렌 매트릭스로 구성되는 그래프팅된 공중합체의 형태를 갖는다.
- [0116] 텐타겔®은 "작용화된 가교결합 폴리스타이렌 상에 고정화된 20 킬로 돌턴 이하의 분자 질량의 PEG 사슬을 특징으로 하고, 약 2000 내지 3000 돌턴의 PEG 사슬을 갖는 그래프트 공중합체가 운동을, 이동성, 팽창성 및 수지 용량의 관점에서 최적인 것으로 입증되었다"(Rapp Polymere, 독일 소재). 따라서, 본 개시내용은 약 2000 내지 3000 돌턴의 PEG 사슬을 갖는 그래프트 공중합체의 형태를 갖는 비드 또는 수지를 제공한다. 팽창과 관련하여, 코멜라스 등(Comellas et al)은, 예를 들면, DCM, DMF, 메틸 알코올, 물, 또는 효소 검정에 사용된 버피 중에 침지되는 경우, 비드가 팽창하는 능력을 측정하기 위한 지침을 제공한다(Comellas et al (2009) PLoS ONE. 4:e6222(12 pages)). 팽창 단위는 비드의 그램당 밀리리터이다.
- [0117] 대안적인 비드 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 PEG 스페이서가 알킬 연결기를 통해 폴리스타이렌 골격에 부착되는 수지를 사용하고, 여기서 수지는 마이크로구형 및 단일크기(텐타겔® M 수지)이다.
- [0118] 또한 대안적인 비드 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 알킬 연결기를 통해 폴리스타이렌 골격에 부착된 PEG 스페이서를 갖는 수지를 사용하고, 여기서 수지 유형은 2개의 이작용성 종으로, 즉, 비드의 외부 표면 상의 반응성 부위가 비드의 내부 부피에서 반응성 부위에 대하여 직교로 보호되는 제1, 표면 개질된 수지, 및 절단 가능한 및 절단 가능하지 않은 리간드가 이러한 지지체에서 존재하는, 후속적인 절단을 위하여 개발된 제2, 혼성체 수지(텐타겔® B 수지)로 존재한다.
- [0119] 게다가, 또 다른 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 PEG 스페이서가 알킬 연결기를 통해 폴리스타이렌 골격에 부착되는 수지를 사용하고, 여기서 매크로비드 수지는 매우 큰 입자 직경 및 높은 수용력을 나타낸다(텐타겔® MB 수지). 또한, 본 개시내용은 PEG 스페이서가 벤질 에터 연결기를 통해 폴리스타이렌 골격에 부착되는 수지를 사용한다. 이러한 수지는 면역화 과정 PEG 개질된 유도체의 합성에 사용될 수 있다(PEG 부착된 PEG-개질된 화합물)(텐타겔® PAP 수지).

- [0120] 계다가, 비드는 하이포겔(HypoGel)® 200 수지일 수 있다. 이러한 수지는 저 가교결합 폴리스타이렌 매트릭스 상에 그래프팅된 올리고에틸렌 글리콜(MW 200)의 복합체이다(Fluka Chemie GmbH, 스위스 CH-9471 부호 소재).
- [0121] 몇몇 실시형태에 있어서 PEG 링커가 없는 아미노 작용화된 폴리스타이렌 비드, 예를 들면, 단일크기 폴리스타이렌 M NH₂ 마이크로비드(5, 10, 20 마이크로미터 등의 직경, 또한 라프 폴리미어(독일 72072 튜빙겐 소재))가 사용될 수 있다.
- [0122] 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 비드에 대한 공유 결합 없이, 비드 내의 기공 또는 챔버 또는 터널 내에 캡슐화될 수 있다. 화합물은 다양한 수단에 의해 비드의 이러한 기공 내로 확산되거나 밀어넣어질 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 화합물은 확산에 의해 비드 내로 로딩될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 고온을 사용하여 비드를 팽창하게 하고 화합물을 비드 내에 로딩할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 고압을 사용하여 화합물을 비드로 밀어넣을 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 비드를 팽창시키는 용매를 사용하여 화합물을 비드 내에 로딩할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 진공 또는 저압을 사용하여 화합물을 비드 내로 분할할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 약하거나 힘찬 물리적 교반을 사용하여 화합물을 비드 내로 로딩할 수 있다.
- [0123] 화합물이 공유 결합 없이 비드 상에 로딩되는 이러한 실시형태에 있어서, 화합물은 확산에 의해 비드로부터 언로딩될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 비제한적인 방식으로, 온도, 압력, 용매, pH, 염, 베퍼 또는 세제 또는 이러한 조건의 조합을 사용하여 화합물을 이러한 비드 밖으로 언로딩할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 예를 들면, 가교결합되지 않고 중합된 비드에 의한, 비드의 물리적 완결성을 사용하여 이러한 비드 내에 함유된 화합물을 방출할 수 있다.
- [0124] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 임의의 비드, 및 비드-화합물 복합체, 또는 상기 비드 중 하나를 포함하는 임의의 방법을 배제할 수 있다.
- [0125] 본 개시내용의 비드는 또한 하기를 포함한다. 메리필드(Merrifield) 수지(클로로메틸폴리스타이렌); PAM 수지(4-하이드록시메틸페닐 아세트아미도 메틸 폴리스타이렌); MBHA 수지(4-메틸벤즈하이드릴아민); 브롬화 왕(Wang) 수지(알파-브로모프리오페오펜온); 4-나이트로벤조펜온 옥심(Kaiser) 수지; 왕 수지(4하이드록시메틸 펜옥시메틸 폴리스타이렌; PHB 수지(p-하이드록시벤질 알코올; HMPA 수지(4-하이드록시메틸 펜옥시아세트산); HMPB 수지(4-하이드록시메틸-3-메톡시 펜옥실 부탄산); 2-클로로트라이틸 수지; 4-카복시트라이틸 수지; 링크(Rink) 산 수지(4-[2,4-다이메톡시페닐]하이드록시메틸)펜옥시메틸); 링크 아마이드(RAM) 수지 "크노르(Knorr)" 수지(4-((2,4-다이메틸페닐)(Fmox-아미노)메틸)펜옥시알킬); PAL 수지(5-[4-(Fmoc-아미노)메틸-3,5-다이메톡시펜옥시]발레르아미도메틸 폴리스타이렌); 지베르(Sieber) 아마이드 수지(9-Fmox-아미노-잔탄-3-일-옥시메틸); HMBA 수지(하이드록시메틸 벤조산); 4-설파모일벤조일 수지 "케너의 안전 장치(Kenner's safety catch)" 수지(N-(4-설파모일벤조일)아미노메틸-폴리스타이렌); FMP-수지(4-(4-포밀-3-메톡시펜옥시)-에틸)(문헌[ChemFiles Resins for Solid-Phase Peptide Synthesis Vol. 3(32 pages] 참조)(Fluka Chemie GmbH, 스위스 CH-9471 부호 소재).
- [0126] 본 개시내용의 비드는 화합물의 수동적인 캡슐화제(화합물에 대한 공유적인 연결기 없이 화합물을 수동적으로 보유함)로서 사용되는 상기 비드를 더 포함하고, 하기를 더 포함한다: 작용화되지 않은 폴리스타이렌 비드; 실리카 비드; 알루미나 비드; 다공성 유리 비드; 폴리아크릴아마이드 비드; 산화티타늄 비드; 알기네이트 비드; 세라믹 비드; PMMA(폴리메틸메타크릴레이트) 비드; 멜라민 비드; 제올라이트 비드; 폴리락타이드 비드; 다이블록-공중합체 마이셀; 텍스트란 비드 등. 이 단락에 열거된 많은 비드는 마이크로스피어스-나노스피어스(Microspheres-Nanospheres, 미국 뉴욕주 10516 콜드스프링 소재)와 같은 판매 회사로부터 구입할 수 있다.
- [0127] 비드 이외에, 소낭 또는 소적은 또한 본 개시내용의 몇몇 실시형태에 있어서 화합물을 전달하는 비히클로서 사용될 수 있다. 지질, 다이블록-공중합체, 트라이-블록 공중합체 또는 물질을 형성하는 다른 막은 화합물이 로딩될 수 있는 내부 부피를 형성하는데 사용될 수 있다. 화합물은 세제의 첨가, 기계적 교반, 온도, 염, pH 또는 다른 수단에 의해 이러한 캡슐화된 부피로부터 방출될 수 있다. 유중수 소적 에멀션 또는 수중유 소적 에멀션은 검정 부피로 전달될 수 있는 화합물을 수동적으로 캡슐화하는 또 다른 수단이다.
- [0128] 화합물을 전달하는데 수동적인 캡슐화가 사용되는 모든 실시형태에 있어서, DNA 태그는 또한 수동적으로 로딩될 수 있거나, 대안적으로 DNA 태그는 비드, 소낭 또는 소적에 공유적으로 부착될 수 있다.
- [0129] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 화학물질 중 임의의 하나로 만들어지거나 상기 화학물질 중 임의의 하나의 유도체로 만들어진 임의의 비드 또는 수지를 배제할 수 있다.

- [0130] 실시형태에 있어서, 비드는 회전타원체일 수 있고, 약 0.1-1 마이크로미터, 약 1-5 마이크로미터, 약 1-10, 약 5-10, 약 5-20, 약 5-30, 약 10-20, 약 10-30, 약 10-40, 약 10-50, 약 20-30, 약 20-40, 약 20-50, 약 20-60, 약 50-100, 약 50-200, 약 50-300, 약 50-400, 약 100-200, 약 100-400, 약 100-600, 약 100-800, 약 200-400, 약 200-600, 약 200-800 마이크로미터 등의 직경을 갖는다.
- [0131] 상기 값 및 범위에 관하여 규정 가능한 비-회전타원체 비드가 또한 제공된다. 예를 들면, 측 중 하나, 또는 일차 차원 중 하나(예를 들면, 면) 또는 2차 차원 중 하나(예를 들면, 대각선)는 상기 범위의 값을 포함할 수 있다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 값 또는 범위 중 하나 이상에 속하는 회전타원체 비드(또는 비-회전타원체 비드)를 포함하는 임의의 시약, 조성물, 시스템, 또는 방법을 배제할 수 있다.
- [0132] **비드의 사슬.** 하나의 실시형태에 있어서, 제공되는 것은 복수의 비드 이랑체이고, 여기서 비드-이랑체는 서로 부착된 2개의 비드의 형태를 갖고, 여기서 하나의 비드는 복수의 부착된 핵산 바코드(직교 핵산 모듈, 또는 연접 핵산 모듈)를 함유하고, 다른 비드는 복수의 부착된 화합물을 함유하고, 여기서 모든 화합물은 서로 실질적으로 관련된다(또는 여기서 모든 화합물은 서로 화학 구조가 실질적으로 동일하다). 비드 이랑체는 부착된 화합물을 갖는 제1 비드를 제조하고, 별개로 부착된 핵산 바코드를 갖는 제2 비드를 제조한 다음, 2개의 비드를 함께 연결함으로써 합성될 수 있다. 하나의 측면에 있어서, 비드는 가역적인 링커에 의해 서로 부착되고, 또 다른 측면에 있어서, 비드는 비-가역적인 링커에 의해 서로 부착된다.
- [0133] **비드 투파성.** 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 투파성의 다양한 범위 또는 정도를 갖는 비드를 제공한다. 투파성은 용매에 의해 접근 가능한 비드의 부피의 퍼센트로서 측정될 수 있고, 여기서 측정 단위는 기공의 형태를 갖는 비드의 표면의 퍼센트이거나, 여기서 측정 단위는 비드의 표면(및 외부 매질)과 유체 소통되는 채널, 네트워크, 또는 캠버의 형태를 갖는 비드의 내부의 퍼센트이다. 본 개시내용은 다공성 비드를 포함할 수 있거나, 대안적으로, 다공성 비드를 배제할 수 있다.
- [0134] 미국 특허 제9,062,304호(Rothberg)는 외부 및 내부 영역을 갖는 비드를 개시한다. 기재된 것은 "내부 표면(기공 표면)", 및 "적합한 기공은 ... 더 큰 문자를 배제할 것이다"는 것, 및 "내부 및 외부 표면의 상이한 기능화의 활용"의 선택사항 및 다양한 기공 직경, 및 중합체, 예를 들면, 폴리(스타이렌 셀론산) 및 폴리스타이렌이다. 문헌(Rothberg)의 도 1은 비드의 표면 및 비드의 기공의 사진을 제공한다. 미국 특허 제9,745,438호(Bedre)는 다공성 비드의 투파 전자 현미경 이미지를 제공한다. 미국 특허 제5,888,930호(Smith)는 다공성 비드의 단면의 주사 전자 현미경 사진을 제공한다. 기재된 것은 표면 상의 작은 기공 및 큰 기공 내부를 갖는 구형 비드이고, 여기서 비드는, 예를 들면, 폴리스타이렌, 폴리아크릴로나이트릴, 폴리카보네이트, 셀룰로스, 또는 폴리우레탄으로 만들어진다. 미국 특허 제5,047,437호(Cooke)는 표피 없는 표면을 갖는 구형 폴리(아크릴로나이트릴) 공중합체 기공 형태(도 1) 및 표면 상의 외부 표피를 갖는 비드(도 5)를 개시한다. 미국 특허 제4,090,022호(Tsao)는 셀룰로스 비드의 다공성 개구 및 내부 공극 공간을 개시한다.
- [0135] 상기 확인된 특허 각각은 모든 도면을 포함하여, 각각이 이의 전문이 참조로서 개별적으로 포함된 것과 마찬가지로, 이의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0136] 임의의 제한을 암시하지 않고, 비드 또는 미세입자의 외부 표면은 전체 비드 또는 미세입자를 탄성 필름으로 단단하게 랩핑(wrapping)함으로써 의해 결정될 수 있다. 비드 또는 미세입자는 사고 실험의 방식으로 랩칭될 수 있거나, 랩핑된 비드는 도면 또는 사진에 의해 도시될 수 있거나, 비드는 실제로 랩핑될 수 있다. 임의의 제한을 암시하지 않고, 비드의 외부 표면은 랩핑에 물리적으로 접촉하는 비드의 부분이다.
- [0137] 예를 들면, 본 개시내용은 표면적의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%를 차지하는 기공을 갖는 비드를 제공한다. 또한, 본 개시내용은 내부 채널 또는 네트워크의 부피가 비드의 총 부피의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%를 차지하고, 내부 채널 또는 네트워크가 비드의 외부 표면(및 외부 매질)과 유체 소통하는 비드를 제공한다.
- [0138] 게다가, 본 개시내용은 표면적의 1% 미만, 2% 미만, 5% 미만, 10% 미만, 15% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만을 차지하는 기공을 갖는 비드를 제공한다. 또한, 본 개시내용은 내부 채널 또는 네트워크의 부피가 비드의 총 부피의 1% 미만, 2% 미만, 5% 미만, 10% 미만, 15% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 80% 미만을 차지하고, 내부 채널 또는 네트워크가 비드의 외부 표면(및 외부 매질)과 유체 소통하는, 비드를 제공한다.
- [0139] **철심(Iron-core) 비드.** 본 개시내용은 철심 비드 또는 자성 비드를 포함한다. 이러한 비드는 이들을 하나의 반

응 용기로부터 또 다른 반응 용기로, 또는 하나의 컨테이너로부터 또 다른 컨테이너로 이동시키기 위하여 자석으로 조작될 수 있다. 로봇공학에 의한 조작은 이러한 비드를 사용하여 강화될 수 있다. 자성 비드의 제조 방법 및 용도는 문헌[Szymonifka and Chapman (1994) Tetrahedron Letters. 36:1597-1600; Liu, Qian, Xiao (2011) ACS Comb. Sci. 13:537-546; Alam, Maeda, Sasaki (2000) Bioorg. Med. Chem. 8:465-473]으로부터 이용 가능하다.

[0140] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 임의의 비드, 또는 임의의 비드 집단을 배제할 수 있고, 여기서 비드 또는 집단은 상기 값 또는 범위 중 하나를 만족한다.

비드로의 화합물 로딩

[0142] 많은 실험에서 미리 합성된 화합물을 비드로 로딩하는 것이 유리하고, 여기서 비드는 화합물을 검정으로 전달하기 위한 비히클로서 사용될 수 있다. 약물을 생물학적 표본으로 전달하는데 사용되는 많은 표준 기술은 화합물을 검정으로 전달하기 위하여 개조될 수 있다(문헌[Wilczewska et al (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacological Reports. 64:1020-1037, Kohane DS (2007) Microparticles and nanoparticles for drug delivery. Biotechnol. Bioeng. 96: 203-209, Singh et al (2010) Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. Res Pharm Sci. 5: 65-77] 참조).

[0143] 미리 합성된 화합물이 비드로 로딩되는 이러한 실시형태에 있어서, 화합물은 전통적인 96, 385 또는 1536 웰 마이크로타이터 플레이트에 보유될 수 있다. 이러한 플레이트에 비드를 첨가할 수 있고, 화합물은 그 안으로 확산 또는 다른 능동적인 로딩 방법에 의해 로딩된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 함침을 위하여 선택된 비드는 모액으로부터 제거될 때 화합물의 즉각적인 비움을 방지하는 기공 크기 또는 침투 기하학을 갖는다. 비드의 확산은, 필요한 경우, 열, 압력, 첨가제 또는 다른 자극제에 의해 강화될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물-함유된 비드는 외부 충동에 의해 촉발될 때까지 내부 내용물의 누출을 방지하는 방식으로 캡핑될 수 있다. 다공성 비드의 외부를 캡핑하는 하나의 방법은 비드-화합물 용액으로 지질 또는 양친매성 분자를 첨가하여, 비드의 표면에 노출된 공동이 양친매성 분자에 의해 형성된 이중층에 의해 밀봉되는 것을 포함한다. 소낭이 약물 담지된 비드와 혼합될 수 있는 몇몇 실시형태에 있어서, 교반하에, 소낭 파열 및 막은 약물 함유된 비드의 표면상에 재형성되고, 따라서 이들을 밀봉한다. 이러한 비드 밀봉을 수행하는 방법이 기재된다(문헌[Tanuj Sapra et al (2012) Nature Scientific Reports Volume 2, Article No.: 848] 참조). 실리카 비드를 밀봉하는 추가의 실험 프로토콜은 문헌[Sandia Laboratories by Ryan Davis et al, Nanoporous Microbead Supported Bilayers: Stability, Physical Characterization, and Incorporation of Functional Transmembrane Proteins, SAND2007-1560]에 의해 발표 보고서에서 이용 가능하고, 문헌[Hui Zheng et al (bSUM: A bead-supported unilamellar membrane system facilitating unidirectional insertion of membrane proteins into giant vesicles) in J. Gen. Physiol. (2016) 147: 77-93]에 기재된 방법 bSUM이 이용 가능하다.

[0144] 미리 합성된 화합물을 이용하는 몇몇 실시형태에 있어서, 비드는 적절한 시약의 첨가에 의해, 예를 들면, 지질 또는 다이-블록(di-block) 공중합체의 첨가 후 교반에 의해 생성되고, 이로써 이들의 내부 또는 이중층 막 내에 화합물을 함유한 소낭이 형성된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 미세유체 T 접합부를 통해 밀어내져 유성상 중에 수성 상 소적을 생성할 수 있고, 여기서 화합물은 수성 상 내에 또는 수성 상과 유성 상 사이의 계면에 함유된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 형성된 소적은 추가로 중합되어 하이드로겔을 생성할 수 있고, 이는 중합되지 않은 수성 상 소적보다 취급하는데 더 단단하고 안정하다. 소적 기반의 캡슐화 및 검정은 문헌[Oliver et al (2013) Droplet Based Microfluidics, SLAS Discovery Volume: 19 issue: 4, page(s): 483-496]에 개시된다. 졸-겔 캡슐화 공정은 또한 비드 내에 화합물을 캡슐화하는데 사용될 수 있다. 졸-겔 비드의 형성은 문헌[Sol-gel Encapsulation of Biomolecules and Cells for Medicinal Applications, Xiaolin Wang et al (2015) Current Topics in Medicinal Chemistry. 15: 223]에 기재된다.

하나의 비드 하나의 화합물(OBOC)

[0146] 조합식 라이브러리를 제조하는데 사용되는 방법은 세 단계, 즉, (1) 라이브러리를 제조하는 단계; (2) 라이브러리에서 화합물을 스크리닝하는 단계, 및 (3) 화합물, 예를 들면, 화합물 모두 또는 스크리닝에 의해 흥미로운 결과를 제공하는 화합물 단독의 구조를 결정하는 단계를 포함한다(문헌[Lam et al (1997) The One-Bead-One-Compound Combinatorial Library Method. Chem. Rev. 97:411-448] 참조). 비드-결합된 합성을 통한 화합물 합성의 이점은 화합물이 "스플릿-앤파-풀" 방법에 의해 신속하게 만들어질 수 있다는 것이다.

[0147] 인코딩 전략과 조합된 OBOC. OBOC의 또 다른 특징은 각각의 비드가 화합물뿐만 아니라 인코딩 전략도 포함할 수

있다는 것이다. 비드-결합된 핵산이 동일한 비드에 결합된 화합물을 인코딩하는데 사용되는 경우, 용어 "인코딩"은 유전자 코드를 지칭하지 않는다. 대신에, 용어 "인코딩"은 사용자가 각각의 수천 개의 짧은 핵산 서열과 단일 비드-결합된 화합물을 관련시키는 범례, 키, 또는 코드를 보유하는 것을 의미한다.

[0148] 핵산이 연관된 화합물을 인코딩하는 경우, 비드-결합된 화합물 및 비드-결합된 핵산을 갖는 비드 사용의 극적 변이는 다음과 같다. 극적 변이는 접합체의 라이브러리를 제조하는 것이고, 여기서 라이브러리의 각각의 맴버는 소분자와 DNA 잔기의 합의 접합체 형태를 갖고, 여기서 DNA 잔기는 소분자를 인코딩한다. 이러한 접합체는 가용성이고 비드-결합된 것이 아니다. 세포 또는 정제된 단백질로 스크리닝한 후, 접합체는 세포 또는 정제된 단백질에 결합된 채로 남아 있고, 따라서 접합체를 단리하는 것 및 최종적으로 접합된 핵산을 시퀀싱함으로써 화합물을 동정하는 것을 가능하게 한다(문헌[Satz et al (2015) Bioconjugate Chemistry. 26:1623-1632] 참조).

[0149] 여기서, 대부분의 이러한 특허 문서에서와 같이, 용어 "인코딩하는"은 유전자 코드를 지칭하지 않고, 그 대신에 조사자가 이에 부착된 화합물의 특정하고 공지된 구조를 나타내기 위하여 특정한 핵산 서열을 사용한다는 사실을 지칭한다.

[0150] DNA 바코드의 사용과 같은 인코딩 전략을 사용하는 것의 대안으로서, 양성 스크리닝(따라서 양성 스크리닝의 화합물을 나타내는) 비드는 비드-결합된 화합물을 동정하기 위하여 에드먼(Edman) 분해 또는 질량 분석법의 대상이 될 수 있다(문헌[Shih et al (2017) Mol. Cancer Ther. 16:1212-1223] 참조). 비드-결합된 화합물이 웨타이드인 경우, MALDI 질량 분석법은 양성-스크리닝 웨타이드 화합물의 서열의 직접적인 결정을 위하여 사용될 수 있다. 동시 절단 및 이온화가 레이저 조사하에 발생하기 때문에 시퀀싱의 안내가 가능하다(Song, Lam (2003) J. Am. Chem. Soc. 125:6180-6188).

[0151] 조합식 라이브러리의 스플릿-앤드-풀 합성을 수행하는데 한가지 좋은 점은 모든 화합물이 공통의 모티프를 공유하도록 제조될 수 있다는 점이다. 이러한 전략은 "화합물의 라이브러리보다는 모티프의 라이브러리의 생성"으로 기재되었다(문헌[Sepetov et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:5426-5430; Lam et al, 상기 참조, at 418] 참조).

[0152] 큰 비드의 전형적인 예를 제공하기 위하여, 비드는 직경이 0.1 mm일 수 있고, 동일한 화합물의 약 10^{13} 개의 카페를 보유할 수 있다(Lam et al, 상기 참조). 비드-결합된 화합물의 라이브러리의 제조 후, 각각의 비드는 개별적인 검정에서 사용될 수 있고, 여기서 검정은 생화학적 활성 또는, 대안적으로, 결합 활성을 측정한다. 검정은 "비드 위의" 검정일 수 있거나, 대안적으로, 화합물은 비드로부터 절단되고 용액 상 검정에서 사용될 수 있다(Lam et al, 상기 참조).

[0153] 임의의 유형의 비드의 파라미터는 주어진 검정 배지에서 팽창되는 이의 경향, 비드의 중합체가 소수성인지 친수성인지 여부, 각각의 화합물의 부착을 위한 비드 상의 부착 부위의 동일성, 비드의 표면으로부터 각각의 화합물의 일부 분리를 제공하기 위하여 스페이서, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 사용되는지 여부, 및 비드의 내부 부피를 포함한다.

[0154] 화합물을 비드에, 하지만 비드의 소수성 표면으로부터 멀리 떨어진 거리에서, 부착할 필요성에 관하여, 문헌 [Lam et al, 상기 참조]은 폴리옥시에틸렌-그래프팅된 스타이렌(텐타겔®)이 작용화 가능한 기가 폴리옥시에틸렌 사슬의 말단에 있는 이점을 갖고, 따라서 소수성 폴리스타이렌으로부터 멀리 떨어져 있다는 것을 개시한다. 수용성 링커를 갖는 비드는 텐타겔 및 폴리다이메틸아크릴아마이드 비드(펩신(PepSyn)® 겔, Cambridge Research biochemicals, 영국 노스워치 소재)를 포함한다.

[0155] 내부 부피의 파라미터는 비드-결합된 DNA 바코드와 비드-결합된 화합물의 표적 사이의 상호작용을 방지할 필요가 있는 경우에 이점을 제공할 수 있다. 이러한 이점을 활용하기 위하여, 비드는 DNA 바코드가 비드의 내부에 위치하도록 제조될 수 있고, 대조적으로, 스크리닝되는 화합물은 비드의 표면에 부착된다(Lam et al, 상기 참조, 페이지 438-439). 내부 부피의 이러한 이점은 비드-결합된 화합물이 절단 가능한 링커에 의해 부착되는지 여부, 및 화합물의 검정이 절단 및 방출되는 화합물 상에서만 수행되는지 여부와는 무관할 수 있다.

[0156] 아펠 등(Appell et al)은 화학적 라이브러리의 합성 후, 활성 화합물을 검출하기 위한 스크리닝을 위한 스플릿 앤드 풀 비제한적인 예를 제공한다(Appell et al (1996) J. Biomolecular Screening. 1:27-31). 라이브러리 비드를 제1 마이크로웰 플레이트, 나노웰 플레이트, 또는 피코웰 플레이트 상의 웰의 어레이에서 각각의 웰에 하나씩 배치한다. 비드-결합된 화합물의 약 50%를 절단하고, 이들을 웰의 용액에 방출시키기 위하여, 비드를 빛에 노출한다. 그 다음, 방출된 화합물을 제2 마이크로웰 플레이트로 옮기고, 활성 화합물을 함유하는 웰을 검출하기 위한 검정을 수행하고, 이로써 제1 플레이트에서 어떤 비드가 활성인 비드-결합된 화합물을 함유하는지를 동

정한다. 그 다음, "일단 활성 [화합물]이 단일 비드로부터 동정되면, 비드를 회수하고, 판독하여 활성 화합물의 합성 이력 및 ... 구조를 수득한다"(Appell et al, 상기 참조).

[0157] 비드-결합된 화합물을 스크리닝하는 세포 기반의 스크리닝 검정에 있어서, 시 등(Shih et al)은 신규한 유형의 비드를 제공한다(Shih et al (2017) Mol. Cancer Ther. 16:1212-1223). 이러한 신규한 유형의 비드는 "난소암에 대한 합성 사멸 리간드"의 라이브러리의 멤버인 비드-결합된 화합물을 함유한다. 비드는 또한 비오틴으로 장식되고, 여기서 2개 이상의 화학물질이 첨가되어 샌드위치를 생성하고, 샌드위치는 세포의 비드에 대한 접착을 유지한다. 샌드위치는 **스트렙타비딘을 더한 비오틴-LXY30 복합체**를 포함한다. 이러한 샌드위치는 비드를 LXY30의 수용체에 연결시키고, 이는 세포 표면 상의 잘 알려진 단백질, 즉, 인테그린에서 일어난다. 문헌[Shih et al, 상기 참조]의 방법은 암 세포를 죽일 수 있는 신규한 분자("LLS2")의 발견을 야기한다. 상기 방법은 비드-결합된 화합물을 사용하고, 여기서 화합물은 세포에 결합한다(심지어 화합물이 여전히 비드-결합된 상태일지도). 초 등(Cho et al)은 유사한 하나의-비드-하나의-화합물 라이브러리를 생성하였고, 여기서 스크리닝되는 화합물은 (상기 기재된 샌드위치에 대한 어떠한 필요성 없이) 세포에 결합하기에 충분하였다(Cho et al (2013) ACS Combinatorial Science. 15:393-400). 문헌[Cho et al]의 목표는 암 세포에 의해 발현되는 인테그린에 결합하는 RGD-함유 웹타이드를 발견하는 것이었다. 상기 개시된 시약 및 방법은 본 개시내용에 유용하다.

핵산의 비드에 대한 커플링(직교형; 연접형)

[0159] 연접 바코드 및 직교 바코드의 주제를 지향하는 하나의 방식은 하나가 다른 것에 대하여 갖는 이점에 대해서 기재하는 것이다. 연접 바코딩에 대한 직교 바코딩의 이점은 다음과 같다. 성장하는 화학적 화합물의 각각의 단량체의 부착과 함께, 평행하게 부착되는 것은 DNA 바코드 모듈이다. 연접 바코딩과 함께, 임의의 주어진 모듈의 부착이 불완전한 경우(모든 부착 부위가 필요한 모듈과 성공적으로 커플링되지 않았다는 것을 의미함), 완성된 바코드의 서열은 정확하지 않을 것이다. 설명 "정확하지 않음"은 불완전한 커플링이 뭉치로부터 사라질 수 있는 덩어리가 완성된, 정확한 DNA 바코드인 것으로 추정되었다는 것을 의미한다는 것을 의미한다. 여기서, 완성된 바코드 서열은 모든 모듈의 부착 실패로 인한 실수를 함유할 것이다. 대조적으로, 직교 바코딩과 함께, 각각의 개별적인 모듈은 비드 상에 그 자체의 고유한 부착 부위에 공유 결합된다. 그리고 모듈이 비드 상의 주어진 부위에 부착되면, 더 이상 모듈은 이미 부착된 모듈에 연결되지 않을 것이다.

[0160] 본 개시내용은 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상의 감소, 및 부분적으로 합성된 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 위한 시약 및 방법을 제공한다. 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 부착 전에, 각각의 DNA 바코드 모듈은 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 형태를 가질 수 있고, 여기서 이러한 dsDNA는 DNA 교차-링커, 예를 들면, 미토마이신-C로 처리된다. 이의 dsDNA 형태로 DNA 바코드의 합성의 완료 후, 이러한 dsDNA는 ssDNA로 전환된다. DNA 가닥 중 하나가 유라실(U) 잔기를 갖고, 유라실 잔기의 위치에서 DNA의 절단이 유라실-N-글리코시다제에 의해 촉매 작용되는 dsDNA의 ssDNA로의 전환이 수행될 수 있다(2017년 9월 25일에 제출된 제62/562,905호의 도 5 참조. 제62/562,905호는 이의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 상기는 비드-결합된 화학적 화합물을 제조하는데 사용되는 시약에 의해 성장하는 DNA 바코드 상에 가해진 손상을 지칭한다.

[0161] 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상의 감소, 및 부분적으로 합성된 DNA 바코드에 대한 손상을 위한 또 다른 방법은 이중 가닥 DNA 형태의 DNA 바코드를 합성하는 것이고, 여기서 서로 부착되는 각각의 DNA 바코드 모듈은 dsDNA의 형태를 갖고, 여기서 두 가닥 각각은 DNA 헤드피스를 통해 안정화된다. 완성된 DNA 바코드의 최종적인 시퀀싱을 위하여, 가닥 중 하나를 DNA 헤드피스로부터 절단하고 제거한다. 상기는 비드-결합된 화학적 화합물(여기서 이러한 화학적 화합물은 화학적 라이브러리의 멤버이다)을 제조하는데 사용된 시약에 의해 성장하는 DNA 바코드 상에 가해지는 손상을 지칭한다.

[0162] 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상의 감소를 위한 또 다른 방법은 자기-조립하여 헤어핀을 형성하는 방식으로 DNA 바코드를 합성하는 것이고, 여기서 이러한 DNA 바코드는 헤어핀의 제1 프롱(prong)이 헤어핀의 제2 프롱을 어닐링하도록 자기-조립한다.

[0163] DNA 바코드가 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 형태를 갖도록 합성되는 경우, 용매, 예를 들면, DCM, DMF, 및 DMA는 DNA 바코드를 변성시킬 수 있다. 상기 방법 및 시약은 변성을 방지할 수 있다.

[0164] 상기 기재된 바와 같이, 용어 "DNA 바코드"는 이의 전체로 화학적 화합물을 동정하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭하고, 대조적으로 "DNA 바코드 모듈"은 화학적 화합물을 제조하는 단량체 중 오직 하나를 지칭할 수 있다.

[0165] 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상의 감소, 및 부분적으로 합성된 DNA 바코드에 대한 손상의 감소를 위한 또 다른 방법은 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 사용하고, 이러한 dsDNA의 말단을 7-아자-dATP 및 dGTP를 통해 밀봉하는

것이다.

[0166] 대안적인 실시형태에 있어서, 방법은 "연접 DNA 바코드"와 "직교 DNA 바코드" 사이의 중간체를 사용할 수 있고, 여기서 이러한 중간체는 DNA 바코드의 블록이고, 즉, 여기서 각각의 블록은 2개의 DNA 모듈을 함유하거나, 3개의 DNA 모듈을 함유하거나, 4개의 DNA 모듈을 함유하거나, 5개의 DNA 모듈 등을 함유한다(하지만 전장 화합물을 동정하는 모든 DNA 모듈을 함유하지는 않는다).

[0167] 도 1은 연접 구조의 비드의 예시적이고 비제한적인 다이어그램을 개시한다. 비드는 복수의 DNA 바코드(각각 DNA 바코드 모듈로 만들어짐) 및 복수의 화합물(각각 화학적 라이브러리 단량체로 만들어짐)을 함유한다. 쉽게 말하면, 용어 "DNA 바코드"는 "DNA 바코드 모듈"인 핵산 모두뿐만 아니라 일부 기능을 제공하는 모든 핵산을 포함하는 중합체를 지칭하는데 사용될 수 있다. 기능은 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위일 수 있거나, 기능은 비드-결합된 화합물의 화학적 합성에서 단계를 확인하는데 사용될 수 있다. 도 1은 또한 비드-결합된 화합물을 도시하고, 여기서 각각의 화합물은 몇몇 화학적 라이브러리 멤버로 만들어지고, 여기서 각각의 화학적 라이브러리 멤버는 사각형, 원형, 또는 삼각형으로 표시된다. 도 1은 1 내지 8의 연속적으로 번호가 표시된 각각의 DNA 바코드 모듈을 도시하고, 여기서 이러한 번호는 각각의 8개의 형상(사각형, 원형, 삼각형)에 상응한다. 명확성을 위하여, 기능을 제공하는(그리고 임의의 특정한 화학적 단위를 나타내거나 "인코딩"하지 않는) 핵산은 도면에 도시되지 않는다.

[0168] 도 2는 직교 구조의 비드의 예시적이고 비제한적인 실시형태를 개시한다. 비드는 복수의 DNA 바코드(각각 DNA 바코드 모듈로 만들어짐)를 함유하지만, 각각의 DNA 바코드 모듈은 비드 상의 별개의 연결 부위에 부착된다. 전체 DNA 바코드는 8개의 DNA 바코드 모듈로 구성되고, 도면에서 이는 1 내지 8번으로 번호가 표시된다. 특정한 DNA 바코드로부터의 정보가 판독된 다음, 동일한 비드에 결합된 화학적 화합물을 동정하는데 사용되는 경우, 별개로 부착된 DNA 바코드 모듈의 각각에 대하여 DNA 시퀀싱을 수행하여야 한다. 도 2에서, 비드는 또한 8개의 형상(원형, 사각형, 삼각형)으로 도시되는, 각각 8개의 유닛이 부착된, 복수의 부착된 화학적 화합물을 함유한다.

[0169] 도 2에서, 명확성을 위하여, 각각의 DNA 바코드 모듈에 부착된 기능성 핵산은 도시되지 않는다. 물론, 각각의 DNA 바코드 모듈은 완성된, 전장 화합물에서 화학적 라이브러리 단량체의 위치를 동정하는 핵산을 가질 필요가 있다. 도 2에 도시된 예에 있어서, 위치는 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 또는 제8일 필요가 있다.

[0170] 하나의 실시형태에 있어서, 화학적 단량체는 먼저 부착된 후, 그 다음, 상응하는 DNA 바코드 모듈이 부착된다. 대안적인 실시형태에 있어서, DNA 바코드 모듈은 먼저 부착된 다음, 상응하는 화학적 단량체가 부착된다. 또한, 때때로 "하나의 실시형태"를 사용하고 때때로 "대안적인 실시형태"를 사용하는 유기 합성의 과정이 뒤따를 수 있다. 또 다른 대안적인 실시형태에 있어서, 본 방법은 몇몇 DNA 바코드 모듈의 블록의 부착과 평행하게, 비드에 부착된 몇몇 화학적 단량체의 블록의 블록식(block-wise) 첨가를 제공한다.

[0171] 배제 실시형태에 있어서, 배제될 수 있는 것은 비드에 DNA 바코드 모듈의 화학적 단량체, 또는 화학적 단량체 및 DNA 바코드 모듈 둘 다의 블록식 첨가를 사용하는 시약, 조성물, 및 방법이다.

[0172] 이는 비드-결합된 화합물이 단량체를 "인코딩"하거나 동정하는 역할을 하는 핵산을 포함하는, 비드-결합된 폴리뉴클레오타이드에 존재할 수 있는 핵산에 관한 것이다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 "단계-특이적 DNA 시퀀싱 프라이머 부위"를 인코딩하는 핵산을 배제할 수 있다. 이러한 상황에서, 화합물에 나타나는 각각의 화학적 단량체에 대하여, 상응하는 DNA 바코드 모듈이 존재하고, 여기서 각각의 DNA 바코드 모듈은 적어도 하나의 상응하는 프라이머-결합 부위가 옆에 위치하고, 즉, "단계-특이적 DNA 시퀀싱 프라이머 부위"이다. 또한, 배제될 수 있는 것은 화합물의 화학적 합성에서 특정한 단계, 예를 들면, 단계 1, 단계 2, 단계 3, 또는 단계 4를 인코딩하거나 지정하는 핵산이다.

[0173] 게다가, 본 개시내용은 스페이서로서 기능하는 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들면, 스페이서는 폴리뉴클레오타이드 사슬을 따라, 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위인 제1 부위와 화학적 단량체를 동정하는 제2 부위 사이에, 거리를 생성할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 또 다른 핵산에 의해 제공된 정보를 반복하거나 확인하는 핵산을 사용할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 PCR 프라이머 결합 부위를 인코딩하는 핵산을 사용할 수 있다. PCR 프라이머 결합 부위를 갖는 폴리뉴클레오타이드는 2개의 PCR 프라이머 결합 부위를 갖고, 이를 부위 둘 다는 동일한 융점(PCR 프라이머가 PCR 프라이머 결합 부위에 어닐링될 때의 융점)을 갖도록 설계되기 때문에, PCR 프라이머 결합 부위는 시퀀싱 프라이머와 구별될 수 있다.

[0174] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 스페이서로서 기능하거나 스페이서로서 단독으로 기능하는 핵산을 배제 할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 또 다른 핵산에 의해 제공된 정보를 반복하거나 확인하는 핵산을 배제할 수

있다. 게다가, 본 개시내용은 PCR 프라이머 결합 부위로서 역할을 하는 핵산을 배제할 수 있고, PCR 프라이머가 아닌 프라이머에 대한 결합 부위로서 역할을 하는 핵산을 배제할 수 있다.

[0175] 추가로, 본 개시내용은 화학적 라이브러리가 만들어진 데이터를 확인하거나, 또는 특정한 화합물의 화학적 합성에서 단계를 확인하거나, 프라이머 어닐링 서열로서 역할을 하는 핵산을 배제할 수 있다.

[0176] **특정한 DNA 바코드 모듈에 대한 시퀀싱 프라이머의 전용.** 본 개시내용은 DNA 바코드 모듈 및 하나 이상의 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위를 함유하는 DNA 바코드를 제공한다. 각각의 DNA 바코드 모듈은 그 자체의 전용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 가질 수 있다. 대안적으로, 하나의 특정한 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 비드-결합된 DNA 바코드 상에 존재할 수 있는 바와 같이, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 연속 DNA 바코드 모듈의 시퀀싱을 위하여 사용될 수 있다.

[0177] 다음은 각각의 DNA 바코드 모듈이 그 자체의 전용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 갖는 상황을 기재한다. 본 개시 내용은 DNA 시퀀싱 프라이머에 결합할 수 있는 프라이머 결합 부위를 포함하는 비드-결합된 연접 바코드를 제공하고, 여기서 상기 프라이머 결합 부위는 제1 DNA 바코드 모듈, 제2 DNA 바코드 모듈, 제3 DNA 바코드 모듈, 제4 DNA 바코드 모듈, 제5 DNA 바코드 모듈, 및 제6 DNA 바코드 모듈 중 하나 이상의 시퀀싱을 안내할 수 있고, 여기서 프라이머 결합 부위는 제1 DNA 바코드 모듈과 프라이머 결합 부위 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제1 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에, 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제2 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에, 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제3 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에, 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제4 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에, 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제5 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에, 또는 사이에 다른 DNA 바코드 모듈 없이 제6 DNA 바코드 모듈에 대하여 3-프라임에 위치한다.

[0178] **인코딩 서열 및 인코딩 서열에 상보적인 서열.** 본 개시내용은 본 문서에서 상기 또는 다른 곳에 개시된 인코딩 서열 중 임의의 하나, 임의의 조합, 또는 모두를 포함할 수 있다. 배제 실시형태에 있어서, 배제될 수 있는 것은 본 문서에서 상기 또는 다른 곳에 개시된 인코딩 서열 중 임의의 하나, 임의의 조합, 또는 모두이다. 또한 포함될 수 있거나 배제될 수 있는 것은 본 문서에서 상기 또는 다른 곳에 개시된 인코딩 서열 중 임의의 하나, 임의의 조합, 또는 모두를 인코딩하는 이중 가닥 핵산이다.

직교형 DNA 바코드(비드 상의 별개의 위치에 부착된 각각의 DNA 바코드 모듈)

[0180] **직교형 비드의 합성.** 직교 합성에 의해, 각각의 DNA 모듈은 비드 상의 별개의 부위에 공유적으로 부착되고, 여기서 결과는 전체 DNA 바코드가 복수의 DNA 모듈에 의해 기여된다는 것이다. DNA 바코드가 직교 구조를 갖는 경우, DNA 바코드 모듈 중 어느 것도 서로 부착되지 않고, 대신에 DNA 바코드 문자 각각 및 모두는 특정한 DNA 바코드 모듈에 전용인 그 자체의 비드-부착 부위를 갖는다.

[0181] 각각의 DNA 바코드 모듈에 대하여 합성 단계 번호를 동정하는 핵산. 실시형태에 있어서, 직교 DNA 바코드는 화합물 합성의 제1 단계를 동정하는 짧은 핵산을 포함한다. 이러한 실시형태에 있어서, 제1 화학적 단량체 및 제1 DNA 바코드 모듈의 평행적 부착에 의해, 제1 DNA 바코드 모듈은 실제로 두 핵산의 이러한 복합체 형태를 갖는다: [제1 DNA 바코드 모듈]에 연결된 ["단계 1"을 의미하는 짧은 핵산]. 이러한 복합체의 모든 뉴클레오타이드는 서로 프레임 내에 있고 시퀀싱 검정에서 판독될 수 있지만, 제1 짧은 핵산은 스페이서 핵산을 통해 제1 DNA 바코드 모듈에 선택적으로 부착될 수 있다.

[0182] 다음은 직교 DNA 바코드의 상기 설명을 계속한다. 직교 DNA 바코드는 화합물 합성의 제2 단계를 동정하는 짧은 핵산을 포함한다. 이러한 실시형태에 있어서, 제2 화학적 단량체 및 제2 DNA 바코드 모듈의 평행적 부착에 의해, 제2 DNA 바코드 모듈은 실제로 두 핵산의 이러한 복합체의 형태를 갖는다: [제2 DNA 바코드 모듈]에 연결된 ["단계 2"를 의미하는 짧은 핵산]. 이러한 복합체의 모든 뉴클레오타이드는 서로 프레임 내에 있고 시퀀싱 검정에서 판독될 수 있지만, 제2 짧은 핵산은 스페이서 핵산을 통해 제2 DNA 바코드 모듈에 선택적으로 부착될 수 있다.

[0183] 상기 기재된 방법은 임의의 주어진 비드에 있어서 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 및 DNA 바코드 모듈의 마지막, 및 화학적 단량체의 마지막까지 반복된다. 상기 방법은 비드-결합된 DNA 바코드 및 화학적 화합물을 생성하기 위하여 스플릿-앤드-풀 합성을 사용할 경우에 뒤따를 수 있다.

[0184] 직교 구조는 연접 구조에 비하여 다음 이점을 제공한다. 연접 합성(하나의 연속 중합체에서 서로 부착된 모든 DNA 바코드 모듈)에 의해, 이는 임의의 중간체 커플링 단계의 합성을 달성하는데 실패하는 것이 최종적으로 완성되는 연접 DNA 바코드의 의미를 훼손시킬 수 있는 경우이다. 대조적으로, 직교 합성(비드 상의 전용 부위에

부착된 각각 및 모든 DNA 바코드 모듈)에 의해, 임의의 DNA 바코드 모듈의 부착 실패는 오직 비드 상의 빈 부착 부위만을 야기할 것이고, 임의의 다른 부착된 DNA 바코드 모듈의 의미를 훼손시키지 않을 것이다. 바람직한 실시형태에 있어서, 각각 부착된 DNA 바코드 모듈은 부착된 제2 핵산을 포함하고, 여기서 이러한 제2 핵산은 단계 (DNA 바코드 및 화학적 화합물의 평행적 합성 동안의 단계)를 동정한다.

[0185] 직교 합성에 있어서, 이는 사용될 비드 상의 모든 부착 부위(성장하는 화학적 라이브러리 멤버를 부착하기 위한 부위)에 대하여 허용 가능하다. 그러나, 직교 합성에 있어서, 화학적 반응은 비드 상의 부착 부위의 전체 집단이 많은 DNA 바코드 모듈 중 제1 부착과 함께 오직 부분적으로만 사용되도록 설계될 필요성이 있다. 다음은 직교 바코드의 화학적 합성 동안 사용되는 부위에 대한 임의의 제한을 제공한다. 비-개질 비드에 있어서, DNA 바코드 모듈을 부착하는데 이용 가능한 부위의 총 수는 100%이다.

[0186] 직교-구성의 비드(제1 DNA 바코드에 관하여)의 합성에 있어서 주어진 비드 상의 사용되는 부착 부위의 규모. 다음은 제1 DNA 바코드 모듈의 부착에 관한 것이다. 실시형태에 있어서, 제1 DNA 바코드 모듈의 부착의 경우, 비드 상의 DNA 바코드 부착 부위의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 또는 약 50%가 사용된다. 다른 실시 형태에 있어서, 비드 상의 DNA 바코드 부착 부위의 약 2% 미만, 약 5% 미만, 약 10% 미만, 약 20% 미만, 약 30% 미만, 약 40% 미만, 또는 약 50% 미만이 사용된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 제1 DNA 바코드 모듈의 부착의 경우, DNA 바코드 부착 부위의 2-4%, 2-6%, 2-8%, 2-10%, 2-12%, 2-14%, 2-16%, 2-18%, 2-20%, 10-20%, 10-25%, 10-30%, 10-35%, 10-40%이 사용된다.

[0187] 제한에 관하여, 특정한 DNA 바코드를 구성하는 DNA 바코드 모듈의 마지막을 부착하는 경우, 부위의 20% 미만이 사용되고, 부위의 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 80% 미만, 90% 미만, 95% 미만, 또는 98% 미만이 사용된다.

[0188] 배제 실시형태는 임의의 상기 값 또는 범위를 만족시키는 비드 또는 방법을 배제할 수 있다. 또한, 배제 실시형태는 임의의 상기 값 또는 범위를 만족시키는데 실패한 비드 또는 방법을 배제할 수 있다.

[0189] 다음은 각각이 DNA 바코드인 하나 이상의 핵산을 포함하는 종합체뿐만 아니라 핵산의 일부가 프라이머-어닐링 부위 또는 스페이서로서 역할을 하는 것과 같은 생화학적 기능을 갖고, 다른 핵산이 정보 기능을 갖고 DNA 바코드인, 2개 이사의 핵산을 포함하는 종합체에 관한 것이다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 소랄렌과 같은 DNA 가교결합체를 포함하는 DNA 바코드를 배제할 수 있다. 또한, 배제될 수 있는 것은 DNA 바코드 모듈보다 더 높은 용융 온도(또는 더 낮은 용융 온도)를 갖는 프라이머 결합 영역을 갖는 DNA 바코드이다. 이러한 온도는 단지 "더 높거나" "더 낮을" 수 있거나, 이는 적어도 2°C 높거나, 적어도 4°C 높거나, 적어도 6°C 높거나, 적어도 8°C 높거나, 적어도 2°C 낮거나, 적어도 4°C 낮거나, 적어도 6°C 낮거나, 적어도 8°C 낮다.

[0190] 또한 배제될 수 있는 것은 DNA 리가아제를 사용하는 DNA 바코드를 제조하는 방법이다. 또한, 배제될 수 있는 것은 헤어핀(ssDNA의 한 부분이 동일한 ssDNA의 다른 부분에 혼성화되도록 루프형으로 구부러진 ssDNA)을 포함하는 DNA 바코드 및 제조 방법이다. 추가로, 배제될 수 있는 것은 핵산 헤어핀을 갖는 조성물이고, 여기서 핵산 헤어핀은, 예를 들면, 화학적 링커와 공유적으로 가깝다. 게다가, 배제될 수 있는 것은 "헤드피스"에 직접적으로 또는 "헤드피스"에 간접적으로(DNA 바코드와 헤드피스 사이에 존재하는 하나 이상의 화학물질에 대한 공유 결합을 통해 간접적으로) 공유 결합된 DNA 바코드이다.

[0191] 다른 배제 실시형태에 있어서, 배제될 수 있는 것은 완성된 DNA 바코드가 임의의 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 포함하지 않고 오직 단일 가닥 DNA(ssDNA)만을 포함하는 비드-결합된 DNA 바코드이다.

[0192] 직교 구성을 비드(제2 DNA 바코드에 관하여)의 합성에 있어서 주어진 비드 상의 부착 부위를 사용하는 정도. 다음은 제2 DNA 바코드 모듈의 부착에 관한 것이다. 실시형태에 있어서, 제2 DNA 바코드 모듈(직교 구성을 비드의 생성을 위한)의 부착의 경우, 비드 상의 잔여 유리 DNA 바코드 부착 부위의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 또는 약 50%가 사용된다. 다른 실시형태에 있어서, 비드 상의 잔여 유리 DNA 바코드 부착 부위의 약 5% 미만, 약 10% 미만, 약 20% 미만, 약 30% 미만, 약 40% 미만, 또는 약 50% 미만이 사용된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 제1 DNA 바코드 모듈의 부착의 경우, 잔여 유리 DNA 바코드 부착 부위의 2-4%, 2-6%, 2-8%, 2-10%, 2-12%, 2-14%, 2-16%, 2-18%, 2-20%, 10-20%, 10-25%, 10-30%, 10-35%, 10-40%이 사용된다.

[0193] 배제 실시형태는 임의의 상기 값 또는 범위를 만족시키는 비드 또는 방법을 배제할 수 있다. 또한, 배제 실시형태는 임의의 상기 값 또는 범위를 만족시키는데 실패한 비드 또는 방법을 배제할 수 있다.

[0194] 상기 실시형태뿐만 아니라 상기 배제 실시형태는 또한 제3 DNA 모듈 바코드의 부착, 또는 제4 DNA 모듈 바코드

의 부착, 또는 제5 DNA 바코드 모듈의 부착 등과 함께 방법에 적용될 수 있다.

[0195] 연접형 DNA 바코드(전체 사슬 또는 종합체가 비드 상의 하나의 위치에 부착되는, 하나 사슬 또는 종합체에 존재하는 모든 DNA 바코드 모듈).

비드-결합된 연접형 DNA 바코드의 합성. 본 개시내용은 비드가 복수의 연접형 DNA 바코드를 함유하고, 대부분 또는 거의 모든 복수의 연접형 DNA 바코드가 본질적으로 동일한 구조를 갖는 비드-결합된 연접형 DNA 바코드를 제공한다. 연접형 DNA 바코드는 하나 이상의 DNA 바코드 모듈을 함유할 수 있고, 여기서 전체 DNA 바코드에 따른 이러한 DNA 바코드 모듈의 순서화(비드-부착 말단으로부터 원위 말단으로)는 비드-결합된 연접형 DNA 바코드가 합성되는 시간과 동일한 순서를 갖는다. 또한, 전체 DNA 바코드에 따른 이러한 DNA 바코드 모듈의 순서화는 상응하는 화학적 라이브러리 단량체가 성장하는 비드-결합된 화합물에 커플링되는 시간과 동일한 순서를 갖는다.

연접형 DNA 바코드는, 이러한 순서로, 전체 연접형 DNA 바코드를 비드에 커플링하는데 사용되는 링커를 포함할 수 있다. 또한, 이는, 이러한 순서로, 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, 제3 DNA 바코드 모듈, 및 제3 어닐링 부위를 포함할 수 있다.

비드-결합된 DNA 바코드에서 시퀀싱 프라이머 혼성화 부위의 하나의 순서화. 시퀀싱 프라이머 혼성화 부위 실시 형태에 있어서, 연접형 DNA 바코드는, 이러한 순서로, 링커, 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 어닐링 부위, **제1 시퀀싱 프라이머 결합 부위**, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 어닐링 부위, **제2 시퀀싱 프라이머 결합 부위**, 제3 DNA 바코드 모듈, 제3 어닐링 부위, 및 **제3 시퀀싱 프라이머 결합 부위** 등을 포함할 수 있다.

비드-결합된 DNA 바코드에서 이것이 발생함에 따른, 시퀀싱 프라이머 혼성화 부위의 또 다른 순서화. 또 다른 시퀀싱 프라이머 혼성화 부위 실시형태에 있어서, 연접형 DNA 바코드는, 이러한 순서로, 링커, 제1 DNA 바코드 모듈, 제1 시퀀싱 프라이머 결합 부위, **제1 어닐링 부위**, 제2 DNA 바코드 모듈, 제2 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 제3 DNA 바코드 모듈, 제3 어닐링 부위, 및 **제3 시퀀싱 프라이머 결합 부위** 등을 포함할 수 있다.

용어 "어닐링 부위". 용어 "어닐링 부위"는 스플린트 올리고뉴클레오타이드(스플린트 올리고)의 부분인 어닐링 부위를 지칭하고, 또한 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드 상에 존재하는 상응하는 비드-결합된 어닐링 부위를 지칭하는데 사용된다. 숙련가는 스플린트 올리고 상의 "어닐링 부위"가 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드 상의 상응하는 "어닐링 부위"와 동일한 DNA 서열을 갖지 않는다는 것을 이해한다. 다시 말해서, 숙련가는 하나의 서열이 다른 서열에 상보적이라는 것을 이해한다. 그러므로, 이는 본원의 설명에 있어서 어닐링 부위가 둘 다 동일한 명칭을 갖는다는 것을 중요한 것이 아니다. 다시 말해서, 스플린트 올리고 상의 제2 어닐링 부위가 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드 상의 제2 어닐링 부위에 혼성화되는 것으로 개시된다는 것을 중요하지 않다.

블록의 합성. 대안적인 실시형태에 있어서, 성장하는 화합물 및 DNA 바코드 모듈의 성장하는 서열은 블록으로 합성될 수 있다. 예를 들면, 2-화학적 라이브러리 유닛을 구성하는 블록은 상응하는 2-DNA 바코드 모듈을 구성하는 블록의 부착과 평행하게 비드에 부착될 수 있다. 유사하게, 3-화학적 라이브러리 유닛을 구성하는 블록은 상응하는 3-DNA 바코드를 구성하는 블록의 부착과 평행하게 비드에 부착될 수 있다. 4개의 블록, 5개의 블록, 6개의 블록, 7개의 블록, 8개의 블록, 9개의 블록, 10개의 블록 등을 포함하는 블록 합성이 또한 제공된다. 이러한 블록 전달 실시형태는 각각 또한 본 개시내용에 의해 배제될 수 있다. DNA 바코드 단량체의 블록식 전달은 DNA 바코드 단량체의 연속적인 블록 각각을 수용하기 위한 고유한 부착점과 함께 직교로 수행될 수 있다. 대안적으로, DNA 바코드 단량체의 블록식 전달은 연쇄동일서열(concatemer) 구조(오직 하나의 연속 선형 중합체로서 발생하는 모든 DNA 바코드 모듈)를 제조하기 위하여 수행될 수 있다.

또한, 비드-결합된 DNA 바코드 및 비드-결합된 화합물과 평행으로 스플릿-앤드-풀 합성 동안, 블록에서 합성이 발생할 수 있다. 블록은 2개 이상의 화학적 라이브러리 단량체의 형태를 가질 수 있고, 블록은 2개 이상의 DNA 바코드 모듈의 형태를 가질 수 있다.

스플릿-앤드-풀 합성의 위치. 스플릿-앤드-풀 합성은 비드-결합된 화합물 및 비드-결합된 연접 DNA 바코드의 평행적 합성을 위하여 사용될 수 있다. 또한, 스플릿-앤드-풀 합성은 비드-결합된 화합물 및 비드-결합된 직교 DNA 바코드의 평행적 합성을 위하여 사용될 수 있다. 연접 DNA 바코드는 "스플린트 올리고" 방법을 통해 만들어질 수 있다. 대안적으로, 연접 DNA 바코드는 클릭 화학을 통해 만들어질 수 있다. 또한, "스플린트 올리고" 방법과 클릭 화학의 조합이 사용될 수 있다. 스플릿-앤드-풀 합성은 96 웰 플레이트에서 발생할 수 있고, 여기서 각각의 웰은 0.25 마이크로미터 필터로 만들어진 바닥을 갖는다. 정상 중력 조건하에, 수성 용액은 이러한 필터

를 통해 흐르지 않는다. 그러나, 예를 들면, 제1 수성 용액을 제2 수성 용액으로 교체할 필요가 있는 경우, 모든 96 웰로부터 임의의 수성 용액을 제거하기 위하여 흡입을 적용할 수 있다. 이러한 흡입 방법은 비드를 제1 시약 세트에 노출시키는 경우, 제1 시약 세트를 행글 필요가 있는 경우, 또는 제1 시약 세트를 제2 시약 세트로 교체할 필요가 있는 경우에 사용된다. 매니폴드는 96 웰 플레이트를 홀딩하는데 사용되고(Resprep VM-96 매니폴드), 펌프는 모든 필터의 하부에서 유체를 끌어내는데 사용될 수 있다(BUCHI Vac V-500 펌프). 필터 하부가 있는 96 웰 플레이트는 아크로프렙 어드밴스(AcroPrep Advance) 96 웰, $350\mu\text{l}$, $0.45\mu\text{m}$, REF 8048(Pall Corp., 멀티-웰 플레이트, 미국 미시간주 앤아버 소재)이다.

[0204] 프라이머 어닐링 부위로부터 DNA 바코드 모듈까지의 거리. 비드-결합된 DNA 바코드의 시퀀싱을 위하여, 즉, DNA 바코드, 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위인 제1 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 및 DNA 바코드 모듈인 제2 핵산을 형성하는 모든 DNA 바코드 모듈을 시퀀싱하기 위한 목표로, 제1 핵산은 제2 핵산의 바로 업스트림일 수 있다. 대안적으로, 제1 핵산은 제2 핵산의 업스트림일 수 있고, 여기서 제1 및 제2 핵산은 서로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 개 이상의 뉴클레오타이드, 또는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 또는 약 15개의 뉴클레오타이드만큼 분리된다. 분리는 단지 스페이서로서 제공되는 핵산에 의할 수 있거나, 대안적으로, 분리는 정보, 예를 들면, 유기 합성의 다단계 경로에서 단계 번호, 또는 화학적 화합물의 부류의 번호, 또는 비드-결합된 화합물에 의해 처리 가능할 수 있는 질환, 또는 일자, 또는 로트 번호 등을 인코딩하는 제3 핵산에 의할 수 있다.

클릭 화학을 사용하는 비드-결합된 연접 DNA 바코드의 합성

클릭 화학은 DNA 바코드의 단계식 합성에 사용될 수 있다. 여기서, 제1 DNA 바코드 모듈을 비드에 직접적으로, 또는 제1 DNA 바코드 모듈을 비드-결합된 링커에 커플링할 수 있다.

또한, 커플링될 수 있는 것은 제1 시퀀싱 프라이머 결합 부위인 제2 핵산에 부착된 제1 DNA 바코드 모듈인 제1 핵산의 형태를 갖는 폴리뉴클레오타이드이다. 이러한 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 운용자가 제1 DNA 바코드 모듈의 서열을 결정할 수 있게 한다.

또 다른 예를 제공하기 위하여, 비드-결합된 제1 DNA 바코드 모듈에 직접적으로 제2 DNA 바코드 모듈이 커플링될 수 있다. 대안적으로, 커플링될 수 있는 것은 제2 시퀀싱 프라이머 결합 부위인 제2 핵산에 부착된 제2 DNA 바코드 모듈인 제1 핵산의 형태를 갖는 폴리뉴클레오타이드이다. 이러한 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 운용자가 제2 DNA 바코드 모듈의 서열을 결정할 수 있게 한다. 제1 DNA 바코드 모듈에 대한 판독이 존재하는 경우, 결정될 수 있는 것은 이러한 DNA 바코드 모듈 둘 다의 서열이다.

또 다른 예를 제공하기 위하여, 커플링될 수 있는 것은 제1 DNA 바코드 모듈인 제1 핵산, 및 DNA 바코드 및 화합물의 다단계 평행적 합성에서 단계를 동정하는 제2 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다. 또한, 또는 대안적으로, 제2 핵산은 스플릿-앤드-풀 합성에 의해 제조되는 화합물의 일반적 부류를 동정할 수 있다. 또한, 또는 대안적으로, 제2 핵산은 스크리닝되는 화합물에 의해 처리되는 질환을 동정할 수 있다. 또한, 제2 핵산은 일자, 또는 화학자의 이름 등을 동정할 수 있다.

[0210] DNA 바코드를 합성하는 바람직한 방법은 하기에 나타나고, 여기서 반응의 동일한 주기를 각각의 DNA 바코드 모듈의 진행적인 부착과 함께 사용한다.

[0211] 단계 1. 부착된 TCO기를 갖는 비드를 제공한다. 실제 실시에서, 비드는 수백 또는 수천 개의 동일하게 부착된 TCO기를 가질 것이고, 여기서 각각의 TCO기는 비드 상의 상이한 부위에 부착된다. 또한, 실제 실시에서, 큰 수의 비드는 스플릿-앤드-풀 방법을 사용하여, 클릭 화학에 의해 동시에 개질될 것이다.

[0212] 단계 2. [테트라진]-[제1 DNA 바코드 모듈]-[아자이드]를 비드에 가하고, TCO기와 테트라진기가 축합되도록 한다. 결과는 하기 구조물이다: 비드-TCO-테트라진-제1 DNA 바코드 모듈-아자이드. 실제 실시에서, 이러한 구조물은 임의의 TCO 또는 테트라진을 포함하지 않고, 대신에 TCO와 테트라진이 축합될 때 생성되는 축합 생성물을 갖는다.

[0213] 단계 3. 임의의 세척

[0214] 단계 4. 아자이드를 캡핑하고 TCO 말단을 생성하기 위하여 DBCO-TCO를 가한다. 결과는 하기 구조이다:

비드-TCO-테트라진-제1 DNA 바코드 모듈-아자이드-DBCO-TCO

[0216] 단계 5. 임의의 세척

- [0217] 단계 6. 제2 DNA 바코드 모듈에 부착되는 하기 시약을 가한다. 부착은 성장하는 DNA 바코드의 원위 말단에 대한 것이다. 시약은 다음과 같다:
- [0218] 비드에 대한 [테트라진]-[제2 DNA 바코드 모듈]-[아자이드], 이는 TCO기와 테트라진기의 축합을 가능하게 한다. 결과는 하기 구조물이다:
- [0219] 비드-TCO-테트라진-제1 DNA 바코드 모듈-아자이드-DBCO-TCO-[테트라진]-[제2 DNA 바코드 모듈]-[아자이드]
- [0220] 상기 식은 점점 더 많은 DNA 바코드 모듈의 단계식 첨가를 위한 단계의 주기를 포함하고, 여기서 이러한 첨가는 점점 더 많은 화학적 단량체의 첨가와 평행적이다. 다른 곳에 기재된 바와 같이, 이러한 "평행적" 합성은 화학적 단량체를 부착한 후, 그 단량체를 동정하는 DNA 바코드 모듈을 부착하는 것, 또는 대안적으로, DNA 바코드 모듈을 부착한 후, 그 특정한 화학적 단량체에 의해 동정되는 화학적 단량체를 부착하는 것을 포함할 수 있다.
- [0221] **DNA 바코드의 클릭-화학 합성을 위한 화합물**
- [0222] 도 17은 DNA 바코드 모듈 및, 최종적으로, 전체 DNA 바코드의 합성 동안 테옥시시티딘 잔기(dC)를 연결하는데 적합한 화합물의 화학적 합성을 개시한다. 출발 물질은 N4-아세틸-2'-데옥시-5'-O-DMT 시티딘이다. 약어 "DMT"는 4,4-다이메톡시트라이틸을 나타낸다. 유기 합성의 이러한 다단계 경로의 최종 생성물은 시토신 잔기, 트라이포스페이트기, 및 리보스기의 3'-위치에 부착되는 프로파길기를 갖는다. 프로파길기는 클릭 화학에 사용되고, 여기서 이는 아자이드기와 축합되어 공유 결합을 생성한다. 축합 후, 결과는 잔여 화학물질(절대 핵산에서 자연적으로 존재하지 않음)이 수행된 클릭 화학으로부터 "흉터(scar)"로서 발생한다는 것이다. 이용 가능한 것은 클릭 화학에 의해 제조된 DNA 바코드의 합성에 의한 시퀀싱에 대하여 사용될 수 있는 DNA 중합효소이고, 여기서 DNA 중합효소는 흉터를 가로질러 이동할 수 있고, 여기서 흉터는 시퀀싱 오류를 야기하지 않는다. TBAI는 테트라부틸 암모늄 아이오사이드이다.
- [0223] **연접 구성 DNA 바코드의 합성**
- [0224] 하기 기재에서, DNA 바코드 모듈은 DNA 바코드를 생성하기 위하여 연달아 조립된다. 그러나, 하기 나타낸 문자 다이어그램에서, 페이지에 문자 다이어그램을 만들기 위하여 용어 "DNA 바코드"는 "DNA 바코드 모듈" 대신에 사용된다. 도 7은 여기서 나타낸 바와 동일한 단계를 도시하지만, 추가의 세부사항, 예를 들면, 비드의 다이어그램을 함께 도시한다. 반응의 반복된 순서는 각각 추가의 DNA 바코드 모듈의 첨가를 위하여 사용될 수 있다.
- [0225] **DNA 헤어핀을 인코딩하는 말단 핵산을 포함하는 DNA 바코드의 생성의 선택사항**. 이는 3-프라임 말단에 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위를 갖는 핵산, 염기 쌍이 아닌 약 4개의 염기의 형태를 갖는 벤드, 및 주위에 구부러질 수 있고 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위와 함께 염기 쌍을 형성하는 시퀀싱 프라이머를 포함하는 DNA 바코드에 관한 것이다. 반복을 위하여, 시퀀싱 프라이머는 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위에 어닐링되고, 여기서 실제 시퀀싱 반응은 어닐링된 시퀀싱 프라이머의 3'-말단에서 시작된다.
- [0226] DNA 바코드를 합성하는 최종 단계를 수행하는 시간인 경우, 및 최종 DNA 바코드 모듈이 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드에 커플링되는 경우, "스플린트 올리고"는 이러한 순서로, 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위, 서로 또는 염기의 임의의 인근 서열과 염기 쌍을 갖지 않는 몇몇 뉴클레오타이드, 및 시퀀싱 프라이머를 포함하는 DNA 헤어핀(을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. "스플린트 올리고"를 어닐링한 후, DNA 중합효소 및 dNTP를 첨가하고, 여기서 중합은 성장하는 DNA 바코드의 3'-말단에서 발생하고, 여기서 스플린트 올리고를 주형으로서 사용하여 중합되는 것은 순서대로 (1) 시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위; (2) 서로 교시하지 않는 염기 쌍을 갖는 4 또는 5개의 데옥시리보뉴클레오타이드의 형태를 갖는 헤어핀에서의 벤드; 및 (3) 시퀀싱 프라이머이다.
- [0227] **헤어핀 시퀀싱 프라이머의 3'-말단에서 가역적인 종결기**. 본 개시내용은 뉴클레오타이드/가역적인 종결기의 미리 형성된 복합체를 어닐링된 시퀀싱 프라이머의 3'-말단에 부착하기 위한 시약, 조성물, 및 방법을 제공한다. 가역적인 종결기는 헤어핀 시퀀싱 프라이머의 임의의 구성분이고, 여기서 이는 비드-결합된 DNA 바코드의 부분이 되는 것이다.
- [0228] 단계 1. 출발시, 우리는 피코웰에 배치된 비드를 갖고, 여기서 비드는 커플링된 폴리뉴클레오타이드를 갖고, 여기서 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단은 선택적으로 링커를 갖는 비드에 커플링된다. 도 7은 비드-결합된 폴리뉴클레오타이드가 제1 DNA 바코드 및 제1 어닐링 부위를 포함한다는 것을 나타낸다. 링커는 핵산으로 만들어질 수 있거나, 화학적으로 어떤 다른 것으로 만들어질 수 있다. 바람직하게는, 링커는 소수성이고, 바람직하게는 링커는 비드-결합된 DNA 바코드를 소수성 폴리스티아렌 비드, 예를 들면, 텐타겔® 비드로부터 분리한다.
- [0229] 서술의 편의상, 심지어 이들이 염기의 동일한 서열을 갖지 않는 경우에도(대신에, 염기의 서열은 서로 상보적이

다), 비드-결합된 DNA 바코드의 부분인 제1 어닐링 부위 및 가용성 "스플린트 올리고"의 부분인 제1 어닐링 부위는 둘 다 "제1 어닐링 부위"로 지칭되고, 여기서 결과는 스플린트 올리고가 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드 상의 제1 어닐링 부위에 혼성화될 수 있고, 따라서 스플린트 올리고 상에 있는 것을 복제함으로써 비드-결합된 DNA 바코드를 연장하는 DNA 중합효소를 위한 주형으로서 역할을 한다는 것이다.

[0230] 또한, 서술의 편의상, 심지어 이들이 동일한 서열을 갖지 않는 경우에도(하지만, 대신에 상보적 염기를 갖는다), 비드-결합된 DNA 바코드의 부분인 제2 어닐링 부위 및 가용성 "스플린트 올리고"의 부분인 제2 어닐링 부위는 둘 다 "제2 어닐링 부위"로 지칭된다.

[0231] 5'-말단으로부터 3'-말단으로, 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드는 하기 순서로 핵산을 함유할 수 있다:

비드-/제1 DNA 바코드/제1 어닐링 부위/

[0233] 대안적으로, 5'-말단으로부터 3'-말단으로, 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드는 단계 번호를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있고, 여기서 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드는 하기 순서로 핵산을 갖는다:

비드-/제1 DNA 바코드/핵산 인코딩 단계 번호/제1 어닐링 부위/

[0235] 대안적으로, 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드는 하기에 나타낸 바와 같은 기능성 핵산(시퀀싱 프라이머 어닐링 부위)인 핵산을 포함할 수 있다:

비드-/제1 DNA 바코드/시퀀싱 프라이머 어닐링 부위/제1 어닐링 부위/

[0237] 이러한 문자 다이어그램으로 나타낸 것은 DNA 바코드의 비드에 대한 커플링을 매개하는 임의의 링커이다. 링커는 핵산의 형태를 가질 수 있거나, 어떤 다른 유기 화학으로 만들어질 수 있다.

[0238] 단계 2. 가용성 스플린트 올리고뉴클레오타이드(스플린트 올리고)를 첨가하고, 여기서 이러한 스플린트 올리고는 제1 어닐링 부위 및 제2 DNA 바코드 모듈, 및 제2 어닐링 부위를 포함한다.

[0239] 도 7은 또한 혼성화된 스플린트 올리고가 주형으로서 사용되고, DNA 중합효소가 제2 DNA 바코드 모듈의 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드 및 제2 어닐링 부위에 대한 부착을 촉매 작용하는 단계를 도시한다. 도 7은 DNA 중합효소가 촉매 작용하는 효소 생성물이 주형으로서 스플린트 올리고를 사용한다는 것을 보여주고, 이는 약간 더 길게 성장하는(제2 DNA 바코드 및 제2 어닐링 부위의 공유 부착에 의해 성장함) 비드-결합된 DNA 바코드를 야기한다. 문자로 하기 바로 보여지는 것은 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드에 혼성화되는 스플린트 올리고의 복합체이다:

비드-/제1 DNA 바코드/제1 어닐링 부위/

.....제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

[0242] 도 7에 도시된 일부 정보를 반복하기 위하여, 하기에 바로 보여지는 것은 스플린트 올리고이다:

"제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위"

[0244] 단계 3. DNA 중합효소 및 dNTP를 첨가하여 비드-결합된 DNA 바코드를 연장한다. 스플린트 올리고가 여전히 이에 혼성화된 비드-결합된 성장하는 DNA 바코드가 하기 보여지고, 여기서 현재 이에 부착되는 것이 "제2 DNA 바코드 모듈"인 핵산 및 "제2 어닐링 부위"인 핵산이기 때문에 비드-결합된 성장하는 바코드는 그 전보다 더 길다. 도 7은 또한 이러한 단계를 도시한다. 스플린트 올리고는 비드-결합된 성장하는 바코드 아래에 도시된다:

비드-/제1 DNA 바코드/제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

.....제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

[0247] 단계 4. 스플린트 올리고를 세척한다. 스플린트 올리고는 가열, 즉, 전체 피코엘 플레이트를, 예를 들면, 약 60°C, 약 65°C, 약 70°C, 약 75°C, 약 80°C로, 약 10분 동안 가열하거나, 대안적으로, 회색 NaOH를 피코엘 어레이에 가한 다음, 중화시킴으로써 비드-결합된 성장하는 바코드로부터 해리되는 것이 촉진될 수 있다.

[0248] 단계 5. 비드-결합된 성장하는 스플린트 올리고에 혼성화된 다음, 제3 DNA 바코드 및 제3 어닐링 부위의 DNA 중합효소-촉매 작용된 부착을 매개하는 주형으로서 사용될 수 있는 제2 스플린트 올리고를 가한다. 가용성 시약인 이러한 제2 스플린트 올리고는 하기 도시된다(하지만, 도 7에는 도시되지 않는다).

제2 어닐링 부위/제3 DNA 바코드/제3 어닐링 부위/

- [0250] 단계 6. 이러한 올리고뉴클레오타이드가 상응하는 비드-결합된 "제2 어닐링 부위"에 어닐링되고, DNA 중합효소가 비드-결합된 올리고뉴클레오타이드를 연장하여, 이것이 "제3 DNA 바코드/제3 어닐링 부위/"에 대한 보체를 함유하도록 한다.
- [0251] 단계 7. 제2 스플런트 올리고를 세척한다.
- [0252] 단계 4. 하기 스플런트 올리고를 가한다(이러한 특정한 첨가는 도 7에 도시되지 않는다).
- [0253] 제3 어닐링 부위/제4 DNA 바코드/제4 어닐링 부위/
- [0254] 이러한 가용성 올리고뉴클레오타이드는 비드-결합된 올리고뉴클레오타이드의 "제3 어닐링 부위"에 어닐링될 수 있는 핵산을 갖는다. 일단 어닐링되면, 4개의 dNTP를 갖는 DNA 중합효소를 또 다른 DNA 바코드 모듈(제4 DNA 바코드)을 인코딩하기 위하여 비드-결합된 올리고뉴클레오타이드를 연장하는데 이용하고 사용한다. 화학적 화합물의 라이브러리 및 연관된 DNA 바코드를 평행적으로 생성하는 전체 스플릿-앤파스 과정 동안, 상기 단계 주기는 반복되고, 여기서 각각의 DNA 바코드는 주어진 화합물과 연관된다(여기서 각각의 DNA 바코드는 연관된 화합물의 화학적 합성의 이력에 대한 정보를 우리에게 제공한다). 상기 단계 주기는 화합물의 라이브러리의 화학적 합성이 완성되면 중단된다. 완성된 비드-결합된 DNA 바코드는 화학적 라이브러리와 함께, 연달아, 그 다음, 비드는 피코웰 어레이의 피코웰에 분산될 수 있다.
- [0255] 각각의 비드에 대한 DNA 바코드는 또한 각각의 피코웰과 연관된 DNA 바코드를 구성한다. DNA 바코드는 비드-결합된 화합물의 동정을 가능하게 한다. 본 개시내용의 시퀀싱 방법은 비드가 여전히 피코웰 내부에 있는 동안 피코웰의 내부에서 발생한다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 시퀀싱 방법을 배제할 수 있고, 시퀀싱에 사용되는 임의의 시약을 배제할 수 있고, 여기서 시퀀싱은 비드-결합된 DNA 주형 상에서 수행되지 않거나, 여기서 시퀀싱은 피코웰 내부에 배치된 비드-결합된 DNA 주형 상에서 수행되지 않는다.
- [0256] **시퀀싱 프라이머를 위한 어닐링 부위.** 하나의 실시형태에 있어서, 완성된 DNA 바코드에서 각각의 DNA 바코드 모듈은 그 자체의 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위와 작동적으로 연결되고 프레임 내에 있고, 따라서 각각의 DNA 바코드 모듈 상의 별개의 시퀀싱 과정을 수행하는 능력을 갖는 운용자를 제공한다(이러한 실시형태에 있어서, 각각의 DNA 바코드 모듈은 또한 전체 DNA 바코드의 합성에서 단계를 동정하는(인코딩하는) 그 자체의 핵산과 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다).
- [0257] 또 다른 실시형태에 있어서, 각각의 DNA 바코드는 오직 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위만을 갖고, 여기서 이는 비드-결합된 DNA 바코드의 3'-말단에 또는 그 근처에 위치할 수 있고, 여기서 시퀀싱 프라이머 그 자체는 용해될 수 있고, 피코웰에 첨가된 후, 시퀀싱 프라이머 어닐링 부위에 혼성화될 수 있다. 대안적으로, 시퀀싱 프라이머가 DNA 헤어핀의 부분인 경우, 이러한 DNA 헤어핀은 비드-결합된 DNA 바코드를 생성하는 최종 단계에서 "스플런트 올리고"를 통해 첨가된다. 도 7은 임의의 시퀀싱 프라이머에 대한 임의의 어닐링 부위를 도시하지 않는다.
- [0258] **핵산의 3'-말단을 통해 비드에 커플링된 핵산**
- [0259] 본 발명에서 개시된 다양한 실시형태는 DNA의 5'-말단을 통해 DNA를 비드에 커플링하는 것에 관한 것인 반면, 다른 실시형태에 있어서, DNA, 예를 들면, DNA 바코드 또는 DNA 태그는 이의 3'-말단을 통해 비드에 커플링될 수 있다. DNA의 3'-하이드록실기는 특정한 화학적 합성 조건(예를 들면, 미크로부 변환)하에 반응성일 수 있고, 이는 3'-말단 손상을 부여하고, 연장, 결찰 또는 다른 단계에 참여할 수 없게 한다. 따라서 DNA 태그는 이의 3'-말단을 통해 비드에 부착되어 원치 않는 화학적 반응을 방지하고 DNA 바코드에 대한 손상을 방지할 수 있다.
- [0260] **본 개시내용의 비드-결합된 DNA 바코드에 관한 배제 실시형태.** 배제될 수 있는 것은 연접 DNA 바코드가 광 절단 가능한 링커 또는 절단 가능한 링커를 통해 비드에 연결되는 임의의 비드, 미세입자, 미세구체, 수지, 또는 물질의 중합체 조성물이다.
- [0261] 배제될 수 있는 것은 하기 중 둘 다를 포함하지 않는 임의의 비드, 미세입자, 미세구체, 수지, 또는 물질의 중합체 조성물이다: (1) 비드 상의 제1 위치에 커플링되는 연접 DNA 바코드, (2) 비드 상의 제2 위치에 커플링되는 화합물, 여기서 제1 위치는 제2 위치와 동일하지 않다. 바람직한 실시형태에 있어서, 이러한 "화합물"은 복수의 화학적 라이브러리 단량체로 만들어진다.
- [0262] 배제될 수 있는 것은 외부 표면(또는 외부 표면들) 및 또한 내부 표면(또는 내부 표면들, 또는 내부 영역)을 갖지 않는 임의의 비드, 미세입자, 미세구체, 수지, 또는 물질의 중합체 조성물이고, 여기서 비드는 비드에 커플링되는 적어도 10,000개의 실질적으로 동일한 연접 DNA 바코드를 포함하지 않고, 여기서 적어도 10,000개의 실질적으로 동일한 연접 DNA 바코드의 적어도 90%는 외부 표면에 커플링된다. 다시 말해서, 배제될 수 있는 것은

커플링된 연접 DNA 바코드의 적어도 90%가 외부 표면에 커플링되지 않는 임의의 비드이다.

[0263] 배제될 수 있는 것은 실질적으로 폴리아크릴아마이드로 만들어지거나 임의의 폴리아크릴아마이드를 함유하는 임의의 비드, 미세입자, 미세구체, 수지, 또는 물질의 중합체 조성물이다.

[0264] 배제될 수 있는 것은 프로모터, 예를 들면, T7 프로모터를 함유하거나, 폴리A 영역을 함유하거나, 프로모터 및 또한 폴리A 영역을 함유하는 임의의 비드, 미세입자, 미세구체, 하이드로겔, 수지, 또는 물질의 중합체 조성물이다.

[0265] **2개의 DNA 바코드 모듈을 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 제조하는, 어닐링/중합의 오직 하나의 주기의 방법.** 본 개시내용은 비드-결합된 DNA 바코드가 오직 하나의 어닐링/중합 단계를 포함하는 시스템, 시약, 및 방법을 포함한다. 이러한 실시형태는 하기 다이어그램에 의해 표시되고, 여기서 제1 다이어그램은 스플린트 올리고의 어닐링을 나타내고, 제2 다이어그램은 DNA 중합효소를 사용하여 이를 채운 것을 나타낸다. 최종 결과는 2개의 DNA 바코드 모듈을 함유하는 비드-결합된 DNA 바코드이다. 이러한 특정한 과정에서, 비드-결합된 출발 물질은 선택적으로 링커(하지만 바람직하게는 임의의 절단 가능한 링커를 포함하지 않음), 화학적 화합물을 동정하는 것 이외의 정보를 인코딩하는 핵산, 및 선택적으로 기능성 핵산, 예를 들면, 시퀀싱 프라이머 또는 DNA 헤어핀을 포함한다. 2개의 다이어그램은 문자로 표시된다(바로 하기 참조):

비드-/제1 DNA 바코드/제1 어닐링 부위/

.....제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

비드-/제1 DNA 바코드/제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

.....제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위

[0267] **3개의 DNA 바코드 모듈을 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 제조하는, 어닐링/중합의 2개의 주기의 방법.** 본 개시 내용은 2개의 상이한 스플린트 올리고가 사용되는(제1 스플린트 올리고; 제2 스플린트 올리고) 비드-결합된 조성물, 시스템 및 방법을 포함한다. 이러한 상황에서, 제1 스플린트 올리고는 구조: 제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위를 포함하고, 여기서 제2 스플린트 올리고는 구조: 제2 어닐링 부위/제3 DNA 바코드/제3 어닐링 부위를 포함한다.

[0268] **4개의 DNA 바코드 모듈을 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 제조하는, 어닐링/중합의 3개의 주기의 방법.** 본 개시 내용은 3개의 상이한 스플린트 올리고가 사용되는(제1 스플린트 올리고; 제2 스플린트 올리고, 제3 스플린트 올리고) 비드-결합된 조성물, 시스템 및 방법을 포함한다. 이러한 상황에서, 제1 스플린트 올리고는 구조: 제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위를 포함하고, 여기서 제2 스플린트 올리고는 구조: 제2 어닐링 부위/제3 DNA 바코드/제3 어닐링 부위를 포함하고, 여기서 제3 스플린트 올리고는 구조: 제3 어닐링 부위/제4 DNA 바코드/제4 어닐링 부위를 포함한다.

[0269] **5개의 DNA 바코드 모듈을 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 제조하는, 어닐링/중합의 4개의 주기의 방법.** 본 개시 내용은 4개의 상이한 스플린트 올리고가 사용되는(제1 스플린트 올리고; 제2 스플린트 올리고, 제3 스플린트 올리고, 제4 스플린트 올리고) 비드-결합된 조성물, 시스템 및 방법을 포함한다. 이러한 상황에서, 제1 스플린트 올리고는 구조: 제1 어닐링 부위/제2 DNA 바코드/제2 어닐링 부위를 포함하고, 여기서 제2 스플린트 올리고는 구조: 제2 어닐링 부위/제3 DNA 바코드/제3 어닐링 부위를 포함하고, 여기서 제3 스플린트 올리고는 구조: 제3 어닐링 부위/제4 DNA 바코드/제4 어닐링 부위, 를 포함하고, 여기서 제4 스플린트 올리고는 구조: 제4 어닐링 부위/제5 DNA 바코드/제5 어닐링 부위를 포함한다.

[0270] **복수의 DNA 바코드 모듈을 갖는 비드-결합된 DNA 바코드를 제조하는, 어닐링/중합의 복수의 단계를 갖는 실시형태.** 본 개시내용은 오직 1개의 스플린트 올리고(2-모듈 DNA 바코드를 제조함)를 사용하고, 오직 2개의 스플린트 올리고(3-모듈 DNA 바코드를 제조함)를 사용하여, 오직 3개의 스플린트 올리고(4-모듈 DNA 바코드를 제조함)를 사용하고, 오직 4개의 스플린트 올리고(5-모듈 DNA 바코드를 제조함)를 사용하고, 오직 5개의 스플린트 올리고(6-모듈 DNA 바코드를 제조함)를 사용하고, 오직 6개의 스플린트 올리고(7-모듈 DNA 바코드를 제조함) 등을 사용하는, 연접 바코드에 관한, 비드-결합된 조성물, 시스템 및 방법을 포함한다.

[0271] 포함되는 것은 적어도 1개의 스플린트 올리고, 적어도 2개의 스플린트 올리고, 적어도 3개의 스플린트 올리고, 적어도 4개의 스플린트 올리고, 적어도 5개의 스플린트 올리고, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 20개의 스플린트 올리고, 또는 20개 미만, 15개 미만, 10개 미만, 8개 미만, 6개 미만, 4개 미만, 3개 미만, 2개 미만의 스플린트 올리고를 사

용하는 비드-결합된 조성물, 시스템 및 방법이다. 이러한 수는 스플린트 올리고 그 자체뿐만 아니라 스플린트 올리고를 첨가하는 단계의 번호, 및 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드에 첨가되는 DNA 모듈의 번호화를 지칭한다.

[0275] DNA 바코드에 대한 손상 감소

직교 DNA 바코드(연접 DNA 바코드 대신에)를 사용하여 손상을 감소시킨다. 연접 DNA 바코드 및 직교 DNA 바코드의 주제를 지향하는 하나의 방식은 하나가 다른 것에 대하여 갖는 이점에 대해서 기재하는 것이다. 연접 바코딩에 대한 직교 바코딩의 이점은 다음과 같다. 성장하는 화학적 화합물의 각각의 단량체의 부착에 있어서, 평행적으로 부착되는 것은 화학적 라이브러리를 생성하는 화학적 라이브러리 단량체, 및 완성된 전장 DNA 바코드를 생성하는 DNA 바코드 모듈이다.

연접 바코딩과 함께, 임의의 주어진 모듈의 부착이 불완전한 경우(모든 부착 부위가 필요한 모듈과 성공적으로 커플링되지 않았다는 것을 의미함), 완성된 바코드의 서열은 정확하지 않을 것이다. 설명 "정확하지 않음"은 불완전한 커플링이 뭉치로부터 사라질 수 있는 덩어리가 완성된, 정확한 DNA 바코드인 것으로 추정되었다는 것을 의미한다는 것을 의미한다. 여기서, 완성된 DNA 바코드 서열은 모든 DNA 모듈의 부착 실패로 인한 실수를 험유할 것이다. 대조적으로, 직교 바코딩과 함께, 각각의 개별적인 DNA 모듈은 비드 상에 그 자체의 고유한 부착 부위에 공유 결합된다. 그리고 DNA 모듈이 비드 상의 주어진 부위에 부착되면, 더 이상 DNA 모듈은 이미 부착된 DNA 모듈에 연결되지 않을 것이다.

교차-링커를 사용하여 손상을 감소시킨다. 본 개시내용은 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키고, 부분적으로 합성된 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키는 시약 및 방법을 제공한다. 각각의 DNA 바코드 모듈은, 성장하는 비드-결합된 DNA 바코드에 부착되기 전에, 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 형태를 가질 수 있고, 여기서 이러한 dsDNA는 DNA 교차-링커, 예를 들면, 미토마이신-C로 처리된다. 이의 dsDNA 형태로 DNA 바코드의 합성의 완료 후, 이러한 dsDNA는 ssDNA로 전환된다. DNA 가닥 중 하나가 유라실(U) 잔기를 갖고, 유라실 잔기의 위치에서 DNA의 절단이 유라실-N-글리코시다제에 의해 촉매 작용되는 dsDNA의 ssDNA로의 전환이 수행될 수 있다(2017년 9월 25일에 제출된 제62/562,905호의 도 5를 참고하고, 제62/562,905호는 본 명세서에 그 전문이 참조로서 포함된다). 상기는 비드-결합된 화학적 화합물을 제조하는데 사용된 시약에 의해 성장하는 DNA 바코드에 가해지는 손상을 지칭한다.

DNA 바코드의 제조를 위하여 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 사용하여 손상을 감소시킨다. 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키고, 부분적으로 합성된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키는 또 다른 방법은 이중 가닥 DNA 형태로 DNA 바코드를 합성하는 것이고, 여기서 서로 부착되는 각각의 DNA 바코드 모듈은 dsDNA의 형태를 갖고, 여기서 2개의 가닥 각각은 DNA 헤드피스를 통해 안정화된다. 완성된 DNA 바코드의 최종적인 시퀀싱을 위하여, 가닥 중 하나는 DNA 헤드피스로부터 절단되고 제거된다. 상기는 비드-결합된 화학적 화합물을 제조하는데 사용된 시약에 의해 성장하는 DNA 바코드에 가해지는 손상을 지칭한다(여기서 이러한 화학적 화합물은 화학적 라이브러리의 멤버이다).

헤어핀을 포함하여 손상을 감소시킨다. 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키는 또 다른 방법은 DNA 바코드를 자기-조립하여 헤어핀을 형성하는 방식으로 합성하는 것이고, 여기서 이러한 DNA 바코드는 자기 조립되어 헤어핀의 제1 프롱이 헤어핀의 제2 프롱에 어닐링된다.

합성되는 DNA 바코드가 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 형태를 갖는 경우, 용매, 예를 들면, DCM, DMF, 및 DMA는 DNA 바코드를 변성시킬 수 있다. 상기 방법 및 시약은 변성을 방지할 수 있다.

dsDNA의 밀봉된 말단을 사용하여 손상을 감소시킨다. 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키고, 부분적으로 합성된 DNA 바코드에 대한 손상을 감소시키는 또 다른 방법은 이중 가닥 DNA(dsDNA)을 사용하고, 7-아자-dATP 및 dGTP를 통해 이러한 dsDNA를 밀봉하는 것이다.

양성자성 용매를 피하고, 강산 및 강염기를 피하고, 강 환원제 및 산화제를 피하여 손상을 감소시킨다. 데옥시리보핵산(DNA)의 존재와 혼화성인 화학의 유형은, 비드-결합된 DNA이든 비드-결합되지 않은 DNA이든, 양성자성 용매의 부재, 강산 조건을 피하는 것, 강염기, 예를 들면, t-부틸 리튬을 피하는 것, 강 환원제, 예를 들면, 리튬 알루미늄 하이드라이드를 피하는 것, DNA 염기와 반응하는 시약, 예를 들면, 일부 알킬 할라이드를 피하는 것, 및 일부 산화제를 피하는 것이 필요할 수 있다(문헌[Luk and Sats (2014) DNA-Compatible Chemistry (Chapter 4) in A Handbook for DNA-Encoded Chemistry, 1st ed. John Wiley and Sons, Inc.] 참조).

- [0284] 다른 곳에 기재된 바와 같이, 용어 "DNA 바코드"는 화학적 화합물을 이의 전체로 동정하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있고, 대조적으로, "DNA 바코드 모듈"은 화학적 화합물을 제조하는 오직 하나의 단량체를 지칭할 수 있다.
- [0285] **DNA-혼화성 화학을 사용하여 핵산에 대한 손상을 감소시킨다.** 사츠 등(Satz et al)은 비드-결합된 핵산과 혼화성인 다양한 화학을 개시한다(Satz et al (2015) Bioconjugate Chemistry. 26:1623-1632; correction in Satz et al (2016) Bioconjugate Chem. 27:2580-2580). 문헌[Satz et al, 상기 참조]에 기재가 DNA/화학적 라이브러리 멤버 접합체 상에 수행되는 화학적 반응에 관한 것이지만, 기재된 DNA-혼화성 화학의 유형은 또한 관련이 있고, 여기서 유기 화학은 비드-결합된 화합물 및 비드-결합된 DNA를 함유하는 비드 상에 수행되는 것이다.
- [0286] 벤즈이미다졸 화합물, 이미다졸리딘 화합물, 퀴나졸린온 화합물, 아이소인돌린온 화합물, 티아졸 화합물, 및 이미다조파리딘 화합물의 형성을 위한 DNA-혼화성 반응이 개시된다(문헌[Satz et al]의 표 1, 항목 1-6 참조).
- [0287] 게다가, DNA-혼화성 보호기는 alloc 탈보호화, BOC 탈보호화, t-부틸 에스터 가수분해, 메틸/에틸 에스터 가수분해, 및 하이드라진 및 라니(Raney) 니켈에 의한 나이트로 환원을 포함하여 개시된다(문헌[Satz et al]의 표 1, 항목 7 내지 11 참조).
- [0288] 추가로, 시약을 DNA에 커플링하는 방법이 개시되고, 여기서 커플링은 DNA에 이미 부착된 작용기에 의해 발생한다. 방법은 스즈키(Suzuki) 커플링, 알킨과 아릴할라이드 사이의 소노가시라(Sonogashira) 커플링에 대하여 최적화된 과정, 다이메틸-1-다이아조-2-옥소프로필포스포네이트를 사용하는 알데하이드의 알kin으로의 전환, 정제된 알kin으로부터 직접적으로 트라이아졸 사이클로를 첨가하는 신규한 방법, 개선된 반응이 pH 9.4 버퍼에서 아이소시아네이트 시약과 함께 발생하는 아민 작용화된 DNA과 아이소시아네이트 빌딩 블록의 반응을 위한 개선된 방법을 포함한다(문헌[Satz, et al]의 표 1, 항목 12 내지 15 참조).
- [0289] DNA에 대한 시약의 커플링에 대한 추가의 방법이 개시되고, 여기서 커플링은 DNA에 이미 부착된 작용기에 대하여 발생한다. 이들은 일차 아민이 DNA에 접합되는 방법, DNA-접합된 티오우레아를 형성하는 최적화된 과정, 2차 아민의 알킬화 및 지방족 일차 아민의 비스-알킬화 방법, 일차 아민 DNA-접합체의 모노알킬화, 아민-작용화된 DNA-접합체와 반응할 수 있는 빌딩 블록으로서 헤트아릴할라이드의 사용, 윗팅(Wittig) 반응을 위한 방법을 포함한다(문헌[Satz et al]의 표 1, 항목 16 내지 20).
- [0290] **DNA 복구 효소를 통한 손상된 DNA의 감소.** 효소, DNA-손상 결합 단백질, 및 헬리카세를 포함하는 다양한 단백질은 DNA 손상을 복구하는데 이용 가능하다. 상업적으로 이용 가능한 것은 산화 손상, 방사선 유도된 손상, UV 광 유도된 손상, 폼알데하이드 부가물로부터의 손상, 및 알킬기 부가물의 형태를 갖는 손상을 복구할 수 있는 DNA 복구 단백질이다. 손상된 염기를 제거하는(하지만 ssDNA 또는 dsDNA를 절단하지 않는) 글리코사이드 효소는 5-폼일유라실, 테옥시우리딘, 및 5-하이드록시메틸유라실을 복구하는데 이용 가능하다. T4PDG는 피리미딘 이량체를 복구하는데 이용 가능하다. hNEIL1뿐만 아니라 Fpg는 산화된 피리미딘, 산화된 퓨린, 아푸린 부위, 및 아페리미딘 부위를 복구하는데 이용 가능하다. EndoVIII는 산화된 피리미딘 및 아페리미딘 부위를 복구하는데 이용 가능하다. EndoV는 미스매치를 복구하는데 이용 가능하다. HaaG는 알킬화된 퓨린을 복구하는데 이용 가능한 글리코실라제이다. DNA 복구 효소가 캡을 이탈하고, 이중 가닥 DNA가 하나 이상의 연속 테옥시리보뉴클레오타이드가 가닥 중 하나에서 손실되는 캡을 갖는 경우, 다양한 DNA 중합효소는 캡을 채우는데 이용 가능하다(카탈로그(2018) 참조, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs), 미국 매사추세츠주 임스워치 소재).
- [0291] 다양한 DNA 복구 효소 및 DNA 복구 시스템은 포유동물, 효모, 및 박테리아로부터 단리되었다. 이들은 뉴클레오타이드 제거 복구(NER), 직접적인 복구, 염기 제거 복구, 전사 커플링된 DNA 복구, 및 재조합 복구를 매개하는 것들을 포함한다. 사슬간 DNA 가교결합은 NER 및 상동 재조합의 조합된 사용에 의해 복구될 수 있다. 직접적인 복구는 광분해 효소를 통해 사이클로부탄 피리미딘 이량체 및 6-4 생성물의 복구를 포함한다. 직접적인 복구는 또한 DNA 메틸트랜스페라제에 의한 O^6 -메틸구아닌으로부터 O^6 -메틸의 제거를 포함한다. 문헌[Sancar et al (2004) Ann. Rev. Biochem. 73:39-85; Hu, Sancar (2017) J. Biol. Chem. 292:15588-15597]을 참조한다.
- [0292] 본 개시내용은 DNA 복구 효소, 또는 DNA 복구 단백질의 복합체 등의 처리에 의해 비드-결합된 DNA 바코드에 대한 손상을 복구시키는 시스템, 시약 및 방법을 제공한다.
- [0293] **DNA를 이의 3'-말단을 통해 비드에 커플링시킴으로써 손상을 감소시킨다.** 특정한 화학적 변형은 핵산의 노출된 3'-하이드록실기를 손상시킬 수 있다. 예를 들면 미크로노부 반응은 1차 및 2차 알코올의 에스터, 페닐 에터, 티오에터 및 다양한 다른 화합물로의 전환을 가능하게 하고, 이는 노출된 3'-말단에 후속적인 가공 단계에 비반응성을 부여할 수 있거나, 이제 개질된 3'-말단이 추가의 화학적 반응에 참여하도록 유발할 수 있다. 몇몇 실시형

태에 있어서, DNA 태그는 이들의 3'-말단을 통해 비드에 부착될 수 있고, 따라서 오직 5'-말단만이 용액에 노출된다.

[0294] 본 개시내용의 시약, 시스템 및 방법은 비드-결합된 핵산, 예를 들면, 비드-결합된 DNA 또는 비드-결합된 DNA 태그를 포함하고, 여기서 비드에 대한 커플링은 DNA의 3'-말단(또는 3'-말단)을 포함한다. 여기서 DNA 바코드를 포함하는 ssDNA는 ssDNA의 3'-말단을 통해 커플링되고, 시퀀싱은 오직 하나의 시퀀싱 프라이머를 혼성화함으로써 개시될 수 있고, 여기서 이러한 시퀀싱 프라이머는 전체 DNA 바코드의 업스트림을 혼성화하고, 여기서 이러한 혼성화는 커플링된 ssDNA의 비드-결합된 말단에 또는 그 근처에서 발생한다. 오직 하나의 시퀀싱 프라이머를 사용하는 것에 대한 대안으로서, 복수의 시퀀싱 프라이머를 사용할 수 있고, 여기서 각각의 시퀀싱 프라이머는 업스트림을 특정한 DNA 바코드 모듈에 혼성화한다. 예를 들면, 주어진 DNA 바코드가 5개의 DNA 바코드 모듈을 함유하는 경우, 여기서 DNA는 이의 3'-말단을 통해 비드에 커플링되고, DNA 바코드는 5개의 상이한 프라이머 어닐링 부위를 포함할 수 있고, 여기서 각각의 프라이머 어닐링 부위는 주어진 DNA 바코드 모듈의 업스트림에, 또는 업스트림의 바로 옆에 위치한다.

[0295] 이중 가닥 DNA(dsDNA) 커플링 실시형태. 다른 실시형태에 있어서, 비드에 커플링되는 것은 dsDNA이고, 여기서 dsDNA에서 가닥 중 오직 하나의 3'-말단이 비드에 커플링된다. dsDNA를 포함하는 5'-커플링 실시형태에서, 커플링될 수 있는 것은 dsDNA이고, 여기서 dsDNA에서 가닥 중 오직 하나의 5'-말단이 비드에 커플링된다.

(V) 화학적 화합물의 비드에 대한 커플링

[0297] 본 개시내용은 (1) 기질, 예를 들면, 비드에 부착하는 링커; (2) 핵산 바코드를 기질, 예를 들면, 비드에 부착하는 링커; (3) 절단 가능한 링커, 예를 들면, UV 광에 의해 절단 가능한 링커, 효소, 예를 들면, 프로테아제에 의해 절단 가능한 링커; (4) 비-절단 가능한 링커; (5) 이작용성 링커; (6) 다작용성 링커; 및 (7) 연결에 사용되는 복수의 비드를 제공한다. 예를 들면, 4-하이드록시메틸 벤조산(HMBA) 링커, 4-하이드록시메틸페닐아세트산 링커가 이용 가능하다(문헌[Camperi, Marani, Cascone (2005) Tetrahedron Letters. 46:1561-1564] 참조).

[0298] "비-절단 가능한 링커"는 주어진 유기 화학 과정의 단계 동안 사용되는 임의의 시약, 조건, 또는 환경에 의해 검출 가능하게 절단될 수 없는 링커로서 특성화될 수 있다. 대안적으로, "비-절단 가능한 링커"는, 주어진 유기 화학 과정의 다른 반응물, 생성물, 또는 시약에 허용 가능하지 않게 해가 되는 시약, 조건, 또는 환경을 제외하고, 절단될 수 없는 링커로서 특성화될 수 있다.

[0299] 이작용성 링커, 또는 다른 다작용성 링커는 포크(사람이 음식을 섭취할 때 사용되는 포크) 형태를 가질 수 있고, 여기서 포크의 손잡이는 비드에 부착되고, 여기서 포크의 각각의 가지는 다양한 화학물질 중 하나에 연결된다. 예를 들면, 하나의 가지는 화학적 라이브러리 멤버에 연결될 수 있다. 또 다른 가지는 DNA 바코드에 연결될 수 있다. 포크의 또 다른 가지는 금속 이온에 연결될 수 있다.

[0300] 다양한 비드의 사용에 관하여, 본 개시내용은 다중-비드 실시형태를 제공하고, 예를 들면, 다음과 같다: (1) 제1 비드는 제2 비드에 연결된 부착된 핵산 바코드를 함유하고, 여기서 제2 비드는 부착된 화학적 라이브러리 멤버를 함유하고; (2) 제1 비드는 제2 비드에 연결된 부착된 핵산 바코드를 함유하고, 여기서 제2 비드는 부착된 화학적 라이브러리 멤버를 함유하고, 여기서 제3 비드는 (제1 비드 및 제2 비드 중 하나 또는 둘 다에) 부착되고, 여기서 제3 비드는 공유적으로 부착된 시약을 함유한다. 부착된 시약은 효소일 수 있고, 여기서 효소는 부착된 화학적 라이브러리 멤버의 활성을 검정하는데 사용된다.

(VI) 단량체를 함께 커플링시켜 화합물을 제조

[0302] 예시적인 화학적 단량체. 본 개시내용의 조성물 및 방법을 위한 화학적 단량체로서 사용에 적합한 아미노산 유도체는 도 4에 도시된다. 도면은 화학물질의 공급자, 예를 들면, 아나스펙 EGT 그룹(AnaSpec EGT Group, 미국 캘리포니아주 프리몬트 소재); 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재); 아크로스 오가닉스(Acros Organics)(서로피셔 사이언티픽의 부분), 또는 콤비-블록스(Combi-Blocks, 미국 캘리포니아주 산디에고 소재)를 나타낸다.

[0303] 추가의 화학적 단량체는 도 22 내지 27에 도시된다. 도면 22 내지 27 각각은 구조, 화학명, 연관된 DNA 모듈 바코드를 제공한다. 도면에 개시된 바와 같이, 화합물 1 내지 6(도 22)의 경우, 각각의 바코드는 ACGT, ACTC, AGAC, AGCG, AGTA, 및 ATAT이다. 화합물 7 내지 10(도 23)의 경우, 각각의 바코드는 ATGA, CACG, CAGC, 및 CATA이다. 화합물 11 내지 16(도 24)의 경우, 각각의 바코드는 CGAG, CGCT, CGTC, CTAC, CTGT, 및 GACT이다. 화합물 17 내지 21(도 25)의 경우, 각각의 바코드는 GAGA, GCAC, GCTG, GTAG, 및 GTCA이다. 화합물 22-26(도 26)의 경우, 각각의 바코드는 GTGC, TAGT, TATC, TCAG, 및 TCGC이다. 그리고 화합물 27 내지 30(도 27)의

경우, 각각의 바코드는 TCTA, TGAT, TGCA, 및 TGTG이다. 이러한 바코드는 오직 예시적이다. 화합물의 임의의 주어진 라이브러리에 있어서, DNA 바코드의 상이한 컬렉션은 그 라이브러리에서 화합물을 구성하는데 사용되는 화학적 단량체 각각을 동정하는데 사용될 수 있다.

[0304] **커플링 반응.** 하기는 비드 및 서로에 대한 화학적 단량체의 커플링을 기재하고, 즉, 여기서 제1 단계는 제1 화학적 단량체를 절단 가능한 링커를 통해 비드에 직접적으로 커플링시키는 것이고, 여기서 후속적인 화학적 단량체는, 그 다음, 서로, 하나씩 연결된다. 하기 개시된 조건은 DNA 혼화성이다.

[0305] 이는 텐타겔® 비드 상의 3개의 아미노산 화합물을 제조하는 방법을 기재한다. Fmoc-광-링커, 4-{4-[1-(9-플루오레닐메틸옥시카보닐아미노)에틸]-2-메톡시-5-나이트로펜옥시}부탄산)을 갖는 개질된 Fmoc 보호된 수지(1mg, 라프 폴리미어 게엠베하(Rapp Polymere GmbH), 10 μ m, 텐타겔 M-NH₂, 0.23 mmol/g) 또는 Fmoc 보호기를 갖는 또 다른 적절한 링커를 DMA(150 μ L) 중에 반응기 플레이트(머크 밀리포어 엘티디, 0.45 μ m 소수성 PTFE)의 각각의 웰 내부에 혼탁시켰다. 플레이트의 하부에 레스프렙 VM-96 진공 매니폴드로 진공을 적용하여 용매를 제거하였다. DMF 중의 5% 피페라진, 2% DBU 혼합물 150 μ L 중에 수지를 혼탁시켜 Fmoc 보호기를 제거하였다. 플레이트를 엑셀 사이언티픽 알룸나 씰(Excel Scientific Alumna Seal)로 밀봉하고, 40°C에서 15분 동안 쉐이킹하였다. 진공을 적용하여 용매를 제거하고, 탈보호화 과정을 5분 동안 반복하였다. 여과 후, 각각의 웰을 2XDMA, 3XDCM, 1XDMA 각각 150 μ L로 세척하고, 각 세척 중간에 진공을 적용하여 용매를 제거하였다. 그 다음, 2분 동안 실온에 두었던 60mM Fmoc-아미노 산, 80mM Oxyma, 200mM DIC 및 80mM 2,4,6-트라이메틸피리딘의 미리 활성화된 혼합물 150 μ L를 가함으로써, 적절한 아미노산을 가하여 수지의 각각의 웰을 아실화시켰다. 플레이트를 다시 밀봉하고, 1시간 동안 40°C에서 쉐이킹하였다. 여과 후, 각각의 웰을 2XDMA 및 3XDCM 각각 150 μ L로 세척하였다. 각각의 웰에서 비드를 DCM 150 μ L 중에 재현탁시키고, 각각의 웰의 내용물을 단일 용기로 피펫팅을 통해 조합하였다. 조합된 비드를 완전히 혼합하고, 적절한 웰로 동일한 양(1 mg/웰)을 피펫팅하여 플레이트로 재분배하였다. 진공을 적용하여 용매를 제거하고, 각각의 웰은 다음 적절한 단계에 대하여 준비되었다. 각각의 추가의 아미노산 커플링을 위하여, 먼저 Fmoc 탈보호화 단계를 반복한 후, 원하는 아미노산과의 커플링 단계를 수행하였다. 스플릿 앤드 풀이 필요한 경우, 조합 및 재분배 방법을 반복한다.

[0306] 이는 비드 상에 스플릿-풀 방법으로 3-mer 아미노산을 생성하는 방법을 기재한다. Fmoc-광-링커에 의해 개질된 Fmoc 보호된 수지(1mg, 라프 폴리미어 게엠베하, 10 μ m, 텐타겔 M-NH₂, 0.23 mmol/g), 4-{4-[1-(9-플루오레닐메틸옥시카보닐아미노)에틸]-2-메톡시-5-나이트로펜옥시}부탄산) 또는 임의의 다른 적절한 링커를 DMA(150 μ L) 중에 반응기 플레이트(머크 밀리포어 엘티디(Merck Millipore Ltd), 0.45 μ m 소수성 PTFE)의 각각의 웰의 내부에 혼탁시켰다. 레스프렙® VM-96 진공 매니폴드로 플레이트 하부에 진공을 적용하여 용매를 제거하였다. DMF 중의 5% 피페라진, 2% DBU의 혼합물 150 μ L 중에 수지를 혼탁하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 플레이트를 엑셀 사이언티픽 알룸나 씰로 밀봉하고, 40°C에서 15분 동안 쉐이킹하였다. 진공을 적용하여 용매를 제거하고, 탈보호화 과정을 5분 동안 반복하였다. 여과 후, 각각의 세척 사이에 진공을 적용하여 용매를 제거하면서 각각의 웰을 2XDMA, 3XDCM, 1XDMA 각각 150 μ L로 세척하였다. 그 다음, 2분 동안 실온에 두었던 60mM Fmoc-아미노산, 80mM Oxyma, 200mM DIC 및 80mM 2,4,6-트라이메틸피리딘의 미리 활성화된 혼합물 150 μ L를 가함으로써 적절한 AA에 의해, 수지의 각각의 웰을 아실화시켰다. 플레이트를 다시 밀봉하고, 1시간 동안 40°C에서 쉐이킹하였다. 여과 후, 각각의 웰을 2XDMA, 3XDCM, 1XDMA 각각 150 μ L로 세척하였다. 각각의 추가의 AA 커플링을 위하여, 먼저 Fmoc 탈보호화 단계를 반복한 후, 원하는 AA와의 커플링 단계를 수행하였다. 각각의 연속적인 커플링을 분석하기 위하여, 비드의 1 mg 부분을 100 μ L DMSO 중에 혼탁시키고, 2시간 동안 365nm LED의 전출력에 노출시켰다. 수지를 여과하고, 여과액을 애질런트 포로셀(Agilent Poroshe11) SB-C-18, 3.0X50mm, 2.7 μ m 칼럼이 장착된 애질런트(Agilent) 1100 시리즈 LCMS에 주입하였다. 유속 1.2 mL/분의 유속으로 4분 동안, 물 중의 0.1% TFA 5% CH3CN 대 0.1% TFA 중의 100 CH3CN의 구배이고, 220nm에서의 모니터링을 수행하였다.

[0307] 레날리도마이드(레블리미드®)가 부착된 비-아미노산 펜던트를 만드는 실험. 이는 탈보호화 후 마지막 아미노산에 부착될 것이다. 이는 또한 스펀에서 수행되었다. DMA 중의 40mM 클로로 아세트산, 40mM Oxyma, 80mM DIC, 및 40mM TMP의 5분 동안 미리 에이징된 혼합물 150 μ L로 수지의 각각의 웰을 아실화시켰다(Fmoc 탈보호화 후). 플레이트를 밀봉하고, 40°C에서 1시간 동안 쉐이킹하였다. 각각의 웰을 3XDMA, 3XDCM, 및 2XDMA 각각 150 μ L로 세척하였다. 그 다음, 수지를 DMA 중의 100mM K2CO₃ 및 100mM Rev의 혼탁액 중에 재현탁시켰다. 플레이트를 밀봉하고, 3시간 동안 실온에서 쉐이킹하였다. 수지를 2X50/50 DMA/물, 3XDMA, 3XDCM, 및 2XDMA 각각 150 μ L로 세척하였다.

[0308] 주어진 비드에 부착되는 화학적 화합물의 합성의 충실도의 규정. 이는 화학적 화합물이 화학적 라이브러리의 멤

버인 완성된 화학적 화합물에 관한 것이다. 화학적 단량체로부터 부분적으로 또는 완전하게 각각의 화학적 화합물을 제조할 수 있다. 하기는 주어진 비드에 부착되는 화학적 화합물을 특성화하였다. 이러한 주어진 비드는 화학적 화합물의 라이브러리의 스플릿-앤드-풀 기반의 합성의 생성물일 수 있고, 여기서 각각의 비드는 고유한 화학적 화합물을 갖는다.

[0309] 화학적 라이브러리의 멤버는 고체상 합성을 통해 고체 지지체, 예를 들면, 비드 상에 합성될 수 있다. 펩타이드 결합을 갖는 화학물질의 고체상 합성은 하기 2개의 화학적 기 중 하나의 사용을 특정으로 한다. 제1 화학적 기는 N-알파-9-플루오레닐-메틸옥시카보닐(Fmoc, 염기 불안정)이다. 제2 화학적 기는 tert-부틸옥시카보닐(tBoc, 산 불안정)이다(문헌[Vagner, Barany, Lam (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8194-8199] 참조). Fmoc 및 tBoc는 used 펩타이드 기질을 보호하는데 사용될 수 있는 보호기이고, 여기서 Fmoc기 또는 tBoc기는 알파-아미노기에 부착된다(Sigler, Fuller, Verlander (1983) Biopolymers. 22:2157-2162).

[0310] 바람직하게는, 주어진 비드에 결합된 화학적 라이브러리의 멤버의 적어도 99.5%, 적어도 99.0%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 또는 적어도 80%는, 완성된 합성 후, 정확하게 동일한 화학적 구조를 갖는다. 화학적 라이브러리 멤버의 다단계 합성에서 하나 이상의 단계에서 발생할 수 있는 불완전한 커플링이 가능하다. 이러한 이유로, 본 개시내용의 조성물은 하기 제한 또는 범위 중 하나에 의해 특성화되고 제한될 수 있다.

[0311] 또한 본 개시내용에 의해 제공되는 것은 주어진 비드에 결합된 화학적 라이브러리의 멤버의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 99%가, 완성된 합성 후, 정확하게 동일한 화학적 구조를 갖는 방법 및 시약이다(이러한 수는 고체상 합성 동안 발생할 수 있는 오류, 예를 들면, 하나의 화학적 단량체를 수용하는 하나의 성장하는 화합물의 실패를 고려하고 반영한다. 또한, 이러한 수는 고체상 합성 동안 발생할 수 있는 임의의 단량체에 대한 화학적 손상을 고려하고 반영한다).

[0312] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 "정확하게 동일한 구조"에 대한 상기 컷오프 값 중 하나를 만족시키지 않는 임의의 방법 또는 시약을 배제할 수 있다.

[0313] 대안적인 실시형태에 있어서, 비드의 집단에서 2개의 비드, 3개의 비드, 4개의 비드, 5개의 비드, 약 5 내지 10 개의 비드, 약 10 내지 20개의 비드, 약 20 내지 40개의 비드, 약 40 내지 80개의 비드는 동등하고 동일한 화학적 화합물을 함유한다(고체상 합성 동안 화학적 단량체의 도입에서 임의의 오류를 고려하지 않고, 유기 합성 동안 화학적 단량체에 대하여 발생하는 임의의 화학적 손상을 고려하지 않음).

[0314] **클릭 화학에 대한 도입부.** 제웨트 등(Jewett et al)에 따르면, "클릭 반응은 선택적, 고수율이고, ... 우수한 반응 속도론을 갖는 것들로 ... 정의된다. 구성분이 주변의 생물학적 환경에 불활성인 클릭 반응의 하위부류는 배직교(biorthogonal)라고 지칭된다"(Jewett and Bertozzi (2010) Chem. Soc. Rev. 39:1272-1279). "클릭 화학"은 탄소-X-탄소와 같은 혜테로원자 연결과 함께 작은 단위를 결합시키는데 사용될 수 있다. 클릭 화학은 약물 또는 약물 후보의 합성을 위하여 단독으로, 또는 다른 유형의 화학적 반응과 함께 사용될 수 있다. 클릭 화학은 조합 화학에 사용되는 과정과 잘 어울린다. 클릭 화학에서 반응은 고수율이고, 비가역적이고, 산소 또는 물에 비감응성이 것을 특징으로 한다. "클릭 화학"에서 사용되는 화학적 반응의 부류는 (1) 고리화 첨가 반응, 특히 1,3-쌍극성 패밀리 및 혜테로-디엘스 알더 반응으로부터의 것; (2) 에폭사이드, 아지리딘, 및 환형 셀酹레이트와 같은 변형된 혜테로사이클 분자와 같이, 친핵성 고리-개구 반응; (4) 비-알돌 유형의 카보닐 화학; 및 (5) 산화 반응 및 일부 마이크로 첨가 반응과 같이, 탄소-탄소 다중 결합에 대한 첨가를 포함한다. 클릭 화학 반응은 종종 20 kcal/mol보다 큰 이들의 높은 열화학적 원동력에 의해 구별되고, 대조적으로, 비-클릭 화학 반응은 보통의 열역학적 원동력에 의해서만 결합을 형성하는 것을 포함한다(Kolb and Sharpless (2003) Drug Discovery Today. 8:1128-1137, Kolb, Finn, Sharpless (2001) Angew. Chem. Int. Ed. 40:2004-2021).

[0315] **테트라진 및 트랜스-사이클로옥텐(TCO).** 테트라진, 예를 들면, 1,2,4,5-테트라진은 디엘스-알더 고리화 첨가를 통해 트랜스-사이클로옥텐(TCO)과 반응할 수 있다(Devaraj, Haun, Weissleder (2009) Angew. Chem. Intl. 48:7013-7016).

[0316] **하티그-부흐발트(Hartig-Buchwald) 아민화.** 하티그-부흐발트 아민화 반응은 약제의 고체상 합성에서 사용될 수 있다. 이러한 아민화 반응은 탄소-질소 결합을 합성하는데 사용되고, 여기서 반응은 팔라듐에 의해 촉매 작용되어 아릴-할라이드와 아민(R_1-NH-R_2)을 더해 아민이 할라이드를 교체하고, 아미노기가 방향족 고리에 직접적으로 부착되는 아릴 생성물을 생성한다. 최종 결과는 (아미노기의) 질소에 대한 (아릴기의) 탄소의 결합을 포함하는 생성물이다. 다른 방식으로 말하면, 반응은 아릴할라이드를 상응하는 아닐린으로 전환시킨다. 하티그-부흐발트 아

민화는 다양한 아민과 혼화성이고, 조합 화학에 적합하다(Zimmermann and Brase (2007) J. Comb. Chem. 9:1114-1137).

[0317] 위스헨(Huisgen) 고리화 첨가. 위스헨 1,3-쌍극성 고리화 첨가 반응은 알킨 및 유기 아자이드를 포함한다. 알킨은 구조 $R-C\equiv CH$ 를 갖는다. 아자이드는 구조 $R-N^+=N=N^-$ 를 갖는다. 구리 촉매는 위스헨 고리화 첨가 반응의 속도를 가속화한다. 위스헨 반응은 "클릭 화학" 또는 "클릭 반응"을 통해 작동한다. 위스헨 반응은, 구리에 의해 촉매 작용될 때, 소분자 약물을 제조하는데 적합한 1,2,3-트라이아졸 혼화성을 생성한다. 위스헨 반응은, 적어도 보호된 형태일 때, 아미노산 측쇄의 존재와 혼화성이다. 1,2,3-트라이아졸로 만들어진 분자는 폴리펩타이드의 아마이드 결합과 유사한 결합을 가질 수 있고, 따라서 이러한 분자는 펩타이드 결합을 대신할 수 있다(Angell and Burgess (2007) Chem. Soc. Rev. 36:1674-1689).

[0318] 웨타이드 핵산(PNA). 본 개시내용은 웨타이드 핵산을 합성하기 위한 스플릿 앤드 풀 화학, 조합 화학, 또는 고체상 화학의 방법을 제공한다. 웨타이드 핵산은 올리고뉴클레오타이드의 유사체이다. 이들은 뉴클레아제에 의한 가수분해에 저항한다. 이들은 이들의 표적 RNA 서열에 강하게 결합할 수 있다. 웨타이드 핵산의 세포로의 흡수는 "세포 투과성 웨타이드"에 의해 향상될 수 있다(Turner, Ivanova, Gait (2005) Nucleic Acids Res. 33:6837-6849; Koppelhus (2008) Bioconjug. Chem. 19:1526-1534). 웨타이드 핵산은 고체상 합성 및 조합 합성에 의해 만들어질 수 있다(문헌[Quijano, Bahal, Glazer (2017) Yale J. Biology Medicine. 90:583-598; Domling (2006) Nucleosides Nucleotides. 17:1667-1670] 참조).

[0319] 본 개시내용은 비드-결합된 화합물을 포함하고, 여기서 화합물은 오직 하나의 단량체의 형태를 갖는다. 예를 들면, 이러한 비드-결합된 화합물은 레날리도마이드의 형태를 가질 수 있거나, 이는 부착된 카복실산기를 갖는 레날리도마이드의 형태, 또는 아미노기가 카복실산기를 갖는 작은 화학적 잔기에 의해 개질되거나, 화합물이 레날리도마이드의 입체이성체 또는 에난티오머인 레날리도마이드 아날로그인 레날리도마이드의 형태를 가질 수 있다.

(VII) 스플릿 앤드 풀 합성 및 평행적 합성

[0321] 이는 화학적 화합물의 라이브러리를 합성하는 "스플릿 앤드 풀" 방법, 및 "스플릿 앤드 풀" 방법이 비드-결합된 화학적 화합물과 비드-결합된 DNA 바코드의 동시적 합성에 사용되는 방법의 사용에 관한 것이다. 이는 또한 화합물의 혼합된 세트를 만들기 위한 분할 및 풀링(pooling)을 기재한다. 나중에, 하기에 개시되는 것은 비-아미노산의 커플링뿐만 아니라 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 의해 개질된 비드의 제조이다.

[0322] 본 개시내용은 화학적 라이브러리의 제조를 위한 스플릿 앤드 풀 합성을 제공한다. 하나의 실시형태에 있어서, 이러한 방법은 (a) 비드를 상이한 용기로 분할하는 단계; (b) 상이한 빌딩 블록을 각각의 용기에 가하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 3개의 용기가 사용되는 경우, 종(Specie) A를 제1 용기에, 종 B를 제2 용기에, 종 C를 제3 용기에 가하고 반응시키고, 여기서 종은 비드가 용기에 있는지 여부와 관계없이 부착 부위에 공유적으로 결합하고; (c) 모든 비드를 함께 하나의 용기에 풀링하는 단계; (d) 비드를 3개의 용기로 분할하는 단계, (e) 상이한 빌딩 블록을 각각의 용기에 가하는 단계로서, 여기서 종 A를 제1 용기에 가하고, 종 B를 제2 용기에 가하고, 종 C를 제3 용기에 가하고, 여기서 종은 미리 부착된 제1 종에 공유적으로 결합된다(문헌[Stockwell (2000) Trends Biotechnol. 18:449-455] 참조).

[0323] 본 개시내용의 스플릿-앤드-풀 합성은 각각의 화학적 커플링 단계(화학적 라이브러리 멤버를 만드는) 전 또는 후에 DNA-바코드 커플링 단계를 포함하고, 여기서 이러한 DNA 바코드는 그 단계에서 커플링되는 화학물질을 동정한다.

[0324] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 평행적 합성의 주어진 단계에 있어서 바코드가 화학물질의 부착 전에 부착되는 방법 및 시약을 배제할 수 있다. 반대로, 본 개시내용은 평행적 합성의 주어진 단계에 있어서 화학물질이 바코드의 부착 전에 부착되는 방법 및 시약을 배제할 수 있다.

[0325] 스플릿 앤드 풀 방법에 의해 제조되는 비드-결합된 화학적 라이브러리의 하나의 특징은 각각의 비드가 이에 부착되는 화합물의 오직 하나의 유형을 가질 것이라는 점이다. 불완전한 커플링이 있는 경우, 예를 들면, 주어진 스플릿 앤드 풀 단계에 있어서, 5,000개의 부착 부위 중 오직 4,000개만이 원하는 화학 종과 성공적으로 커플링된 경우, 일부 이질성이 발생할 것이다.

[0326] 평행적 합성. 본 개시내용의 바람직한 실시형태에 있어서, 평행적 합성은 화학적 화합물 및 연관된 DNA 바코드의 유기 합성에 사용될 수 있다. 실제 실시에서, 하나 이상의 화학적 단량체에 의한 비드의 개질 및 하나 이상

의 DNA 바코드 모듈에 의한 동일한 비드의 개질은 염밀하게는 평행적이지 않다. 실제 실시에서, 비드는 하나 이상의 화학적 단위(화학적 단량체)를 수용한 후, 특정한 화학적 단위를 인코딩하는 DNA 바코드 모듈을 수용한다. 용어 "평행적"은 화학적 라이브러리 단량체의 중합체가 성장함에 따라, DNA 바코드 모듈의 중합체도 성장한다는 사실을 나타낸다. 모든 DNA 바코드 모듈이 비드에 부착되어 연접 구조 또는 직교 구조를 형성하는 경우, 전장 DNA 바코드는 (DNA 바코드 모듈뿐만 아니라) "DNA 바코드"로 지칭된다.

[0327] 부착된 화학적 라이브러리 멤버의 총수에 대한 외부적으로 부착된 DNA 바코드의 수의 비율.

이는 비드의 외부 표면 및 내부 표면에 관한 것이다. 외부적으로 부착된 DNA 바코드(내부적으로 부착된 DNA 바코드의 수를 고려하지 않음) 및 부착된 화학적 라이브러리 멤버(외부 표면뿐만 아니라 내부 표면 둘 다에 부착)를 갖는 주어진 비드에 있어서, 외부적으로 부착된 DNA 바코드의 수에 대한 부착된 화학적 라이브러리 멤버의 총수의 비율은, 예를 들면, 약 0.1:100, 약 0.2:100, 약 0.5:100, 약 1.0:100, 약 2:100, 약 5:100, 약 10:100, 약 20:100, 약 30:100, 약 40:100, 약 50:100, 약 60:100, 약 70:100, 약 80:100, 약 90:100, 약 1:1, 약 100:150, 약 100:200; 약 100:400; 약 100:600 등일 수 있다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 값 중 하나에 맞는 임의의 비드, 또는 임의의 비드 집단을 배제할 수 있다.

[0329] 전형적인 비드에 대한 DNA 바코드의 균질성; 전형적인 비드에 대한 화학적 라이브러리 멤버의 균질성

본 개시내용은 임의의 주어진 비드(또는 임의의 비드 집단)에 대하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98%, 적어도 99.5% 등인 "화학적 라이브러리 균질성"을 제공한다.

더 엄격한 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 임의의 주어진 비드에 대하여, 또는, 대안적으로, 임의의 주어진 비드 집단에 대하여, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%인 "화학적 라이브러리 균질성"을 제공한다.

[0332] 유사하게, 본 개시내용은 바코드, 예를 들면, DNA 바코드의 균질성을 평가하는 상기 컷오프 값을 제공한다.

[0333] DNA 바코드에 대한 균질성 및 화학적 라이브러리 멤버에 대한 균질성은 실험실 지침서 또는 노트북의 방법 부분에 의해 계획되고 추구되는 바와 같은 정확한 순서에 따르는 전체 집단의 퍼센트에 관하여 정의될 수 있다.

[0334] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 컷오프 값 중 하나 이상에 따르지 않는 임의의 시약, 조성물, 또는 방법을 배제할 수 있다.

[0335] 비드 집단의 균질성을 평가하는 경우, 균질성이 비드의 전체 집단 도처에서 추구되는 상황에 있어서 비드 #1, 비드 #2, 비드 #3, 비드 #4, 비드 #5, 비드 #6, 비드 #7 등의 합에 대한 균질성을 계산할 필요가 있다.

[0336] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 DNA 바코드의 균질성이 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98%, 적어도 99.5% 등이 아닌 임의의 비드, 또는 임의의 비드 집단을 배제할 수 있다. 또한, 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 화학적 라이브러리 멤버의 균질성이 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98%, 적어도 99.5% 등이 아닌 임의의 비드, 또는 임의의 비드 집단을 배제할 수 있다.

[0337] 외부적으로 부착된 DNA 바코드에 대한 내부적으로 부착된 DNA 바코드의 비율

본 개시내용의 몇몇 실시형태에 있어서, DNA 바코드가 주로 외부 표면에 부착되는 비드를 제조하고 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 내부 DNA 바코드를 갖는 비드를 제조 및 사용하지 않는 하나의 이유는 내부 공간에 대한 DNA 올리고머의 낮은 침투, 및 내부 공간에 대한 DNA 리가아제(마감된 DNA 바코드를 생성하기 위하여 서로 DNA 모듈을 연결하기 위한 리가아제)의 낮은 침투이다. 그리고, 시퀀싱 목적으로, 내부 DNA 바코드를 제조 및 사용하지 않는 이유는 바코드의 최종적인 시퀀싱에 필요한 DNA를 증폭시키는데 필요한 효소의 낮은 침투이다. 내부 DNA 바코드를 갖는 비드를 제조 및 사용하지 않는 또 다른 이유는 화학적 라이브러리의 멤버를 부착하기 위한 내부 공간에 대한 비용이다.

[0339] 본 개시내용은 외부적으로 부착된 DNA 바코드에 대한 내부적으로 부착된 DNA 바코드의 비율이 약 0.1:100, 약 0.2:100, 약 0.4:100, 약 0.8:100, 약 1:100, 약 2:100, 약 4:100, 약 8:100, 약 10:100, 약 20:100, 약 40:100, 약 50:100, 약 60:100, 약 70:100, 약 80:100, 약 90:100, 약 1:1 등인 DNA 바코드를 갖는 비드를 제공한다.

[0340] 또한, 본 개시내용은 외부적으로 부착된 DNA 바코드에 대한 내부적으로 부착된 DNA 바코드의 비율이 0.1:100 이

하, 0.2:100 이하, 0.4:100 이하, 0.8:100 이하, 1:100 이하, 2:100 이하, 4:100 이하, 8:100 이하, 10:100 이하, 20:100 이하, 40:100 이하, 50:100 이하, 60:100 이하, 70:100 이하, 80:100 이하, 90:100 이하, 1:1 이하 등인 DNA 바코드를 갖는 비드를 제공한다.

[0341] 수성 혼탁액 중에, 비드 집단은 기질, 예를 들면, 피코웰 어레이와 접촉할 수 있고, 이는 비드가 피코웰로 진입하고 이를 점유하는 것을 야기한다. 기질 중의 피코웰의 수에 대한 혼탁액 중의 비드의 수의 비율은 원하는 점유율에 도달할 때까지 조절될 수 있다. 예를 들면, 혼탁액이 오직 하나의 비드를 함유하는 경우, 비드를 함유하는 모든 피코웰은 오직 하나의 비드를 함유할 것이고, 나머지 피코웰은 임의의 비드를 함유하지 않을 것이다. 혼탁액이 20,000개의 비드를 함유하고, 기질이 200,000개의 피코웰을 함유하는 경우, 적어도 180,000개의 피코웰은 완전히 비드가 없을 것이고, 비드를 함유하는 대부분의 피코웰은 오직 하나의 비드를 함유할 것이다. 점유된 피코웰의 적은 퍼센트는 2개의 비드를 함유할 것이다.

[0342] 값 실시형태에 있어서, 피코웰 수에 대한 혼탁액 중의 비드 수의 비율은 약 0.2:100, 약 0.4:100, 약 0.6:100, 약 0.8:100, 약 1:100, 약 2:100, 약 4:100, 약 6:100, 약 8:100, 약 10:100, 약 20:100, 약 30:100, 약 40:100, 약 50:100, 약 60:100; 80:100, 약 100:100(1:1과 동일), 약 2:1, 약 4:1, 약 6:1, 약 8:1, 약 10:1 등일 수 있다.

[0343] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 값 또는 범위 중 하나에 속하는 임의의 방법 또는 시스템을 배제 할 수 있다.

[0344] 범위 실시형태에 있어서, 피코웰 수에 대한 혼탁액 중의 비드 수의 비율은 약 0.2:100 내지 약 0.4:100, 약 0.4:100 내지 약 0.6:100, 약 0.6:100 내지 약 0.8:100, 약 0.6:100 내지 약 1:100, 약 1:100 내지 약 2:100, 약 2:100 내지 약 4:100, 약 4:100 내지 약 6:100, 약 0.6:100 내지 약 8:100, 약 8:100 내지 약 10:100, 약 10:100 내지 약 20:100, 약 20:100 내지 약 30:100, 약 30:100 내지 약 40:100, 약 40:100 내지 약 50:100, 약 50:100 내지 약 60:100, 약 60:100 내지 약 80:100; 약 80:100 내지 약 100:100(1:1과 동일), 약 100:100(1:1과 동일) 내지 약 2:1, 약 2:1 내지 약 4:1, 약 4:1 내지 약 6:1, 약 6:1 내지 약 8:1, 약 8:1 내지 약 10:1 등일 수 있다.

[0345] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 값 또는 범위 중 하나에 속하는 임의의 방법 또는 시스템을 배제 할 수 있다.

(VIII) 피코웰의 제조

[0347] **피코웰 어레이 플레이트의 제조를 위한 UV 광, 포토마스크, 및 포토레지스트의 조합.** 다수의 마이크로웰 또는 피코웰을 포함하는 플레이트는 본 개시내용에서 사용을 위하여 하기와 같이 제조될 수 있다. 간략하게, 3개 층의 샌드위치가 조립된다. 상부 층은 포토레지스트이다. 중간 층은 유리 웨이퍼이다. 하부 층은 포토마스크이다. 피코웰은 UV 광으로 포토레지스트를 깎아서 만들어 질 것이다. 포토레지스트의 평평한 시트를 깎아 피코웰을 만든 후, 포토레지스트는 머핀을 굽기 위한 컵을 함유하는 전형적인 금속 팬과 유사하고, 여기서 머핀 반죽을 담기 위한 팬 안의 컵은 테두리가 각이 졌다. UV 광은 포토레지스트의 중합체를 파괴시키기 때문에 "교차되지 않은 링커"로서 작용한다. UV 처리 후, 용매를 가하여 UV 처리된 포토레지스트를 세척하고, 깨끗한 외양의 피코웰을 남긴다.

[0348] **비스듬히 회전시켜 각진 벽을 생성한다.** 각진 벽을 갖는 피코웰을 하기와 같이 생성한다. 포토마스크는 다수의 애페처를 갖고, 여기서 각각의 애페처는 피코웰이 원하는 하부 치수에 상응한다. 하부 치수는 원주, 직경, 및 형상, 즉 둥근 형상을 포함할 수 있다. 웰의 상부 치수는 광원을 회전시키거나 샌드위치(포토마스크/유리 웨이퍼/포토레지스트 샌드위치)를 잡고 있는 스테이지를 회전시키는 동안 포토마스크에서 애페처를 향한 각진 UV 광을 안내함으로써 생성된다. 회전에 있어서, 광원은 포토마스크/웨이퍼/포토레지스트 샌드위치에 대하여 90도 각도는 아니지만, 대신에 각각의 피코웰에 각진 벽을 깎아 만들기 위하여 90도 점으로부터 약간 각져있다. 그 결과 다수의 피코웰을 함유하는 피코웰 어레이 플레이트가 그대로 사용될 수 있다. 대안적으로, 이러한 피코웰 어레이 플레이트는 다수의 피코웰 어레이 플레이트의 비싸지 않은 생성을 위한 몰드로서 사용될 수 있다.

[0349] 한 등(Han et al)은 마이크로웰이 각진 벽을 갖는 마이크로웰 플레이트의 제조를 위한 장비 및 시약을 기재한다 (문헌[Han et al (2002) J. Semiconductor Technology and Science. 2:268-272] 참조). 기재된 것은 UV원, 접촉 스테이지, 텁팅 스테이지, 및 SU-8 포토레지스트이다. 제조는 단일 면 마감된 실리콘 웨이퍼와 함께 시작한다. SU-8 포토레지스트를 약 0.10 내지 0.15 mm의 두께로 웨이퍼 상에 코팅한다. 그 다음, 포토레지스트를 65°C의 핫 플레이트에서 10분 동안, 그 다음, 95°C의 핫 플레이트에서 30분 동안 약하게 베이킹한다. 수득된 포토레

지스트/웨이퍼 샌드위치를 접촉 스테이지를 사용하여 UV 마스크와 접촉시킨다. 용어 "기울어지고 회전된 UV 리소그래피"는 마이크로웰 어레이 플레이트 또는 피코웰 어레이 플레이트의 제조 방법을 나타내고, 여기서 각각의 웰은 각진 벽을 갖는다. 여기서, 웰의 바닥은 더 작은 직경을 갖고, 웰의 상부(여기서 웰의 상단 테두리는 플레이트의 평평한 표면을 만난다)는 더 넓은 직경을 갖는다. UV 광에 의한 노출을 위하여, 턴테이블을 사용하고, 여기서 UV 광은 입사한다(Han et al, 상기 참조). 마스크를 포토레지스트와 접촉시키고, 여기서 마스크에서 각각의 애피처는 원형이다. 문현[Han et al, 상기 참조]의 도 8은 UV 광, UV 마스크, 포토레지스트 구조, 웨이퍼 기판, 및 턴테이블의 방향의 사진을 제공한다, 문현[Han et al]에는 원뿔대를 제조하는 방법이 기재된다. 연성 물질, 예를 들면, PDMS(폴리다이메틸실록산)를 원뿔형 어레이에 붓고 경화시킬 수 있고, 그 위에 PDMS 층을 박리하여 원뿔형 웰을 형성한다.

[0350] **피코웰 어레이 플레이트의 대량 생산에서 사용을 위한 몰드의 생성.** 피코웰 어레이 플레이트가 제조된 경우, 에폭시를 플레이트 위에 부어 모든 피코웰을 채우고 채워진 모든 피코웰을 에폭시 플랫폼과 연결시킬 수 있다. 일단 에폭시가 고체화되면, 피코돌기(picoprotuberance)의 부착된 어레이를 갖는 고체 플랫폼을 제거한다(원하는 피코웰의 역상인 피코돌기). 피코돌기를 갖는 고체 플랫폼은 다수의 피코웰 어레이 플레이트의 제조에 사용될 수 있는 재사용 가능한 몰딩이다.

[0351] 에폭시 몰드로부터 복제물을 만들기 위한 방법(임의의 경성 물질로 만들어진 원뿔형 어레이 몰드는 "핫 엠보싱"으로 지칭된다). 간략하게, 기판 물질을 이의 유리 전이 온도 또는 연화 온도로 가열하고, 이 시점에서 피코돌기를 갖는 몰드를 열 연화된 물질에 대하여 균일하게 압축한다. 몰드는 피코돌기가 기판 물질로 피코-함입물로서 전달된 후 기질로부터 분리될 수 있다. 이러한 개시내용은 바람직하게는 몰드 및 기질의 패턴으로서 각각 피코-원뿔 및 피코웰을 개시한다.

[0352] 핫 엠보싱, 에폭시 마스터, 및 포토레지스트, 예를 들면, SU-8 포토레지스트가 기재된다(문현[Bohl et al (2005) J. Micromechanics and Microengineering. 15:1125-1130, Jeon et al (2011) Biomed Microdevices. 13:325-333; Liu, Song, Zong (2014) J. Micromechanics and Microengineering. 24: article ID:035009; del Campo and Greiner (2007) J. Micromechanics and Microengineering. 17:R81-R95] 참조).

[0353] **다른 마이크로웰 플레이트 실시형태.** 실리콘 몰드를 사용하여 열 형성 방식으로 플라스틱 마이크로웰 어레이를 제조할 수 있고, 여기서 실리콘 몰드는 마이크로웰의 어레이, 예를 들면, 800,000개의 마이크로웰의 어레이를 갖는다. 테이퍼링된 기하학 및 부드러운 측벽을 야기하는 고도의 조절 및 서브마이크론 내성을 비-펄스 건식 에칭 공정의 사용에 의해 생성될 수 있다. 대조적으로, 펄스 건식 에칭 공정을 사용하는 방법, 예를 들면, 보쉬(Bosch) 공정은 거친 측벽 및 에칭 동안 측면 치수에 대한 조절의 부족을 야기할 수 있다.

[0354] 비-펄스 건식 에칭 공정을 사용하여, 크롬 마스크를 사용하는 비-펄스 등방성 건식 에칭 공정에 의해 생성되는 실리콘 마스터 상에 플라스틱을 열 형성함으로써 플라스틱 어레이를 제조한다. 이러한 공정은 3종의 기체, Ar, SF₆, 및 C₄F₈를 사용한다. 공정은 1200 내지 2000 와트의 RF 출력 및 150 와트의 바이어스로 수행된다. 부드러운 측벽의 제조와 함께 실리콘 몰드의 테이퍼의 미세조정은 3종의 기체 사이의 기체 흐름을 다양하게 함으로써 달성될 수 있다. 다양해지는 것은 C₄F₈에 대한 SF₆의 비율이고, 여기서 비율의 변화의 결과는, 예를 들면, 18도(매우 비스듬한 벽), 9도(약간 비스듬한 벽), 또는 2도(기판에 거의 수직인 벽)의 각도에서 존재하는 몰드의 테이퍼링된 벽(실리콘 기둥)이다(문현[Perry, Henley, and Ramsey (Oct. 26-30, 2014) Development of Plastic Microwell Arrays for Improved Replication Fidelity. 18th Int. Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. San Antonio, TX (pages 1700-1703)] 참조).

[0355] 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 기판, 어레이, 그리드, 미세유체 장치 등을 제공하고, 이는 마이크로웰의 어레이를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 모든 마이크로웰은 본질적으로 동일한 부피를 갖는다. 이러한 부피는 약 1 펌토리터, 약 2, 약 4, 약 6, 약 8, 약 10, 약 20, 약 40, 약 60, 약 80, 약 100, 약 200, 약 400, 약 600 약 800, 또는 약 1,000 펌토리터일 수 있다.

[0356] 게다가, 부피는 상기 2개의 인접한 값 사이의 범위, 예를 들면, 약 40 펌토리터 내지 약 60 펌토리터의 범위의 형태를 가질 수 있다. 또한, 부피는 상기 목록에서 서로 바로 인접하지 않은 임의의 상기 2개의 값 사이의 범위의 형태를 가질 수 있다.

[0357] 추가로, 부피는 약 1 펌토리터, 약 2, 약 4, 약 6, 약 8, 약 10, 약 20, 약 40, 약 60, 약 80, 약 100, 약 200, 약 400, 약 600 약 800, 또는 약 1,000, 약 2,000, 약 5,000, 약 10,000, 약 20,000, 약 50,000, 약 100,000, 약 200,000, 약 500,000, 또는 약 1,000,000 펌토리터일 수 있다. 또한, 부피는 상기 목록에서 서로

바로 인접하지 않은 임의의 상기 2개의 값 사이의 범위의 형태를 가질 수 있다.

[0358] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 마이크로웰을 포함하는 임의의 기판, 또는 마이크로웰을 포함하는 임의의 어레이를 배제할 수 있고, 여기서 각각의 마이크로웰의 부피는 상기 값 중 하나에 의해 규정 가능하거나, 서로 인접한 임의의 상기 2개의 값의 범위에 의해 규정 가능하거나, 목록에서 서로 인접하지 않은 임의의 상기 2개의 값의 범위에 의해 규정 가능하다.

[0359] **피코웰 상의 구형 플러그(또한 캡핑 비드로도 공지됨).** 본 개시내용은 피코웰 어레이의 각각 및 모든 웰, 또는 실질적으로 모든 웰에 대하여 구형 플러그, 또는 대안적으로, 다공성 구형 플러그를 제공한다. 플러그의 목표는 웰의 내부에 약물, 약물 후보, 세포 내용물, 및 대사물질을 유지하는 것이다. 플러그는 또한 피코웰의 내용물이 서로 단리되는 것을 돋는다. 구형 플러그는 피코웰의 상부(또는 개구, 또는 입구)를 덮는 목표가 만족될 수 있는 한, 완전히 구형일 필요는 없을 수 있다. 웰은 상부 직경 및 하부 직경을 가질 수 있다. 구형 플러그의 직경은, 웰을 캡핑하기 전에, 약 10 마이크로미터, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 70, 약 90, 약 120 또는 약 200 마이크로미터이다. 플러그는 이들을 단순하게 피코웰 어레이 위에 흐르게 함으로써 피코웰을 덮도록 첨가될 수 있다. 원심분리, 압력, 교반 또는 다른 방법을 사용하여 비드를 피코웰의 상부(또는 입구 또는 개구)에 밀어넣어 단단한 밀봉을 보장할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 용매를 사용하여 팽창 및/또는 캡핑 비드의 크기를 개질할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드를 수축된 비드를 부여하는 용매 중에 로딩할 수 있고, 검정 버퍼, 또는 상이한 용매로 교체된 후, 캡핑 비드는 이의 원래 크기로 복구되거나 팽창되고, 이로써 피코웰을 단단하게 밀봉한다. 몇몇 실시형태에 있어서 온도를 사용하여 캡핑 비드를 팽창시키거나 수축시켜 피코웰의 입구에 우수한 밀봉을 수득할 수 있다. 필요한 경우, 캡핑 비드는 그 자리에 유지될 수 있고, 단계식 피코웰 어레이에서 단계 중 하나에 의해 피코웰에 추가로 떨어지는 것이 방지될 수 있다.

[0360] 캡핑 비드는 본 개시내용의 화합물을 담지하는 동일한 유형의 비드일 수 있거나, 상이한 유형의 비드일 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 실제로 비드 그 자체를 갖는 화합물일 수 있다. 캡핑 비드는 수동형 캡으로서 제공되어, 피코웰 밖으로의 분자의 확산을 방지하거나 늦출 수 있거나, 비드는 캡핑 비드에 부착된 작용성 잔기가 피코웰로부터 시약을 포획하는데 사용될 수 있는 능동적 비드일 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 다공성 캡핑 비드는 피코웰 내부에서 수행되는 세포 기반의 검정으로부터 방출되는 대사물질을 수동적으로 가둘 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 세포성 물질, 예를 들면, 지질, 단백질, 탄수화물 및 핵산을 불특정하게 포획할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 항체에 의해 작용화되어 건강하거나, 질환이 있거나, 용해되거나, 고정된 세포로부터 방출된 단백질을 특정하게 포획할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 세포성 핵산을 특정하게 포획하는 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 의해 작용화될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, DNA 또는 RNA 작용화된 캡핑 비드는 캡핑된 피코웰 내의 세포로부터 방출된 마이크로RNA를 포획하는데 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 피코웰은 2개의 비드, 피코웰 내에 비드를 함유하는 화합물, 및 피코웰의 입구를 덮는 캡핑 비드를 함유한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 또한 화합물 함유 비드이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 화합물 비드로부터 방출된 물질을 포획한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 화합물-비드로부터 방출된 DNA 바코드를 포획한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드는 이들이 캡핑하는 피코웰 내로부터 방출된 상이한 유형의 피분석물을 포획한다.

[0361] **캡 및 피코웰의 비교 경도.** 바람직한 장치는 마이크로타이터 플레이트이고, 여기서 각각의 마이크로타이터는 이의 하부 표면에 수천 개의 피코웰을 포함한다. 각각의 피코웰에 적절하게 위치하거나 이를 밀봉하는 캡의 능력은 캡의 경도에 관하여 피코웰의 애피처 및 피코웰의 내벽을 구성하는 플라스틱의 경도의 함수일 수 있다.

[0362] 플라스틱의 경도는 "듀로미터" 값으로 정의될 수 있다. 경도는 자국에 대한 물질의 저항성으로서 정의되고 시험된다. 구형 플러그의 경도, 및 피코웰의 벽의 경도는 이의 "듀로미터"로 정의될 수 있다. 경도는, 예를 들면, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75, 약 80, 약 85, 약 90, 약 95, 또는 약 100일 수 있다. 플라스틱 성분 또는 다른 성분에 대한 임의의 이러한 듀로미터 값을 볼 때, 또한 어떤 등급을 사용하는지 기재하여야 한다. 예를 들면, 등급은 더 연성인 물질에 사용되는 ASTM D2240 A형 등급, 또는 더 경성인 물질에 사용되는 ASTM D2240 D형 등급일 수 있다(문헌[Silicon Design Manual, 6th ed., Albright Technologies, Inc., Leominster, MA] 참조).

[0363] **피코웰의 형상.** 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 원통의 직경이 피코웰의 상부와 하부에서 대체로 유사한 원통형 피코웰일 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 약간의 테이퍼를 가질 수 있고, 피코웰의 상부는 피코웰의 하부보다 약간 더 클 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 원뿔형 피코웰일 수 있고, 1도 내지

30도 사이의 어느 곳에서 정상적인 각도를 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 단계식 피코웰이고, 여기서 피코웰은 상부 직경으로부터 하부 직경으로 불연속 단계를 갖는다(상부로부터 하부로 부드럽게 이의 직경이 변화하는 원뿔형 피코웰과는 반대로). 몇몇 실시형태에 있어서, 단계식 피코웰은 피코웰의 개구 근처에 더 넓은 원통 및 피코웰의 하부 근처에 더 좁은 원통을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단계식 피코웰은 상부로부터 하부로 다중 불연속 단계를 가질 수 있다. 다단계식 피코웰의 몇몇 실시형태에 있어서, 모든 단에서 직경은 이의 아래 단의 직경보다 클 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 작은 비드는 단계식 피코웰의 하부에 위치할 수 있고, 캡핑 비드는 단계식-피코웰의 가장 상부의 개구에 위치할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 피코웰은 2개 이상의 비드를 함유할 수 있다.

[0364] 단계식-피코웰의 제조 방법. 도 29는 단계식 피코웰을 개시한다. 나타낸 실시형태는 3개의 구획 및 2개의 단계를 갖는다. 상부 구획은 가장 넓고, 피코웰이 캡핑된 상황에서 상부 구획의 대부분이 캡에 의해 점유되는 캡을 수용하도록 구성된다. 중간 구획은 시약으로 주로, 또는 단독으로 점유되도록 구성된다. 시약은 베퍼, 효소 기질, 하나 이상의 염, 및 보존제 또는 안정화제, 예를 들면, 디아티오토레이틀, RNase 억제제, 글리세롤, 또는 DMSO를 포함할 수 있다. 가장 낮은 구획은 비드, 즉, DNA 라이브러리 및 방출 가능한 화합물을 다와 커플링된 비드에 의해 점유되도록 구성된다. DNA 바코드 및 방출 가능한 화합물을 함유하는 것 이외에, 동일한 비드는 또한 "반응 포획 요소"를 함유할 수 있다. 캡핑 비드는 그 자리에 유지될 수 있고, 단계식 피코웰에서 단계 중 하나에 의해 피코웰에 추가로 떨어지는 것이 방지될 수 있다. 도 29에서, 구조 1은 캡이고, 구조 2는 비드이고, 구조 3은 상부 영역이고, 이는 제1 단계 바로 위에 위치한다. 구조 4는 중간 영역이고, 이는 검정 시약을 놓는데 사용될 수 있다. 중간 영역은 제2 단계의 바로 위다. 중간 영역에서 검정 시약은 가장 낮은 영역으로 확산될 수 있다. 구조 5는 가장 낮은 영역이고, 이는 비드를 놓고 하나 이상의 세포를 놓는데 사용될 수 있다.

[0365] 비드가 차지한 가장 낮은 구획의 공간에 관하여(오직 하나의 비드가 피코웰 내에 존재한다고 추정), 비드의 직경은 가장 낮은 구획의 직경의 가장 낮은 구획의 직경(피코웰이 원형 웰인 것으로 추정)의 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 98%일 수 있다. 피코웰이 원형 웰이 아닌 경우, 상기 값은 웰의 가장 넓은 치수를 나타낼 수 있다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 임의의 상기 파라미터를 만족시키지 않는 임의의 시스템 또는 비드를 배제할 수 있다.

[0366] 추가로 비드가 차지한 공간에 관하여(오직 하나의 비드가 피코웰 내에 존재한다고 추정), 비드의 약 50%는 가장 낮은 구획에 있고, 동일한 비드의 약 50%는 중간 구획에 있고, 여기서 이러한 파라미터는 또한 약 55%가 가장 낮은 구획 및 약 65%가 중간 구획; 약 60%가 가장 낮은 구획 및 약 40%가 중간 구획; 약 65%가 가장 낮은 구획 및 약 45%가 중간 구획; 약 70%가 가장 낮은 구획 및 약 30%가 중간 구획; 약 75%가 가장 낮은 구획 및 약 25%가 중간 구획; 약 80%가 가장 낮은 구획 및 약 20%가 중간 구획; 약 85%가 가장 낮은 구획 및 약 15%가 중간 구획; 약 90%가 가장 낮은 구획 및 약 10%가 중간 구획; 약 95%가 가장 낮은 구획 및 약 5%가 중간 구획; 약 100%가 가장 낮은 구획에 있을 수 있다. 이러한 계산을 만들기 위하여, 비드가 차지하는 공간은 비드가 다공성이 아닌 것으로 추정된다(이론상). 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 임의의 상기 파라미터를 만족시키지 않는 임의의 시스템 또는 비드를 배제할 수 있다.

[0367] 원뿔형 및 원통형 피코웰과 마찬가지로, 몰딩 시스템의 사용은 단계식 피코웰을 생성하기 위한 하나의 바람직한 실시형태이다. 이러한 목적을 위하여, 다중 기둥의 어레이를 함유하는 몰드가 바람직하고, 따라서 열가소성 또는 다른 경화성 중합체 기판 내에 압박에 의해, 단계식 피코웰의 자국이 형성될 수 있다. 상이한 직경(위로 올라갈수록 작아짐)의 각 단계가 있는 다중 단계의 적층 기둥 어레이는 다중 리소그래피 공정에 의해 형성될 수 있다. 간략하게, 포토레지스트의 제1 층은 제1 마스크를 통해 노출되어 마이크로기둥 어레이의 제1 층을 가교결합시킨다. 포토레지스트의 제2 층은 (미리 노출된) 제1 층 상에 직접적으로 위치할 수 있고, 제2 포토마스크는 나중에 제2 포토레지스트 내의 제2 패턴 등을 가교결합하는데 사용될 수 있다. 다중 패턴화의 종료시, 레지스트의 스택은 현상되어 가교결합되지 않은 영역을 세척하여, 다중 기둥의 어레이를 남길 수 있다. 다중 기둥 어레이를 생성하는 상세한 프로토콜은 문헌[Francisco Perdigones et al., (January 8th, 2011). Microsystem Technologies for Biomedical Applications, Biomedical Engineering, Trends in Electronics Anthony N. Laskovski, IntechOpen]에서 찾을 수 있다. 다중 기둥 어레이의 어레이가 생성된 후, 표준 공정은 몰드를 사용하여 단계식 피코웰 어레이를 각인하는데 사용될 수 있다.

[0368] 캡핑 비드의 제거. 많은 실시형태에 있어서 캡핑 비드를 샘플링해 피코웰 내의 화학적 섭동에 대한 반응, 피분석물 또는 세포성 반응을 연구하는 것이 유리하다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰 어레이를 뒤집고 기계적 교

반을 사용하여 캡핑 비드를 피코웰의 입구로부터 떨어지게 할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 용매를 사용하여 피코웰을 수축시켜, 이들이 피코웰의 입구로부터 잘 떨어지게 만들 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드보다 더 높은 밀도의 액체를 피코웰 어레이의 상부에 가하여, 캡핑 비드가 부력에 의해 뜨고 고밀도 매질의 맨 위에 부유하도록 한다.

[0369] 몇몇 실시형태에 있어서, 캡핑 비드를 서로 가교결합시켜 캡핑 비드를 피코웰 어레이의 상부를 박리시킬 수 있는 캡핑 시트로 전환시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 가교결합 젤을 캡핑된 피코웰에 부을 수 있고, 여기서 가교결합 젤은 캡핑 비드 및 그 자체를 가교결합시키고, 이는 캡핑 비드가 박리될 수 있는 가교결합된 시트에 포매되는 것을 야기한다.

[0370] **박리 층의 형태인 피코웰의 상대적인 위치의 보존.** 캡핑 비드가 박리될 수 있는 젤 층으로 휘말릴 수 있는 이러한 실시형태에 있어서, 캡핑 비드의 서로에 대한, 그리고 피코웰에 대한 상대적인 위치는 박리 층에서 보존된다는 것을 인식하여야 한다. 이는 피코웰, 피코웰에서 검정, 피코웰에서 비드, 및 캡핑 비드에 포획된 임의의 물질 사이의 직접적인 연결을 허용한다.

[0371] 몇몇 실시형태에 있어서, 기준 마커를 사용하여 박리 층에서 캡핑 비드에 대한 피코웰 어레이의 상대적인 특징을 지향할 수 있다.

[0372] **피코웰의 등록 및 정렬을 가능하게 하는 기준 마커.** 불규칙적인 어레이에서 피코웰의 배열은 피코웰 어레이의 영상화 동안 변화 및 이동의 용이한 확인을 허용한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 영상화 동안 광학 및 기계적 이동의 검출을 촉진하기 위하여 불규칙적으로 배열된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰 어레이는 영상화 동안 변화 및 이동을 확인하는 것을 돋는 기준 마커를 함유한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 기준 마커는 피코웰 어레이의 피코웰 사이에 산재된 형상, 패턴 또는 특징을 용이하게 확인할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 작은 수의 피코웰은 그 자체로 영상화 동안 광학 또는 기계적 이동의 경우에 용이한 등록을 가능하게 하는 용이하게 확인 가능한 패턴으로 배열될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 외부 마커, 예를 들면, 형광성 비드를 피코웰 어레이에 부어 기준 패턴을 제공할 수 있다.

[0373] **캡이 없는 매트 실시형태.** 캡이 없는 매트 실시형태는, 적어도 몇몇 형태 또는 예에 있어서, "캡이 없는 필름"의 형태를 가질 수 있다. 예를 들면, 피코웰 내에 있을 수 있는 임의의 세포 배양 배지 또는 효소 검정 배지의 증발을 방지하기 위하여, 피코웰의 상부에서 개구를 밀봉하는 대신에, 밀봉은 매트를 통해 달성될 수 있다. 바람직하게는, 매트는 주어진 피코웰 어레이에서 모든 피코웰을 덮는 크기이다. 대안적으로, 매트는 어레이에서 피코웰의 미리 결정된 분획을 덮는 크기일 수 있다. 매트는 피코웰 플레이트의 상부에 고정될 수 있고, 이는 피코웰을 덮고, 피코웰 사이에 존재하는 피코웰 플레이트의 일반적으로 평면 상부 표면을 덮는다. 고정 접촉은 다음 중 하나 이상에 의해 달성될 수 있다: (i) 예를 들면, 매트의 상부 위에 있고 이에 중량을 제공하는 경질 고무 압판에 의한 일정한 압력 유지; (ii) 중량, 예를 들면, 경질 고무 압판에 연결되는 매트의 사용; (iii) 전체 매트에 적용될 수 있는 가역적인 화학적 접착제(매트가 흡수성 매트가 아닌 상황). 매트가 흡수성 매트인 경우, 매트는 가역적인 화학적 접착제로 둘러싸인 원형 흡수성 패드를 함유한다. 여기서, 매트는 피코웰 어레이와 접촉하고, 원형 흡수성 패드가 각각의 피코웰의 개구만을 덮고 개구 위에 "흘러넘쳐" 피코웰 플레이트의 평면 표면을 접촉하지 않도록 정렬된다.

[0374] 피코웰 플레이트의 실질적으로 평면인 표면의 접촉, 및 피코웰의 캡이 없는 밀봉에서 사용을 위하여, 매트로서 사용을 위한 막이 이용 가능하다. 평평한 시트 막, 예를 들면, 다우 필름 텍스(Dow Film Tex), GE 오스모닉스(GE Osmonics), 마이크로딘 나디르(Microdyn Nadir), 토레이(Toray), 트리세프(TriSep), 사인더(Synder), 노바멤(Novamem), 에보니크(Evonik), 및 아쿠아포린 플래트(Aquaporin flatt) 시트 막이 스테를리텍 코프(Sterlitech Corp, 미국 워싱턴주 켄트 소재)로부터 이용 가능하다. 이들은 폴리아마이드-TFC, 셀룰로스 아세테이트, 폴리아마이드-우레아-TFC, 셀룰로스 아세테이트 블렌드, 폴리피페라진-아마이드-TFC, PES, 복합체 폴리아마이드-TFC, PES, PAN, PVDF, PSUH, RC, PESH, 폴리에터 에터 케톤, 폴리아미드 등으로 만들어진 막을 포함한다. 문자량 컷오프의 면에서 기공 크기는 150 Da, 200 Da, 300 Da, 500 Da, 900 Da, 600 Da, 1,000 Da, 2,000 Da, 3,000 Da, 5,000 Da, 10,000 Da, 50,000 Da, 20,000 Da, 30,000 Da 70,000 Da, 100,000 Da, 200,000 Da, 300,000 Da, 400,000 Da, 500,000 Da, 800, 000 Da, 3500 Da, 0.005 마이크로미터, 0.030 마이크로미터, 0.05 마이크로미터, 0.10 마이크로미터, 0.20 마이크로미터 등을 포함한다. 본 개시내용의 시스템, 조성물, 시약 및 방법에 관하여, 이러한 컷오프 값은 다른 부류의 화합물을 배제한 특정한 부류의 화합물의 선택적 컬렉션을 가능하게 할 수 있다. 예를 들면, 상기 막 중 몇몇은 단백질 및 다른 거대분자를 배제하면서 소분자 대사물질이 흡수성 매트를 통과하게 이에 의해 흡수되게 할 수 있다. 물, 금속 이온, 염, 대사물질, 단백질, 및 혼산을 포

함하는 모든 분자에 불투과성인 평평한 시트 막이 또한 본 개시내용의 시스템, 조성물 및 방법에서 사용을 위하여 이용 가능하다.

[0375] 가역적인 접착은 "분자 벨크로", 예를 들면, 피리딘-함유 중합체를 갖는 메탈로포르파린 함유 중합체에 의해 매개될 수 있다(Sievers, Namyslo, Lederle, Huber (2018) eXPRESS Polymer Letters. 12:556-568). 다른 분자 벨크로 접착제는 L-3,4-di하이드록시페닐 알라닌, ssDNA의 상보적 가닥(하나의 유형의 ssDNA는 피코웰 플레이트의 평평한 위 표면에 공유적으로 부착되고, 다른 유형의 ssDNA는 매트에 공유적으로 부착됨), 카테콜 측쇄를 함유하는 공중합체 등을 포함한다(Sievers, et al, 상기 참조)를 포함한다. 또한, 가역적인 접착은 갈륨 접착제에 의해 매개될 수 있고, 여기서 접착 정도는 약간의 온도 변화에 의해 조절될 수 있다(Metin Sitti(May 18, 2016) Switch and Stick). 화학적 원소 갈륨은 이의 접착제 효과가 쉽게 온 오프가 변환되도록 하는 신규한 가역적 접착제로서 사용될 수 있다(Max-planck-Gesellschaft). 또 다른 가역적인 접착제는 DSM-니아가 테크놀로지(DSM-Niaga Technology, 네덜란드 즈볼레 소재)로부터 이용 가능하다.

[0376] 흡수제 성분(비-특이적 흡수제; 특이적 흡수제). 매트에 도입되어 흡수제 특성을 제공할 수 있는 흡수제 성분은 "분자체" 비드, 예를 들면, 세파로스(Sepharose)®, 세파덱스(Sephadex)®, 아가로스(Agarose)®뿐만 아니라 DEAE 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 포스포셀룰로스, 또는 상기의 임의의 조합으로 만들어진 이온 교환 비드를 포함하고, 모두 하나의 흡수성 매트에 조합된다. 흡수제 리간드는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)(바이오라드(BioRad) 카탈로그 참조, 미국 캘리포니아주 에루큘레스 소재)에서 사용되는 것들을 포함한다. 특이적 흡수제는 폴리A 꼬리와 혼성화되어 mRNA를 포획할 수 있는 반응-포획 요소, 예를 들면, 폴리(dT)를 포함한다. 또한, 반응 포획 요소는 엑손-표적화 RNA 프로브, 항체, 및 앱타머를 포함한다. 각각 또는 이들의 임의의 조합은 매트에 공유적으로 부착되어, 흡수성 매트를 생성할 수 있고, 여기서 흡수성 매트를 피코웰의 상부 표면에 접촉시키는 것은 피코웰 내부에 있을 수 있는 수성 검정 배지 또는 수성 세포 배양 배지의 포획을 가능하게 한다.

(IX) 비드의 피코웰로의 접착

[0378] 피코웰을 갖는 플레이트는 96-웰 플레이트의 형태를 가질 수 있고, 여기서 이러한 96 웰은 수천 개의 피코웰을 함유한다. 또한, 피코웰을 갖는 플레이트는 24-웰 플레이트의 형태를 가질 수 있고, 여기서 각각의 이러한 24웰은 수천 개의 피코웰을 함유한다. 96-웰 플레이트에 있어서, 각각의 웰은 물 또는 수성 용액 중의 비드의 혼탁액 0.1 내지 0.2ml를 사용하여 채워질 수 있다. 24-웰 플레이트에 있어서, 각각의 웰은 물 또는 수성 용액 중의 비드의 혼탁액 약 0.5ml를 사용하여 채워질 수 있다. 혼탁액은 일회용 팁이 있는 일반적인 피펫을 사용하여 첨가될 수 있다. 혼탁액 중에 있는 비드의 수는 오직 1개의 비드를 함유하는 피코웰의 약 3분의 1, 2개의 비드를 함유하는 피코웰의 약 3분의 1, 비드를 함유하지 않거나 2개 이상의 비드를 함유하는 피코웰의 약 3분의 1을 야기하는 것일 수 있다. 또한, 혼탁액 중의 비드의 수는 오직 1개의 비드를 함유하는 이러한 웰의 하나 이상의 비드, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%를 함유하는 웰의 상황을 야기할 수 있다.

[0379] 비드가 침강된 후, 임의의 과량의 액체는 96 웰 플레이트의 각각의 웰의 벽에 피펫 팁을 접촉하거나, 24 웰 플레이트의 각각의 웰의 벽에 피펫 팁을 접촉하여, 과량의 액체를 빼냄으로써 제거될 수 있다.

[0380] 검정 시약에 관하여, 피코웰이 반응, 예를 들면, DNA 시퀀싱, 생화학적 검정, 또는 배양된 세포의 검정을 수행하는데 사용되는 경우, 검정 시약은 침강된 비드를 이미 함유하는 피코웰에 첨가될 수 있다. 검정 시약의 첨가는 비드 혼탁액의 초기 첨가에 대하여 상기 기재된 바와 같이 피펫에 의한다. 검정 시약이 각각의 피코웰에 이미 있는 용매와 평형을 이룬 후, 96-웰 플레이트의 96 웰 각각에 있는 임의의 과량의 용액, 또는 24-웰 플레이트의 24 웰 각각에 있는 임의의 과량의 용액은 96 웰 플레이트의 각각의 96 웰의 벽에 피펫 팁을 접촉하거나, 24 웰 플레이트의 각각의 24 웰의 벽에 피펫 팁을 접촉하여 빼낼 수 있다.

[0381] 피코웰 어레이의 플로우-셀 실시형태. 피코웰 어레이는 플로우-셀의 부분일 수 있고, 여기서 유입구 및 배출구가 있는 유체 챔버는 피코웰 어레이의 상부에 삽입된다. 이러한 실시형태에 있어서, 이러한 개시내용의 비드, 세포, 및 다른 검정 물질은 유입구로부터 배출구를 통해 흐를 수 있다. 이들이 플로우 셀을 통해 흐름에 따라 비드를 피코웰로 보내는데 중력 또는 원심력을 사용할 수 있다.

(X) 피코웰에서 시퀀싱 비드-결합된 핵산

[0383] 비드-결합된 핵산은 여전히 비드에 부착된 채로 시퀀싱될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 비드-결합된 핵산은 비드로부터 DNA 바코드의 절단 후 시퀀싱될 수 있다.

[0384] 시퀀싱 전에 비드로부터의 DNA 바코드의 절단. 몇몇 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 비드-결합된 DNA 바코드

를 비드로부터 절단하여, 증폭 전에, 또는 시퀀싱 전에, 또는 임의의 유형의 서열 동정 기술, 예를 들면, 핵산 프로브와의 혼성화 전에, DNA 바코드를 가용성 형태로 방출하는 방법을 포함할 수 있다.

[0385] 배제 실시형태. 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 비드-결합된 DNA 바코드가 증폭 전에, 또는 시퀀싱 전에, 또는 임의의 유형의 서열 동정 기술, 예를 들면, 핵산 프로브와의 혼성화 전에, 절단되는 임의의 방법, 연관된 시약, 시스템, 조성물, 또는 비드를 배제할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 증폭 전에, 또는 시퀀싱 전에, 또는 임의의 유형의 서열 동정 기술, 예를 들면, 핵산 프로브와의 혼성화 전에, DNA 바코드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 절단되거나 DNA 바코드의 부분만을 포함하는 핵산이 절단되는 임의의 방법을 배제할 수 있다.

[0386] 중합효소 연쇄 반응(PCR); 정량적 PCR(qPCR). PCR 방법뿐만 아니라 qPCR 방법은 다음을 포함하는 3-단계 방법에 의존한다: (1) 고온에서 DNA 주형을 변성시키고, 감소된 온도에서 프라이머를 어닐링하고, 최종적으로 DNA 중합효소에 의해 촉매 작용되는 DNA 합성을 통하여 프라이머를 연장한다(Gadkar and Filion (2014) Curr. Issues Mol. Biol. 16:1-6). qPCR은 또한 "실시간 PCR"로도 지칭된다(Kralik and Ricchi (2017) Frontiers Microbiology. 8(9 pages).

[0387] PCR 방법 및 qPCR 방법에서 최근 변화 또는 개선은 헬리카제-의존성(HDA) 증폭의 사용, 내부 증폭 조절의 사용, 잠금 핵산(LNA)의 사용, 및 억제제에 결합하는 첨가제의 사용을 포함한다(Gadkar and Filion (2014) Curr. Issues Mol. Biol. 16:1-6). 잠금 핵산은 극도로 정밀하게 이의 표적을 인식하고 이에 결합하는 이점을 제공한다.

[0388] qPCR은 표적화된 DNA 분자의 동시적인 증폭 및 정량을 허용한다. qPCR 방법은 특정한 형광 한계점을 도달하는 반응 곡선에 필요한 증폭 주기의 수를 비교한다(Pabinger, Rodiger, Kriegner (2014) Biomolecular Detection Quantification. 1:23-33). 레프슬랜드 등(Refsland et al)은 qPCR을 수행하기 위하여 명백하게 전형적인 조건의 간단한 설명을 제공한다(Refsland, Stenglein, Harris (2010) Nucleic Acids Res. 38:4274-4284).

[0389] 지침은 PCR 프라이머의 설계 및 입증, 및 어닐링 온도(T_a), 용융 온도(T_m), 신장 단계의 온도, 베퍼의 유형과 같은 변수에 대하여 이용 가능하다(Bustin and Huggett (2017) Biomolecular Detection Quantification. 14:19-28).

[0390] 회전환 증폭(RCA). DNA는 비드에 부착된 채로 증폭될 수 있다. 증폭된 형태의 DNA는 증폭되지 않은 DNA를 시퀀싱하는 것보다 더 쉽다. 회전환 증폭 방법에서, DNA 태그(DNA 바코드)는 단일 가닥으로 만들어진다. 단일 가닥으로 만든 후, 스플린트 올리고를 가하여 태그 DNA의 말단에 브리지 연결하고, 그 다음, 스플린트 올리고의 연장을 촉매 작용한 후 결찰 가능한 접합부를 보장한다. 그 다음, 가닥-교체 DNA 중합효소, 예를 들면, phi29 DNA 중합효소를 가하여 환형화된 DNA에 회전환 증폭을 수행할 수 있다. DNA 바코드 태그에 대하여 회전환 증폭(RCA)을 수행하는 능력은 임의의 생존 DNA 분자가 용이하게 시퀀싱되는데 충분한 양으로 열적으로 증폭될 수 있기 때문에, DNA를 손상시킬 수 있는 합성 화학의 사용을 허용한다. DNA는 액소뉴클레아제 소화, 닉킹(nicking), 및 고온에서의 용융, 또는 수산화나트륨에 의한 처리에 의해 단일 가닥으로 만들어질 수 있다.

[0391] 회전환 증폭(RCA)의 추가의 세부사항은 RCA를 수행하는데 사용될 수 있는 하기 단계에 의해 드러난다.

[0392] 단계 1: 비드-결합된 ssDNA로 출발한다. 비드-결합된 DNA가 초기에 이중 가닥 형태(dsDNA)인 경우, RCA에 사용되지 않는 가닥은 비드-부착 말단에 또는 이에 매우 가깝게, 티민(T) 잔기가 유라실(U) 잔기로 교체되도록 제조될 수 있다. dsDNA가 이러한 방식으로 제조되는 경우, 유라실-N 글리코시다제는 유라실 잔기를 절단하는데 사용될 수 있고, 이에 따라 불안정한 당 포스페이트(DNA 골격의 부분으로서)를 남기고, 여기서 이러한 불안정한 위치는 뉴클레아제-처리에 의해 절단될 수 있다(Ostrander et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:3419-3423).

[0393] 단계 2: "스플린트 올리고"를 비드--결합된 ssDNA에 가한다. 스플린트 올리고는 비드에 공유적으로 커플링되는 ssDNA의 말단(5'-말단)에서 약 10 내지 20개의 염기 쌍에 혼성화되고, 비드-결합된 ssDNA의 유리 말단(3'-말단)에서 약 10 내지 20개의 염기 쌍에 혼성화되도록 설계된다. 스플린트 올리고는 ssDNA의 비드-결합된 말단을 비드-결합된 ssDNA의 유리 말단에 가깝게 인접하게 만들 필요가 없다. 필요한 모든 것은 거대한 루프를 형성하기 위하여 함께 테더링되는 비드-결합된 ssDNA 서열의 면 말단이다.

[0394] 단계 3: 하나의 말단에서 스플린트 올리고에 공유적으로 부착되는 상보적인 거대한 루프를 형성하기 위하여, 설포로부스 DNA 중합효소 IV를 가하여, 이러한 중합효소가 주형으로서 ssDNA의 거대한 루프를 사용하도록 한다.

[0395] 단계 4: 상보적 거대한 루프에 공유적으로 가깝게 DNA 리가야제를 사용하고, 여기서 결과는 원형 ssDNA이다. 이

는 RCA 동안 "회전"하는 ssDNA의 이러한 폐쇄된 원이다.

[0396] 단계 5: 가닥 교체 활성을 갖는 DNA 중합효소를 가하고, dNTP를 가한다. 첨가된 DNA 중합효소는 dNTP를 비드-결합된 ssDNA에 공유적으로 부착시키고, 비드-결합된 ssDNA의 원위 말단은 연장되어 "회전환" 상에 있는 것의 상보적 카피를 생성한 다음, 추가로 연장되어 "회전환" 상에 있는 것의 또 다른 상보적 카피를 생성하고, 심지어 더 연장되어 "회전환" 상에 있는 것의 또 다른 상보적 카피를 생성한다. 잠재적으로 무한한 증폭의 이러한 공정 동안, DNA 중합효소의 연속된 활성은 DNA 중합효소의 가닥 교체 활성을 의해 가능해진다.

[0397] 선택적으로, 본 개시내용의 방법은 형광성 분자 비콘을 통한 회전환 증폭(RCA)의 실시간 모니터링을 포함한다 (Nilsson, Gullberg, Raap (2002) Nucleic Acids Res. 30:e66 (7 pages)). RCA를 위한 시약은 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재), 사이그니스 트루프라임 테크놀로지(Sygnis TruePrime Technology)(트루프라임(TruePrime)® RCA 키트, 독일 하이델베르크 소재), 및 GE 헬쓰케어(GE Healthcare)(템플리피(TempliPhi) 500® 증폭 키트)로부터 이용 가능하다. 형광단 및 소광제는 씨모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재), 몰라큘라 프로브스(Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진 소재), 카이만 케미칼(Cayman Chemical, 미국 미시간주 앤아버 소재), 및 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)로부터 이용 가능하다.

[0398] 단계 6. PCR 증폭을 위하여 주형으로서 RCA에 의해 증폭된 ssDNA를 사용하고, 여기서 프라이머가 첨가되고, 여기서 열안정성 DNA 중합효소가 첨가되고, 여기서 PCR 생성물을 차세대 시퀀싱에 의해 후속적으로 시퀀싱된다.

[0399] 본 개시내용의 하나의 측면에 있어서, RCA-증폭된 ssDNA는 PCR 생성물을 만드는 PCR 증폭 전에 비드로부터 절단된다. 본 개시내용의 또 다른 측면에 있어서, PCR 생성물을 만드는 PCR 증폭은 비드로부터 RCA-증폭된 ssDNA를 절단하지 않고 만들어질 수 있다.

[0400] 바너 등(Baner et al)에 의해 기재된 바에 따르면, "RCA 반응을 통해, 환형화된 분자에 보체의 다수의 텐덤 카피를 나타내는 가닥이 생성될 수 있다"(Baner, Nilsson, Landegren (1998) Nucleic Acids Res. 26:5073-5078). 바실러스 서브틸스(*Bacillus subtilis*) 상 phi29 DNA 중합효소는 이의 가닥 교체 활성 및 높은 처리성 때문에 적합한 효소이다. RCA는 리 등(Li et al)에 의해 "RCA에서, 원형 주형은 가닥 교체 성질을 갖는 DNA 중합효소 phi29에 의해 ... 등온적으로 증폭된다"고 유사하게 특성화된다. 긴 단일-가닥 DNA 생성물은 수천 개의 서열 반복을 함유한다(Li and Zhong (2007) Anal. Chem. 79:9030-9038).

[0401] 본 개시내용의 DNA 바코드의 시퀀싱은, 임의의 제한을 암시하지 않고, 본 명세서에 그 전문이 참조로서 포함되는 미국 특허 제8,632,975호(Vander Horn)의 방법에 의할 수 있다. 또한, 본 개시내용의 DNA 바코드는, 예를 들면, 합성에 의한 시퀀싱, 예를 들면, 상거(Sanger) 시퀀싱 방법, 또는 "차세대 시퀀싱"을 사용하는 방법에 의해 시퀀싱될 수 있다.

[0402] **DNA 시퀀싱을 위한 일루미나(Illumina) 방법.** DNA 시퀀싱을 위한 일루미나 방법은 하기와 같다. DNA는 초음파 처리에 의해 100-400개의 염기 쌍(bp)의 크기 범위로 단편화될 수 있다(Hughes, Magrini, Demeter (2014) PLoS Genet. 10:e1004462). 일루미나 방법에서, 세포 또는 세포들로부터의 DNA가 DNA 어댑터(단편의 말단에 부착됨)에 의해 개질되는 경우, DNA 라이브러리가 만들어진다. 반응 생성물은 샌드위치 형태를 갖고, 여기서 시퀀싱되는 DNA는 샌드위치의 중심에 있다. 반응 생성물은 (제1 어댑터)-(시퀀싱되는 DNA)-(제2 어댑터)의 형태를 갖는다. 그 다음, 어댑터-DNA-어댑터 복합체는 또 다른 어댑터와 연관되고, 여기서 이러한 다른 어댑터는 고체 표면에 공유적으로 부착된다. 고체 표면은 평평한 플레이트일 수 있다. 고체 표면은 평평한 표면에서 튀어나온 다수의 어댑터의 론(lawn)을 갖는다. 어댑터는 샌드위치에 있는 어댑터 중 하나에 상보적인 DNA 서열을 갖는다. 실제로, 론은 두 가지 유형의 어댑터를 함유하고, 여기서 하나의 어댑터는 복합체의 어댑터 중 하나에 결합하고 (혼성화되고), 복합체를 플레이트에 비공유적으로 테더링한다. 이들은 "제1 론-결합된 어댑터" 및 "제2 론-결합된 어댑터"로 지칭될 수 있다. DNA 중합효소의 제1 임무는 주형으로서 테더링된(하지만 비공유적으로 결합된) DNA를 사용하여, 딸 가닥을 생성하는 것이고, DNA 중합이 발생하는 경우, 딸 가닥은 "제1 론-결합된 어댑터"에 공유적으로 부착된 형태가 된다. 이러한 공유적 연결은 DNA 중합효소의 촉매 작용에 의해 생성되었다. 딸 가닥이 완전히 합성된 후, 원위 말단(매질로 튀어나온 말단)은 상기 명명된 샌드위치에서 제2 어댑터에 상보적인 DNA 서열을 함유한다. 이러한 상보적인 DNA 서열은 새로 합성된 딸 DNA의 원위 말단이 구부러지고 "제2 론-결합된 어댑터"에 혼성화되도록 한다. 상기 기재된 것은 샌드위치의 두 어댑터가 어떻게 사용되는지와 "제1 론-결합된 어댑터" 및 "제2 론-결합된 어댑터" 둘 다가 어떻게 사용되는지이다.

[0403] 그 다음, 반응의 주기는 수 회 수행되고, 여기서 결과는 원래 dsDNA의 증폭된 버전의 클러스터이다. 실제로, 클

러스터는 공유적으로 부착된(테더링된) ssDNA 분자의 형태를 갖고, 여기서 모든 이러한 ssDNA 분자는 원래 dsDNA(살아있는 세포 또는 조직으로부터 단리된 dsDNA)의 가닥 중 오직 하나에 상응한다. 테더링된 ssDNA 분자의 이러한 클러스터는 "풀로니"로 지칭된다. 풀로니의 생성은 "브리지 증폭"으로 지칭되는 기술에 의한 것이다. 최종적으로, 브리지 증폭 및 풀로니의 생성 후, 고체 표면에 공유적으로 부착된 역 가닥은 이의 테더링으로부터 절단되고, 세척되고, 제거되고, 오직 정방향 가닥만을 남긴다.

[0404] 일루미나® 방법에 대한 정보는 문헌[Goodwin, McPherson, McCombie (2016) *Nature Rev. Genetics.* 17:333-351, Gierahn, Wadsworth, Hughes (2017) *Nature Methods.* 14:395-398, Shendure and Hanlee (2008) *Nature Biotechnology.* 26:1135-1145; Reuter, Spacek, Snyder (2015) *Molecular Cell.* 58:586-597; Illumina Sequencing by Synthesis(유투브의 5분 영상)]으로부터 이용 가능하다.

[0405] 올리고뉴클레오타이드 결찰 및 검출에 의한 시퀀싱(SOLiD 시퀀싱). SOLiD는 염료 표지화된 분자로부터 형광 강도를 측정하여 DNA 단편의 서열을 측정한다. DNA 단편의 라이브러리는 시퀀싱되고 클론 비드 집단(각각의 자성 비드의 표면 상에 단편의 오직 하나의 종을 가짐)을 제조하는데 사용되는 샘플로부터 제조된다. 비드에 부착된 단편은 모든 단편의 출발 서열이 둘 다 공지되고 동일하도록 부착된 주어진 범용 P1 어댑터 서열이다. PCR을 수행하고, 그 다음, 비드에 부착된 수득된 PCR 생성물을 슬라이드에 공유적으로 결합시킨다.

[0406] 그 다음, 프라이머는 라이브러리 주형 내의 P1 어댑터 서열에 혼성화된다. 한 세트의 4개의 형광으로 표지화된 이염기성 프로브는 시퀀싱 프라이머의 결찰과 경쟁한다. 이염기성 프로브의 특이성은 각각의 결찰 반응에서 모든 제1 및 제2 염기로부터의 질문에 의해 달성된다. 결찰, 검출 및 절단의 다중 주기는 최종적인 리드 길이를 결정하는 주기의 수에 의해 수행된다. 일련의 결찰 주기 후, 연장 생성물을 제거되고, 주형은 결찰 주기의 제2 라운드를 위하여 n-1 위치에 상보적인 프라이머로 리셋된다(문헌[Wu et al (2010) *Nature Methods.* 7:336-337] 참조).

[0407] pH 기반의 DNA 시퀀싱. pH 기반의 DNA 시퀀싱은 중합효소-촉매 작용된 연장 반응의 부산물로서 발생하는 수소 이온을 측정함으로써 염기 도입이 결정되는 시스템 및 방법이다. 데옥시뉴클레오사이드 트라이포스페이트(dNTP) 첨가 및 세척의 반복된 주기가 수행된 후, 작동적으로 결합된 프라이머 및 중합효소를 각각 갖는 DNA 주형이 반응 챔버 또는 마이크로웰로 로딩된다. DNA 주형은 고체 지지체에 클론 집단으로서 부착되는 주형이다. 각각의 이러한 도입에 의해 수소 이온은 방출되고, 총체적으로 수소 이온을 방출하는 주형의 집단은 반응 챔버의 국지적 pH에 대한 검출 가능한 변화를 유발한다(문헌[Pourmand (2006) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 103:6466-6470] 참조). 본 개시내용은 pH 기반의 DNA 시퀀싱을 배제할 수 있다.

[0408] 연접 DNA 바코드에 관하여, 전체 연접 DNA 바코드는 하나의 운용으로 시퀀싱될 수 있다(여기서 전체 연접 DNA 바코드의 시퀀싱은 오직 하나의 시퀀싱 프라이머를 필요로 한다). 대안적으로, 연접 DNA 바코드를 구성하는 일부 또는 모든 DNA 바코드 모듈은 개별적인 시퀀싱의 대상이 될 수 있다(여기서 각각의 개별적으로 시퀀싱된 DNA 바코드 모듈은 그 자체의 시퀀싱 프라이머를 수득한다). 직교 DNA 바코드에 관하여, 직교 DNA 바코드를 구성하는 각각의 DNA 바코드 모듈은 그 자체의, 전용 시퀀싱 프라이머가 필요하고, 이는 각각의 DNA 바코드 모듈이 비드 상의 그 자체 부위에 부착된다는 사실 때문이다.

[0409] 배제 실시형태. 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 미세유체, 오일 매질 중에 존재하는 수성 소적, 및 제1 채널 함유 수성 시약이 제2 채널 함유 오일과 만나, 접점 면에서 출발하는 제3 채널을 통해 오일 매질을 통해 이동하는 수성 소적을 생성함으로써 생성되는 수성 소정을 포함하는 임의의 시스템, 장치, 장치의 조합 및 방법을 배제할 수 있다. 미세유체 장치 및 시약이 기재된다(예를 들면, 문헌[Brouzes, Medkova, Savenelli (2009) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 106:14195-14200; Guo, Rotem, Hayman (2012) *Lab Chip.* 12:2146-2155; Debs, Utharala, Balyasnikova(2012) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 109:11570-11575; Sciambi and Abate (2015) *Lab Chip.* 15:47-51] 참조).

[0410] 다른 배제 실시형태에 있어서, 배제될 수 있는 것은 "DNA 헤드피스"를 포함하는 임의의 시약, 조성물, 핵산, 또는 비드 또는 "DNA 헤드피스"에 공유적으로 부착되는 시약, 조성물, 핵산, 또는 비드이다. 문헌[MacConnell, Price, Paegel (2017) *ACS Combinatorial Science.* 19:181-192]은 비드가 아지도 DNA 헤드피스 잔기에 의해 작용화된 DNA 헤드피스의 예를 제공한다.

[0411] 시퀀싱 방법 및 시퀀싱 시약에 관한 추가의 배제 실시형태. 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 DNA 시퀀싱에서 "가역적인 종결"의 사용을 포함하지 않는 시약, 시스템, 또는 방법을 배제할 수 있다. 또한, 배제될 수 있는 것은 메톡시 차단기를 포함하지 않는 임의의 시약, 시스템, 또는 방법이다. 게다가, 배제될 수 있는 것은 DNA 시

퀀싱을 포함하지만, 여기서 시퀀싱되는 DNA는 폴리뉴클레오타이드의 순서에 대한 정보가 검출되고 수집되는 시간에 비드에 공유적으로 결합되지 않는 임의의 시약, 시스템, 또는 방법이다. 추가로, 배제될 수 있는 것은 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 예를 들면, PCR 기술 또는 회전환 기술에 의한 증폭 전에, DNA 주형을 증폭하는 임의의 시약, 시스템, 또는 방법이다. 실시형태에 있어서, 배제될 수 있는 것은 바코딩, 예를 들면, 연접인 핵산 바코딩의 임의의 방법이다(하나의 단일 핵산에 존재하는 화학적 라이브러리의 멤버의 합성에 대한 모든 정보). 또 다른 측면에 있어서, 배제될 수 있는 것은 바코딩, 예를 들면, 직교인 핵산 바코딩의 임의의 방법이다(비드 상의 복수의 부착 위치에 분산되는 화학적 라이브러리의 주어진 단량체의 합성에 대한 정보). DNA 리가아제에 관한 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 핵산 바코드의 모듈을 연결하기 위하여 DNA 리가아제를 사용하는 임의의 시약, 시스템, 또는 방법을 배제할 수 있다.

[0412] **형광단, 소광제, 및 FRET 기반의 검정.** 본 개시내용은 화학적 라이브러리의 멤버를 스크리닝하기 위하여, 또는 화학적 라이브러리의 단리된 멤버를 특성화하기 위하여 형광단 및 소광제를 제공한다. FRET는 포스터 공명 에너지 전달(Forster resonance energy transfer)이다.

[0413] 검정은 비드-결합된 화학적 라이브러리 상에서 수행될 수 있다. 또한, 검정은 비드로부터 절단 직후, 유리 화학적 라이브러리 멤버에 대하여 수행될 수 있고, 즉, 비드와 동일한 마이크로웰에서 수행되거나, 비드와 동일한 하이드로겔 매트릭스 부근에서 수행될 수 있다. 게다가, 검정은 임의의 비드에 절대 부착되지 않거나 비드로부터 절단된 후 정제된 가용성 화학적 라이브러리 멤버 상에서 수행될 수 있다.

[0414] 본 개시내용의 시약으로서 적합한 형광단은 알렉사(Alexa) 350, 알렉사 568, 알렉사 633, A647, 알렉사 680, 플루오레세인, 퍼시픽 블루(Pacific Blue), 코쿠마린, 알렉사 430, 알렉사 488, 알렉사 532, 알렉사 546, 알렉사 660, ATT0655, ATT0647n, Setau-665(SETA Biochemicals, 미국 일리노이주 어배너 소재), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, 테트라메틸로다민(TMR), 텍사스 레드(Texas red), 테트라클로로플루오레세인(TET), 헥사클로로플루오레세인(HEX), 및 조(Joe) 염료(4'-5'-다이클로로-2',7'-다이메톡시-6-카복시플루오레세인), SYBR 그린 I(흡수 497nm, 방출 520nm), 6-카복시플루오레세인(6-FAM)(흡수 492nm, 방출 518nm), 5-카복시플루오레세인(5-FAM)(흡수 492nm, 방출 518nm), FITC, 및 로다민을 포함한다. 소광제는 TAMRA 소광제, 블랙 훌 소광제-1(BHQ1), 및 블랙 훌 소광제-2(BHQ2), 및 DABCYL 소광제를 포함한다. 본 특허 문서의 다른 곳에 개시된 바와 같이, TAMRA는 형광단일 수 있고 이는 또한 소광제일 수 있다는 것을 주의한다.

[0415] 지침은 FRET 기반의 검정을 위한 시약에 대하여 이용 가능하고, 여기서 FRET 시약은 형광단 및 소광제를 포함한다(문헌[Johansson (2006) Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching. Methods Mol. Biol. 335:17-29] 참조). FRET 기반의 검정의 예는 기질, "SceD 웨타이드"를 갖는 단일 웨타이드(SpsB)의 활성을 측정하는 것을 포함한다. 웨타이드에 부착된 FRET-쌍은 4-(4-다이메틸아미노페닐아조)5-((2-아미노에틸)아미노)-1-네프탈렌설폰산이었다(문헌[Rao et al (2009) FEBS J. 276:3222-3234] 참조). 또 다른 예는 웨타이드 기질, KVSLNFPIL을 갖는 HIV-1 프로테아제의 검정으로부터 온다. 공여체/수용체 FRET 쌍은 EDANS(공여체) 및 DABCYL(수용체)이었다. EDANS 형광은 비형광성 DABCYL에 대한 공명 에너지 전달을 통해 DABCYL에 의해 소광될 수 있다(문헌[Meng et al (2015) J. Biomolecular Screening. 20:606-615] 참조). 또 다른 예는 보툴리눔 독소의 검정으로부터 온다. SNAP-25의 활성을 기질, BoNT-A를 사용하여 측정될 수 있다. FRET 기반의 검정을 위하여, 기질은 N-말단 연결된 플루오레세인-아이소티오시아네이트(FITC)를 가졌고, C-말단 연결된 소광제는 4-(4-다이메틸아미노페닐)다이아제닐벤조산(DABSYL)이었다. 웨타이드 기질은 SNAP-25의 아미노산 190 내지 201에 상응한다(문헌[Rasooly and Do (2008) Appl. Environ. Microbiol. 74:4309-4313] 참조).

[0416] 본 개시내용은 효소 억제제, 효소 활성화제를 발견하고 확인하고, 주어진 단백질의 생체내 분해 속도를 향상시킬 수 있는 화합물을 발견하기 위하여, 화합물의 라이브러리를 스크리닝하는 시약, 조성물 및 방법을 제공한다. 이러한 시약, 조성물 및 방법은 FRET 기반의 검정을 사용할 수 있고, 대안적으로, 이들은 FRET 기반의 검정이 아닌 검정을 사용할 수 있다.

[0417] 분자 비콘이 기재된다(문헌[Baruch, Jefferey, Bogyo (2004) Trends Cell Biology. 14:29-35] 참조). 분자 비콘은 형광단이 링커에 의해 소광제에 결합된 시약이다. 링커는 뉴클레아제에 의해 절단 가능할 수 있고, 따라서 뉴클레아제 활성을 측정한다. 본 개시내용은 뉴클레아제 억제제를 확인하고, 대안적으로, 뉴클레아제 활성화제를 확인하기 위하여 화학적 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 펑 등(Feng et al)은 다양한 뉴클레아제의 활성을 측정하기 위하여 분자 비콘의 사용 및 FRET 기반의 검정의 사용을 기재하였다(Feng, Duan, Liu (2009) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 48:5316-5321). 펑 등(Feng et al)은 다양한 제한 효소의 활성을 측정하기 위한 FRET 기반의 검정의 사용을 보여주었다.

[0418] (XI) 비드-결합된 화합물의 방출

절단 가능한 링커. 제공되는 것은 절단 가능하지 않은 링커이다. 또한 제공되는 것은 절단 가능한 링커이다(문헌[Holmes and Jones (1995) J. Org. Chem. 60:2318-2319; Whitehouse et al (1997) Tetrahedron Lett. 38:7851-7852, and Yoo and Greenberg(1995) J. Org. Chem. 60:3358-3364, as cited by Gordon et al (1999) J. Chem. Technology Biotechnology. 74:835-851] 참조). 절단 가능한 링커는 또한 알칼리 가수분해에 존재하는 아실 세포아마이드 링커뿐만 아니라 온화한 조건하에 절단되는 활성화된 N-알킬 유도체, 및 또한 아릴-규소 결합을 기반으로 한 흔적이 없는 링커, 및 실릴 에터 연결기를 기반으로 한 흔적이 없는 링커를 포함한다(문헌[Gordon et al (1999) J. Chemical Technology Biotechnology. 74:835-851]의 839 및 842 페이지에 기재됨). 게다가, 제공되는 것은 절단시 C-말단 알데하이드를 생성하는 타르타르산을 기반으로 한 링커이고, 여기서 절단은 페리오레이트 산화에 의한 것이다(문헌[Paulick et al (2006) J. Comb. Chem. 8:417-426] 참조).

도 3은 본 개시내용의 조성물 및 방법에 적합한 다양한 절단 가능한 링커를 개시한다. **도 3은** 문헌[Yinliang Yang (2014) Design of Cleavable Linkers and Applications in Chemical Proteomics. Technische Universität München Lehrstuhl für Chemie der BioPolymere]의 표 1로부터 복사된다. **도 3으로부터**, 본 개시 내용에 바람직한 절단 가능한 링커는 링커 **a**, **c**, **d**, **p**, **q**, **r** 및 **t**이다. 링커 **p**는 본 명세서에 개시된 실험 결과에서 사용되었다. 이들에 대한 절단 조건은 DTT(링커 **a**), Na₂SO₄(링커 **c**), Na₂SO₄(링커 **d**), UV 광(링커 **p**), UV 광(링커 **q**), UV 광(링커 **r**), 및 TEV 프로테아제(링커 **t**)이다. 이러한 특정한 절단 조건은 온화하고, 비드에 대한 손상, 비드-결합된 화합물에 대한 손상, 또는 비드-결합된 화합물의 임의의 화학적 라이브러리 멤버(유닛)에 대한 손상이 예상되지 않는다.

클릭-화학과 혼화성인 화학적으로 절단 가능한 링커. 천 등(Qian et al)(2013)은 클릭-화학과 혼화성인 다수의 절단 가능한 링커를 기재한다(Qian, Martell, Pace (2013) ChemBioChem. 14:1410-1414). 이들은 아조 결합을 갖는 링커를 포함하고, 여기서 아조 결합은 디이티오나이트에 의해 절단 가능하다. 이러한 링커는 하기 구조를 갖는다: R₁-벤젠-N=N-벤젠-R₂. 제1 벤젠 고리는 R₁에 파라 위치인 하이드록시기를 갖고, 제2 벤젠 고리는 R₂에 연결되는 카보닐기를 갖고, 여기서 이러한 카보닐기는 아조 잔기에 파라 위치에 있다.

광불안정성 절단 가능한 링커. 본 개시내용은 o-나이트로벤질기를 갖는 광 절단 가능한 링커를 포함한다. 이러한 기는 330-370nm에서 조사에 의해 절단될 수 있다(문헌[Saran and Burke (2007) Bioconjugate Chem. 18:275-279; Mikkelsen, Grier, Mortensen (2018) ACS Combinatorial Science. DOI:10.1021] 참조). o-나이트로벤질 링커보다 짧은 광분해 시간을 갖는 링커는 2-(2-나이트로페닐)-프로필옥시카보닐(NPPOC) 링커이다. o-나이트로벤질 링커의 변이체는 o-나이트로벤질아미노 링커이다. 펩타이드 사슬에 부착되고, 후속적으로 절단되는 경우, 이러한 링커는 아마이드를 방출한다. o-나이트로베라트릴기를 갖는 링커가 이용 가능하고, 이들은 비치환 o-나이트로벤질 링커보다 짧은 광분해 시간 및 더 큰 방출 수율을 갖는다. 또한 폐나실 링커, 벤조인 링커, 및 피발로일 링커가 이용 가능하다(문헌[Mikkelsen et al (2018) ACS Combinatorial Science. DOI:10.1021] 참조).

광 절단 가능한 에터 결합을 갖는 링커가 이용 가능하다. 링커가 비드에 부착되고 절단 가능한 기가 "R기"이고, 절단 후, 방출된 기가 ROH 형태를 갖는 광 절단 가능한 링커가 사용될 수 있다(문헌[Glatthar and Giese (2000) Organic Letters. 2:2315-2317] 참조). 또한 광 절단 가능한 에스터 결합을 갖는 링커가 이용 가능하다(문헌[Rich et al (1975) 97:1575; Renil and Pillai(1994) Tetrahedron Lett. 35:3809-3812; Holmes(1997) J. Org. Chem. 62:2370-2380, as cited by Glatthar and Giese, 상기 참조]. 링커에서 에터 결합은 산, 염기, 산화, 환원, 및 플루오라이드 감응성 실릴-산소 결합 절단, 및 광분해에 의해 절단될 수 있다(Glatthar and Giese, 상기 참조).

펩타이드(R₁) 및 핵산(R₂)을 연결하는데 사용된 또 다른 광 절단 가능한 링커는 하기와 같다. R₁은 벤질기의 메틸렌 잔기에 직접적으로 연결된다. 메틸렌기에 대하여 파라 위치는 고리-부착된 나이트로기이다. 메틸렌 잔기에 대하여 메타 위치는 고리-부착된 에틸기이다. 에틸기의 1-탄소는 포스페이트를 갖는다. 이러한 포스페이트의 산소 원자에 R₂기가 부착된다(Olejnik et al (1999) Nucleic Acids Res. 27:4626-4631).

아커블롬 등(Akerblom et al)은 아미노, 하이드록실, 브로모, 및 메틸아미노기, 및 또한 4-나이트로펜옥시카보닐 활성화된 하이드록실 및 아미노기를 함유하는 알파-메틸 2-나이트로벤질 유형의 광불안정성 링커를 개시한다(문헌[Akerblom and Nyren (1997) Molecular Diversity. 3:137-148] 참조). 카텝신 B는 표적 서열을 갖는 링커, "발린-시트룰린"을 절단할 수 있다(Dal Corso, Cazzamalli, Neri (2017) Bioconjugate Chemistry.

28:1826-1833).

[0426] **효소-절단 가능한 링커.** 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단 가능한 링커가 이용 가능하다(문헌[Leriche, Chisholm, Wagner (2012) Bioorganic Medicinal Chem. 20:571-582] 참조). 하이드록시메틸펜옥시 링커는 카이모트립신에 의해 절단될 수 있다(Maltman, Bejugam, Flitsch (2005) Organic Biomolecular Chem. 3:2505-2507). 타바코 에치 바이러스 프로테아제에 의해 절단 가능한 링커가 이용 가능하다(문헌[Weerapana, Speers, Cravatt (2007) Nature Protocols. 2:1414-1425; Dieterich, Link, Graumann (2006) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 103:9482-9487] 참조). 링커 서열 LVPRG 및 LVPRGS는 트롬빈에 의해 절단될 수 있다(Jenny, Mann, Lundblad (2003) Protein Expression Purification. 31:1-11). 플라스민-절단 가능한 링커가 이용 가능하다(Devy, Blacher, Noel (2004) FASEB J. 18:565-567).

[0427] **비드-결합된 방출-모니터.** 본 개시내용은 비드-결합된 화합물의 방출을 평가할 수 있는 신규하고 고유한 방출-모니터를 제공한다. 방출-모니터는 형광단과 소광제의 비드-결합된 복합체 형태를 갖고, 여기서 형광단은 절단 가능한 링커를 통해 비드에 연결된다. 바람직하게는, 절단 가능한 링커는 광 절단 가능한 링커이다. 바람직하게는, 비드-결합된 방출-모니터는 전용 피코웰에 위치하고, 여기서 그 피코웰은 임의의 다른 유형의 비드를 함유하지 않는다. 광 절단 가능한 링커의 제공에 있어서, 형광단은 비드로부터 방출되고, 피코웰 내의 매질로 확산되고, 비드-결합된 소광제로부터 약간의 거리를 달성하고, 여기서 결과는 방출량에 비례하는 형광성의 증가이다. 형성성의 증가는 피코웰 내에 있는 유리 형광단의 농도의 계산을 가능하게 하고, 더 중요하게는, 다른 웰 내에 위치한 다른 비드로부터 방출된 화학적 화합물의 양의 계산을 가능하게 한다.

[0428] 요약하면, 비드-결합된 방출-모니터는 그 자체의 전용 웰 내에 위치하고, 여기서 다른 웰은 약물 후보인 비드-결합된 화합물을 함유한다.

[0429] 도 8은 비드-결합된 방출-모니터의 바람직하고 비제한적인 예의 단순한 버전을 개시한다. 방출-모니터는 형광단 부근에 훌륭된 소광제의 형태를 갖고, 이는 형광단의 소광을 야기한다. 실시형태에 있어서, 소광은 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9%, 적어도 99.95% 등이다. 피코웰에서, 하나의 비드는 방출-모니터에 전용이고, 또 다른 비드 또는 비드들은 화합물의 부착 및 DNA 라이브러리의 부착에 사용된다. 피코웰 내의 모든 비드의 UV 광에 대한 노출은 형광단 및 화합물의 동시적인 절단을 야기한다. QSY7은 바람직한 소광제이다. QSY7의 구조 및 CAS 번호는 다음과 같다(하기 참조):

[0430] CAS 명칭/번호: 잔틸리움, 9-[2-[[4-[(2,5-다이옥소-1-페롤리딘일)옥시]카보닐]-1-페페리딘일]설포닐]페닐]-3,6-비스(메틸페닐아미노)-, 클로라이드 304014-12-8

[0431] 소광제로부터 형광단의 분리로부터 야기된 형광성의 증가는 동시에 방출된 화합물의 피코웰에서의 농도를 추론하는데 사용될 수 있다. 또한, 소광제로부터 형광단의 분리로부터 야기된 형광성의 증가는 피코웰 내의 유리 형태로 존재하는 문자(이전에 비드-결합된 화합물였던 화합물의 형태를 갖는 문자)의 수를 추론하는데 사용될 수 있다. 더 바람직한 실시형태에 있어서, 방출-모니터는 소광제 및 형광단을 포함하고, 여기서 절단은 (소광제의 방출이 아닌) 형광단의 방출을 야기한다. 이러한 실시형태는 하기 덜 바람직한 실시형태보다 낮은 배경 노이즈를 제공한다. 덜 바람직한 실시형태에 있어서, 절단은 소광제의 방출을 야기하고, 여기서 판독은 비드-결합된 형광단으로부터 형광성의 증가의 형태를 갖는다.

[0432] 방출-모니터는 비드로부터 화합물의 UV-유도된 방출 후, 사용자에게 가용성 화합물의 농도의 측정을 제공한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 비드의 하나의 유형은 방출-모니터에 전용이다. "전용"이 의미하는 것은 이러한 비드가 비드-결합된 화합물도 함유하지 않고 비드-결합된 DNA 라이브러리도 함유하지 않는다는 것이다.

[0433] 일반적인 제의로서, 오로지 화합물이 광감응성 링커의 절단에 의해 비드로부터 방출되었다고 해서, 화합물이 가용성 화합물이 되었다로 추론하지 말아야 한다. 가장 먼저, 오로지 화합물이 "소수성"으로 간주되거나 "수불용성"으로 간주된다고 해서 문자가 용매 중에 자유롭게 이동하지 않는다는 것을 의미하지 않는다는 것을 주의한다. 예를 들면, 심지어 콜레스테롤은 물 중에서 측정 가능한 용해도를 갖는다(문헌[Saad and Higuchi (1965) Water Solubility of Cholesterol. J. Pharmaceutical Sciences. 54:1205-1206] 참조). 게다가, 비드-결합된 수불용성 화합물의 생화학적 효능은 계면활성제, 세제, 첨가제, 예를 들면, DMSO, 또는 담체, 예를 들면, 인간 혈청 알부민에 의해 증가될 수 있다. 따라서, 방출-모니터는 피코웰이 상기 제제 중 하나를 함유하거나, 대안적으로, 수불용성 화합물이 피코웰 내부에 배양되는 살아있는 세포의 원형질막 부근에 방출되는 조건하에, 제한된 수용성을 갖거나 수용성이 아닌 화합물의 전체 농도를 평가하는데 사용될 수 있다.

- [0434] 도 9는 비드-결합된 방출-모니터의 바람직한 실시형태의 단순한 버전을 개시하고, 여기서 도 10은 이러한 비드-결합된 방출-모니터의 바람직한 실시형태의 완전하고 상세한 구조를 개시한다.
- [0435] 도 30은 비드가 피코웰 내에 있는 비드-방출 모니터의 사용을 증명하는 데이터를 제공한다. 광-절단 가능한 링커를 사용하여 결합되는 비드-결합된 형광단은 TAMRA(여기 파장 530nm; 방출 파장 570nm)이었다. 도면은 비드로부터 형광단의 방출의 시간 과정을 나타낸다. 이는 $t = 0$ 초, $t = 1$ 초, $t = 11$ 초, 및 $t = 71$ 초에서 형광성 데이터를 획득하는 비드-결합된 방출 모니터의 작동을 나타낸다. 도 30은 또한 4개의 작은 도면 중 2개에 있어서 더 작은 도면의 클로즈업을 보여주는 삽도를 포함한다. 도 30은 "펩타이드 Q-플루오르 기질" 및 비드와 함께 아스파тиль 프로테아제인 카텝신-D의 배양으로부터 수득하였다. 시약을 웰에 4°C에서 배치하였다. 365nm에서 자외선을 사용하여 형광단을 비드로부터 절단하고, 이에 따라 형광단을 방출시키고 이를 소광제로부터 분리하였다. 이러한 검정의 목표는 분리된 웰에서 발생하는 방출의 시간 과정을 평가하는 것이었고, 여기서 분리된 웰은 상이한 유형의 비드를 함유하였다. 상이한 유형의 비드는 동일한 광-절단 가능한 링커를 갖지만, 여기서 이러한 광-절단 가능한 링커는 펩스타틴-A에 부착되었다. 펩스타틴-A의 방출은 동일한 검정 배질에서 아스파티ль 프로테아제에 결합하고 이를 억제할 수 있다. 비드-결합된 펩트스타틴-A 및 아스파티ль 프로테아제에 대한 이러한 설정은 양성 대조군으로서 제공될 수 있다.
- [0436] 20x 대물렌즈를 통해 UV를 노출시켰다. 이득=5로 이미지를 수득하였고; 노출은 400ms였다. 530nm에서 TAMRA 여기. 570nm에서 TAMRA 방출.
- [0437] 도 35는 비드-결합된 펩스타틴-A이 방출되고, 방출된 펩스타틴-A가 효소 억제를 야기하는 효소 검정에 대한 추가의 세부사항을 개시한다. 광 절단 가능한 펩스타틴-A(양성 대조군) 및 공유 Cy5 표지를 나타내는 10 μ M 텐타겔 비드를 PBST 버퍼 중에서 광 절단 가능한 Fmoc-발린(음성 대조군)을 나타내는 10 μ M 텐타겔 비드와 혼합하였다. 이러한 비드 집단을 피코웰에 도입한 다음, 버퍼 프로테아제 억제 검정으로 교환하였고, 이는 카텝신-D 프로테아제 및 펩타이드 Q-플루오르 기질($\lambda_{ex} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm)을 포함하였다. 웰을 공기로 캡슐화하고, 전체 슬라이드를 UV(365nm, 77 J/cm²)에 노출시켜, 광불안정성 링커를 절단하고, 화합물을 방출시켜 약 13 μ M에 도달하였다. 플로우셀을 배양하였다(30분, 37°C). 양성 대조군 비드를 함유하는 웰은 카텝신-D에 의한 펩타이드 단백질분해를 억제하여야 하고, 이는 낮은 형광 신호를 야기한다. 음성 대조군 비드를 함유하는 웰은 임의의 카텝신-D 억제를 나타내지 않아야 하고, 빈 웰과 유사한 형광 강도를 가져야 한다.
- [0438] 소광제 및 형광단에 대한 용어는 어떤 화학물질이 바로 근처에서 발생하는지에 따라 주어진 화학에 대하여 변화 할 수 있다. 비드-결합된 방출 모니터의 실험실 데이터에서 사용되는 TAMRA가 형광단임에도 불구하고, 다른 맥락에서, TAMRA는 소광제일 수 있다. TAMRA는 FAM 및 TAMRA를 함유하는 TaqMan® 프로브에서 소광제로서 작용한다.
- [0439] **실험 설정 및 실험실 데이터의 추가 설명.** 본 개시내용은 공기에 의해 구획화되고 채워진 피코웰 내의 포스페이트 버퍼(10mM 포스페이트, 154mM 나트륨, pH 8.0) 중의 조절된 5(6)-카복시테트라메틸로다민(TAMRA) 농도에 대한 데이터를 제공한다. 형광 이미지를 캡쳐하고(10ms, 2ms 노출) 및 웰-면적을 픽셀 강도($n \geq 100$)에 의해 정량하여 농도 대 형광 강도 보정 곡선을 생성하였다. 상기 데이터는 표준 곡선의 형태를 갖고, 이는 다양한 미리 결정된 농도의 유리 TAMRA(2, 10, 30, 60, 100mM TAMRA)에서 형광을 나타낸다. 이러한 표준 곡선은 2개의 상이한 조건, 즉, 사진 이미지를 2밀리초 노출 또는 10밀리초 노출로 찍는 조건하에 생성되었다. 표준 곡선을 생성하는데 사용된 실험은 피코웰에서 수행되지만, 이러한 실험에서 사용된 비드는 없었다(단지 TAMRA의 공지된 양). 사진 이미지는 이러한 특허 문서에 도시되지 않고, 이는 데이터가 단지 보정 곡선이라고도 지칭될 수 있는 표준 곡선의 형태를 갖기 때문이다.
- [0440] 실험 설정은 다음을 포함하였다. 식 X)에 있어서, 텐타겔-Lys(PCL1-Tamra)-QSY7 비드 구조. QSY7(회색)은 광 절단 가능한 링커(보라색)를 통해 비드에 공유적으로 부착된 채로 Tamra 형광단(오렌지색)을 소광한다. UV(365 nm)로부터의 조사는 동일 반응계에서 화합물의 정량적 방출을 제공한다.
- [0441] 도 31은 소광제-형광단 기질에 대한 아스파티릴 프로테아제의 촉매 작용 후 수득된 방출 데이터를 개시한다. 더 큰 형광은 효소는 더 촉매적으로 활성이라는 것을 의미한다. 더 적은 형광은 효소가 덜 촉매적으로 활성이라는 것을 의미하고, 즉, 효소가 유리 억제제에 의해 더 많이 억제된다는 것이고, 여기서 억제제가 비드로부터 유리되고, 자유는 광-절단 가능한 링커의 절단에 의해 수득되었다. UV 방출 및 카텝신-D 검정 배양 후, 이미지를 캡쳐하였다($\lambda_{ex} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm). 양성 대조군 비드를 함유하는 웰은 Cy5 형광단에 의해 스펙트럼으로 확인될 수 있다($\lambda_{ex} = 645$ nm, $\lambda_{em} = 665$ nm, 오렌지색 가색상). 섹션은 개방 웰 부피를 가로지르는 선-플롯으로

분석하였고, 음성 대조군 비드를 함유하는 웰은 카텝신-D 억제를 끌어내지 않는다. 양성 대조군 비드를 함유하는 웰 내의 검정 부피는 어둡고, 이는 강한 억제를 나타낸다. 빈 웰 내의 검정 부피는 음성 대조군 비드를 함유하는 웰과 비슷하다.

[0442] 도 32는 다음 과정을 도시한다. 추가로 식 X)에 관하여, 피코웰 기질(웰당 46p l)을 플로우셀에 동봉하고, 웰을 진공하에 적시고, 텐타겔-Lys(PCL1-TAMRA)-QSY7 비드의 혼탁액을 도입하고, 플로우셀을 가로질러 공기를 밀어넣어 각각의 웰을 구획화한다(상부). 플로우셀에 UV LED($\lambda_{\text{평균}} 365\text{nm}$)를 조절된 광속으로 조사하고, 평형에 이르게 한 후(20분), 방출된 화합물(TAMRA) 농도를 정량하기 위하여 형광 현미경 이미지를 찍는다(하부)(도 32). 상세하게, 도 32는 피코웰을 플로우셀에 적시는 단계, 혼탁액 중의 비드를 피코웰에 도입하여, 피코웰당 하나의 비드를 야기하는 단계, 과량의 분산 용액을 감소시키기 위하여 플로우셀을 가로질러 공기를 빼내고, 피코웰 플레이트의 평면 상부 표면의 표면 아래에 메니스커스 강하를 야기하는 단계, 조절된 UV 노출(365nm)로 일부 TAMRA의 방출을 야기하는 단계, 및 형광 현미경으로 형광성 신호를 검출하여(여기 531/40nm)(방출 594/40nm) TAMRA로부터의 광 방출을 유발하는 단계를 설명하는, 피코웰의 단면의 도면을 나타낸다. 표기 "사선 40"은 대역폭을 나타내고, 즉, 이는 컷오프 필터가 빛을 531nm 플러스 20nm 및 마이너스 20nm부터 594nm, 플러스 20nm 및 마이너스 20nm까지 범위로 국한한다는 것을 의미한다(이러한 사선 표기는 여기 과장 및 또한 방출 과장에 대하여 사용될 수 있다).

[0443] 본 발명자들은 하기 데이터를 나타내는 사진을 수득하였다(도 33 참조). 형광단(TAMRA)의 형광 방출($\lambda_{\text{ex}} 531/40\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 593/40$)은 피코웰 플로우셀에서 UV LED(365nm) 노출 후, $10-\mu\text{m}$ 텐타겔-Lys(PCL1-TAMRA)-QSY7 비드로부터 방출되었다. (A) QSY7의 FRET 소광 효과로 인한, UV 노출(0 J/cm^2) 전에 배경 위에서의 유의미한 방출은 없었다. TAMRA 방출은 (B) 25 J/cm^2 , (C) 257 J/cm^2 , (D) 489 J/cm^2 , (E) 721 J/cm^2 , (F) 953 J/cm^2 의 UV 노출 후, 평형에 도달하였고(20분), 그 다음, 적절한 노출 시간을 사용하여 영상화하였다. 각각의 비드에 둘러싸인 부피 내에서 측정하여 형광 방출을 측정하여 TAMRA 농도를 측정하였다(도 33). 표기 "사선 40"은 대역폭을 나타내고, 즉, 이는 컷오프 필터가 빛을 531nm 플러스 20nm 및 마이너스 20nm의 범위로 국한한다는 것을 의미한다(이러한 사선 표기는 여기 과장 및 또한 방출 과장에 대하여 사용될 수 있다).

[0444] 하기는 비드-결합된 방출 모니터의 시험 및 사용으로부터의 형광 데이터의 일부의 본 발명자들에 의한 해석이다(도 34 참조). UV 노출(365nm) 후, 피코웰(45p l) 내부의 비드-방출된 TAMRA의 농도. 이미지 분석은 용액으로 둘러싸인 비드로 채워진 웰($n \geq 14$)의 평균 픽셀 강도를 사용하였고, 이미지 노출 시간에 대하여 정규화한 다음, 피코웰에서 공지된 TAMRA 농도의 표준 곡선으로 보정하였다. 오류 바는 1σ 를 나타내고, RSD%로부터 계산되었다. UV 방출된 화합물 농도는 $1.1 \mu\text{M}$ (RSD% 8.9), $54.3 \mu\text{M}$ (RSD% 5.2), $142 \mu\text{M}$ (RSD% 4.2), $174 \mu\text{M}$ (RSD% 7.7), $197.3 \mu\text{M}$ (RSD% 10.1)이었다(도 34).

(XII) 화합물에 대한 생화학적 검정(세포 기반아 아닌 검정)

[0446] 피코웰 내의 비드를 사용하는 다양한 생화학적 검정이 가능하다. 비제한적인 예는 결합 검정, 효소 검정, 촉매 검정, 형광 기반의 검정, 발광 기반의 검정, 산란 기반의 검정 등을 포함한다. 예를 하기에 상술된다.

[0447] **프로테아제 및 웨티다제의 억제제에 감응성인 생화학적 검정.** 목표가 프로테아제를 억제하는 약물을 검출한 다음, 개발하는 것인 경우, 스크리닝 검정은 특정한 프로테아제 또는 웨티다제, 적합한 절단 가능한 기질, 및 후보 약물 화합물에 의한 억제 정도에 감응성인 색상 기반의 검정 또는 형광 기반의 검정의 혼합물을 사용하여 수 있다. 예를 들면, 하나의 시약은 비드-결합된 화합물일 수 있고, 여기서 화합물은 활성에 대하여 아직 시험되지 않았다. 또 다른 시약은 비드-결합된 웨스타틴(HIV-1 프로테아제의 활립된 억제제)의 형태를 가질 수 있다(Hilton and Wolkowicz(2010) PLoS ONE. 5:e10940(7 pages)). 또 다른 시약은 HIV-1 프로테아제의 절단 가능한 기질일 수 있고, 여기서 HIV-1 프로테아제에 의한 절단은 색상에서의 변화 또는 형광에서의 변화를 야기한다. 약물 후보의 양성-스크리닝은 특정한 검정(주어진 마이크로웰에서)이 색상에서의 차이(또는 형광에서의 차이)를 야기하는지를 확인한다. 절단 가능한 기질은 소광제 및 형광물질에 공유적으로 결합하고 이의 옆에 있는 취약한 웨타이드의 형태를 갖는다. 절단 전에, 형광단은 인근의 소광제 때문에 형광성이 아니지만, 절단 후, 형광 물질화된다(문현[Lood et al (2017) PLoS ONE. 12:e0173919(11 pages); Ekici et al (2009) Biochemistry. 48:5753-5759; Carmona et al (2006) Nature Protocols. 1:1971-1976] 참조). 본 개시내용의 시약 및 방법은 상기 개시된 기술을 포함한다.

[0448] **시약이 MDM2(효소) 및 p53(기질)을 포함하는, 유비퀴틴 리가아제를 억제하는 화합물에 대한 효소 기반의 스크리닝 검정.** 출원인은 하기 기술을 기반으로 한 시험 작업을 수행하였다. MDM2는 세포에서 p53의 양을 조절한다.

MDM2는 일부 암에서 과발현한다. MDM2는 "시험관내 연구는 정제된 MDM2가 ... p53을 유비퀴틴화하는데 ... 충분하다는 것을 보여주었다"는 설명에 의해 나타나는 바와 같은 효소이다(Leslie et al (2015) J. Biol. Chem. 290:12941-12950). 출원인의 목표는 MDM2의 억제제를 발견하는 것이고, 여기서 이러한 억제제는 p53의 유비퀴틴화를 감소시키고, 따라서 p53의 후속적인 분해를 감소시킬 것으로 예상된다. 세포에서 p53의 예상된 증가의 관점에서, 상기 성질을 갖는 억제제는 암을 치료하는데 유용할 것으로 예상된다.

[0449] 출원인은 MDM2/HDM2에 의해 매개되는 바와 같이, p53의 유비퀴틴화에 대한 레날리도마이드의 영향을 평가하기 위하여 하기 효소 기반의 검정을 사용하였다. 출원인은 하기 키트로부터의 시약을 사용하였다: MDM2/HDM2 유비퀴틴 리가아제 키트-p53 기질(Boston Biochem, 매사추세츠주 캠브리지 소재). 검정에 사용된 시약 중 하나는 공유 결합된 항체를 갖는 비드였다. 비드는 텐타겔® M NH₂(카탈로그 번호 M30102, 라프 폴리미어 계엠베하, 독일 소재)이고, 항체는 마우스에서 생합성된 항-인간 p53 단일클론 항체였다. MDM2는 기질로서 p53을 사용할 수 있는 E3 리가아제이고, 여기서 MDM2는 p53의 유비퀴틴화를 촉매 작용한다.

[0450] 암을 감소시키기 위한 p53의 활성화의 목표. MDM2, "p53"으로 지칭되는 전사 인자 및 항암 요법 사이의 관계는 하기 설명에 의해 제시된다. 설명은 "MDM2는 p53를 유비퀴틴화하는 E3 유비퀴틴 리가아제이고, 이는 프로테아솜 분해에 대하여 이를 표적화한다"는 것이다(Ortiz, Lozano (2018) Oncogene. 37:332-340). p53은 종양 억제 활성을 갖는다. p53 활성은 MDM2에 의해 억제될 수 있다. 우 등(Wu et al)에 따르면, MDM2는 "p53-결합 단백질"이다(문헌[Wu, Buckley, Chernov(2015) Cell Death Disease. 6:e 2035] 참조). 화합물이 p53의 유비퀴틴화를, 예를 들면, MDM2와 p53 사이의 상호작용에 의해 차단하는 경우, 화합물은 항암 약물로서 기능할 것으로 예상될 수 있다.

[0451] 스크리닝 검정의 목표. 스크리닝 검정의 목적은 p53의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 화합물, 예를 들면, p53 유비퀴틴화를 자극하는 화합물 및 p53 유비퀴틴화를 억제하는 화합물을 발견하는 것이다. 상세하게는, 목적은 이들의 효과가 MDM-2 및 E1 리가아제, E2 리가아제, 또는 E3 리가아제를 통하는, 억제하거나 활성화시키는 화합물을 발견하는 것이다. MDM2는 "뮤린 쌍염색체"를 의미한다. MDM2는 "E3 유비퀴틴 리가아제"로 지칭된다. MDM2가 세포에서 발생하는 경우, 증거는 p53의 유비퀴틴화를 촉매 작용하는 이의 활성이 다수의 다른 단백질, 예를 들면, CUL4A, DDB1, 및 RoC1을 필요로 한다고 제시한다(문헌[Banks, Gavrilova(2006) Cell Cycle. 5:1719-1729; Nag et al (2004) Cancer Res. 64:8152-8155] 참조). 맹크스 등(Banks et al)은 p53 및 MDM2를 포함하는 물리적 상호작용에 대하여 "L2DTL, PCNA 및 DDB1/CUL4A 복합체는 p53 종양 억제제 및 이의 조절제 MDM2/HDM2와 물리적으로 상호작용하는 것으로 확인되었다"고 기재하였다(Banks, Gavrilova(2006) Cell Cycle. 5:1719-1729). 나그 등(Nag et al)은 또한 p53 및 MDM2를 포함하는 물리적 상호작용에 대하여 "Cu14A는 E3 리가아제로서 기능하고, 유비퀴틴-프로테아솜 경로를 통해 몇몇 조절 단백질의 단백질분해에 참여한다. 여기서, 우리는 Cu14A가 MDM2 및 p53과 연관된다는 것을 나타낸다"고 기재하였다(Nag et al (2004) Cancer Res. 64:8152-8155).

[0452] p53 유비퀴틴화의 조절제에 대한 비드 기반의 검정으로부터의 원하는 판독. 스크리닝 화합물이 양성-스크리닝 히트를 야기하고, 더 많은 AF488 형광이 있는 경우, 이는 활성화제가 발견되었다는 것을 의미한다. 그리고 스크리닝 화합물이 양성-스크리닝 히트를 야기하고, 형광에서 감소가 있는 경우, 이는 억제제가 발견되었다는 것을 의미한다. p53의 유비퀴틴화을 억제하는 화합물은 화합물이 암을 치료하는데 유용할 수 있다는 것을 제시한다. 또한, p53의 유비퀴틴화를 특이적으로 억제하는 화합물은, 즉, 화합물이 다른 단백질의 유비퀴틴화를 억제하지 않거나, 화합물이 다른 단백질의 유비퀴틴화를 p53보다 덜 심하게 억제하는 경우, 또한 화합물이 암을 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 제시한다.

[0453] 물질. 물질은 보스톤 바이오켐(Boston Biochem)으로부터의 E3 리가아제 키트 K-200B를 포함하였다. 보스톤 바이오켐 카탈로그는 이러한 키트를 Mdm2/HDM2 유비퀴틴 리가아제 키트-p53 기질로 기재한다. 하기는 이러한 키트의 부분인 Mdm2에 관한 것이다. 이러한 키트는 세레브론을 포함하지 않는다. 레날리도마이드 및 유사한 화합물은 세레브론 또는 Mdm2에 결합할 수 있고, 여기서 최종 결과는 유비퀴틴 리가아제의 활성화이다. 물질은 또한 다이아몬드 화이트 글래스(Diamond White Glass) 현미경 슬라이드, 25 mm x 75 mm(글로브 사이언티픽 파라무스(Globe Scientific), 미국 뉴저지주 파라무스 소재)를 포함하였다. 코닝 교반기/핫 플레이트(0부터 10까지 설정) 698 와트, 모델 PC-420. N-하이드록시-석신이미드(NHS). 메틸테트라진(mTET). 알렉사 플루오르 488(AF488)(ThermoFisher Scientific). 텐타겔 비드 M NH₂(카탈로그 번호 M30102)(Rapp Polymere GmbH). 파라필름(Parafilm)(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재). 도 8은 알렉사 플루오르 488의 구조를 나타낸다. 알렉사 플루오르 488(AF488)의 구조는 알렉사 플루오르 488-나노골드-스트렙타비딘(Nanopropes, Inc., 미국 뉴욕주 애프행크 소재)에 대한 제품 정보로 보여진다.

(XIII) 화학적 화합물에 대한 세포 기반의 검정

[0454] 피코웰에서 수행되는 세포 기반의 검정은 인간 세포, 비-인간 세포, 인간 암 세포, 비-인간 암 세포, 박테리아 세포, 기생충 세포, 예를 들면, 말라리아 원충 세포를 사용할 수 있다. 또한, 세포 기반의 검정은 "죽었지만 대사적으로 활성"인 인간 세포 또는 비-인간 세포에 의해 수행될 수 있고, 즉, 이들의 계놈은 가교결합되어 대사 작용을 허용하지만 세포 분열은 방지한다(본 명세서에 그 전문이 참조로서 포함되는 미국 특허 공보 제 2007/0207170호, Dubensky). 게다가, 세포 기반의 검정은 아폽토시스 세포, 괴사 세포, 또는 사멸한 세포 상에서 수행될 수 있다. 박테리아 세포에 의한 세포 기반의 검정은 항생제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 바이러스로 감염된 인간 세포는 항바이러스제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 세포의 조합이 세포 기반의 검정에 제공된다. 예를 들면, 수지상 세포와 T 세포의 조합은 항원 제시를 자극하거나, 대안적으로, 항원 제시를 손상시키는 화합물을 스크리닝하고 동정하기 위하여 제공된다.

[0455] 세포 기반의 검정은, 예를 들면, 정상 조직의 생검, 고체 종양으로부터의 생검, 또는 혈액암, 또는 순환 고체 종양 세포로부터 수득된 세포의 일차 배양을 기반으로 할 수 있다. 또한, 세포 기반의 검정은 1회 이상 통과된 세포를 기반으로 할 수 있다.

[0456] 피코웰에서 수행되는 세포 기반의 검정은 오직 1개의 세포를 함유하거나 2개의 세포, 3개의 세포, 4개의 세포, 5개의 세포, 또는 약 2개의 세포, 약 3개의 세포, 약 4개의 세포, 약 5개의 세포, 또는 복수의 세포, 또는 3개 미만의 세포, 4개 미만의 세포, 5개 미만의 세포 등을 함유하는 배양물을 사용할 수 있다.

[0457] 출원인은 하기 기술을 기반으로 작업 시험을 수행하였다. 이는 레날리도마이드(시험 화합물)가 전사 인자의 유비퀴틴-매개된 단백질분해를 억제하는 예시적인 실시형태에 대하여 화합물을 스크리닝하기 위한 세포 기반의 검정을 기재한다. 전사 인자는 이카로스 및 아이올로스를 포함한다.

[0458] 본 개시내용은 비드-결합된 화합물 상의 화합물을 스크리닝하는 세포 기반의 검정을 제공하고, 여기서 스크리닝은 다수의 피코웰을 갖는 플레이트에 의해 수행된다. 세포 기반의 검정의 구성분은 비드-결합된 화학적 라이브러리를 훌륭하기 위한 피코웰을 포함하고, 여기서 각각의 비드는 이에 실질적으로 오직 하나의, 균일한 유형의 화합물을 부착하였다. 화합물은 절단 가능한 링커에 의해 방출된다. 포유동물 세포는 피코웰에서 배양된다. 피코웰은 또한 배양 배지를 포함한다. 레날리도마이드와 함께 현재 개시된 비제한적인 예는 주어진 표적 단백질의 유비퀴틴화를 조절하는 다른 화합물을 발견하기 위하여 화학적 라이브러리를 스크리닝하는데 사용될 수 있는 원리 증명 예시이다.

[0459] **세포 기반의 검정의 더 짧은 설명.** 재조합 세포를 녹색 형광성 단백질(GFP)의 단백질분해를 유도하는 화합물을 검출하고 스크리닝하기 위한 시약으로서 사용하고, 여기서 양성 스크리닝 화합물을 동정하는 판독은 또는 **녹색 세포가 무색 세포가 되거나** 감소된 녹색을 갖는 세포가 되는 상황이다. 이러한 세포 기반의 검정의 메커니즘에 관하여, **녹색 세포가 무색 세포가 되거나** 감소된 녹색을 갖는 세포가 되는 것을 유발하는 레날리도마이드의 작용 메커니즘은 레날리도마이드가 "세레브론"이라고 지칭되는 단백질에 결합하는 것이다. 세포에서, 세레브론은 "E3 유비퀴틴 리가아제"라고 지칭되는 단백질의 복합체의 부분이다. 세레브론은 항암 약물, 레날리도마이드, 탈리도마이드, 및 포말리도마이드의 직접적인 표적이다. E3 유비퀴틴 리가아제의 정상 및 구성적인 활성, 및 세레브론에 대한 이의 관계는 "세레브론은 ... [표적 단백질]의 ... E3 유비퀴틴 리가아제를 맞물림으로써 프로테오솜 분해를 촉진한다"고 기재되었다(문헌[Akuffo et al (2018) J. Biol. Chem. 293:6187-6200] 참조). E3 유비퀴틴 리가아제의 정상 활성과 대조적으로, 레날리도마이드, 탈리도마이드, 또는 포말리도마이드와 같은 약물이 첨가되는 경우, 결과는 "레날리도마이드, 탈리도마이드, 및 포말리도마이드는 ... E3 유비퀴틴 리가아제에 의해 ... 기질의 유비퀴틴화 및 분해를 촉진하고, ... 각각의 이들 약물은 전사 인자, IKZF1 및 IKZF3의 분해를 유도한다"는 것이다(Kronke et al (2015) Nature. 523:183-188).

[0460] 용어에 관하여, 세레브론은 "E3 리가아제"라고 지칭되고, 또한 "E3 유비퀴틴 리가아제"로도 지칭되는 단백질의 복합체의 부분으로 기재되었다. 일반적으로, 세레브론 그 자체는 "E3 리가아제"로 지칭되지 않는다. 하기 발췌는 단어 "세레브론"이 어떻게 사용되는지를 나타낸다. 문헌[Akuffo et al (2018) J. Biol. Chem. 293:6187-6200]에 따르면, "탈리도마이드에 결합 시 ... E3 리가아제 기질 수용체 세레브론은 ... DDB1-CUL4A-Roc1-RBX1 E3 유비퀴틴 리가아제에 맞물림으로써 [기질의] 프로테아솜 파괴를 촉진한다". 일관되게, 문헌[Yang et al (2018) J. Biol. Chem. 293:10141-10157]은 "세레브론은 ... 단백질 [기질] 유비퀴틴화를 매개하는 쿨린-4 RING E3 리가아제의 기질 수용체로서 기능한다"고 개시된다. 문헌[Zhu et al (2014) Blood. 124:536-545]은 "탈리도마이드는 CRBN [세레브론]에 결합하여 CRBN, DDB1, 및 CUL4로 구성된 ... E3 유비퀴틴 리가아제 복합체의 기능을 변경한다"고 기재한다. 문헌[Lopez-Girona et al (2012) Leukemia. 26:2326-2335]은 "연구는 Cul4A 및

Roc1과의 작용성 E3 리가아제 복합체로부터 탈리도마이드... CCRBN 및 ... DDB1의 ... 직접적인 분자 표적으로서 E3 리가아제 단백질 세레브론(CCRBN)을 확인하였다"고 기재한다.

[0462] 출원인에 의해 고안되고 사용되는 세포 기반의 검정의 큰 그림을 보기 위하여, 제1 단계는 레날리도마이드를 세포에 가하는 것이다. 마지막 단계는 IKZF1 및 IKZF3이 분해되는 것이다. IKZF1이 GFP와의 융합 단백질로서 발생하는 경우, 마지막 단계는 전체 융합 단백질이 프로테아솜에 의해 분해되는 것이다. 유사하게, IKZF3이 GFP와 융합 단백질로서 발생하는 경우, 최종 단계는 이러한 전체 융합 단백질이 프로테아솜에 의해 분해되는 것이다. GFP 분해의 결과는 녹색 형광 세포가 된 후, 세포는 비형광 세포로 바뀐다는 것이다.

[0463] 세포 기반의 검정의 더 긴 설명. 이는 E3 유비퀴틴 리가아제의 단백질(단백질의 복합체)의 명칭, 이러한 복합체에 결합하는 단백질의 명칭, 및 이러한 복합체의 표적인 단백질의 명칭에 관한 것이다. 이들 명칭에 대하여, 공개된 문헌은 일관하지 않다. 때때로 이는 단백질의 명칭에 의해 단백질을 지칭하고, 때때로 이는 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭을 사용하여 단백질을 지칭한다. 이러한 이유로, 하기 설명은 유전자의 명칭과 함께 단백질의 명칭을 사용하고, 예를 들면, "세레블롬"(단백질의 명칭)" 및 "CCRBN"(유전자의 명칭)을 사용한다. 또한, "아카로스"는 단백질의 명칭이고, 유전자의 명칭은 IKZF1이다. 또한, "아이올로스"는 단백질의 명칭이고, IKZF3은 유전자의 명칭이다. "콜린-고리 핑거 리가아제-4"는 단백질의 명칭이고, 유전자의 명칭은 CRL4이다. "콜린-1의 조절체"는 단백질의 명칭이고, 유전자의 명칭은 ROC1이다. ROC1은 또한 RBX1로도 알려져 있다(Jia and Sun (2009) Cell Division. 4:16. DOI:10.1186). "콜린-4A"는 단백질의 명칭이고, 유전자의 명칭은 CUL4A이다. 문헌[Schafer, Ye, Chopra (2018) Ann. Rheum. Dis. DOI:10.1136; Chen, Peng, Hu (2015) Scientific Reports. 5:10667; Matyskiela et al (2016) Nature. 535:252-257; Akuffo et al (2018) J. Biol. Chem. 293:6187-6200]을 참조한다.

[0464] E3 유비퀴틴 리가아제는 유비퀴틴의 잔기의 표적 단백질로의 전달을 촉매 작용하고, 여기서 결과는 표적 단백질이 분해를 위한 프로테아솜으로 보내진다는 것이다. E3 리가아제는 표적 단백질의 하나 이상의 리신 잔기에 대한 유비퀴틴의 부착을 촉매 작용한다. 인간은 약 617종의 상이한 E3 유비퀴틴 리가아제 효소를 발현한다(문헌[Shearer et al (2015) Molecular Cancer Res. 13:1523-1532] 참조). E3 유비퀴틴 리가아제는 이러한 단백질의 복합체이다: DNA 손상 결합 단백질-1(DDB1); 콜린-4(CUL4A 또는 CUL4B); 콜린-1의 조절체(RoC1); 및 RING 박스-도메인 단백질(RBX1). 상기 기재된 바와 같이, RoC1은 RBX1와 동일한 단백질이다(문헌[Jia and Sun (2009) Cell Division. 4:16. DOI:10.1186] 참조). 세레브론(CCRBN)이 E3 유비퀴틴 리가아제 복합체에 결합되는 경우, 수득되는 큰 복합체는 CRL4^{CCRBN}로 지칭된다(Matyskiela et al (2016) Nature. 535:252-257). 용어 "CRL4"는 "콜린-4 RING 리가아제"를 의미한다(Gandhi et al (2013) Brit. J. Haematol. 164:233-244; Chamberlain et al (2014) Nature Struct. Mol. Biol. 21:803-809). 명명법에서 상기 불일치성은 세레브론 문헌을 읽을 때 고려할 필요가 있다.

[0465] 하기는 상기 개시된 짧은 발췌의 더 긴 버전이다. 하기는 명명법의 또 다른 형태, 즉, 용어 "CRL4^{CCRBN} E3 유비퀴틴 리가아제"가 하기 기재된다. 더 긴 설명은 다양한 명칭 및 세포성 사건을 더 완전히 통합시킨다. "세레브론(CCRBN)과 E3 유비퀴틴 리가아제 복합체 사이의 관계는 "세레브론(CCRBN)이 DDB1-CUL4A-RoC1-RBX1 E3 유비퀴틴 리가아제와 맞물림으로써 [표적 단백질의] 프로테아솜 분해를 촉진한다"고 기재되었다(Akuffo et al (2018) J. Biol. Chem. 293:6187-6200). 항암 약물에 관하여, "레날리도마이드, 탈리도마이드, 및 포말리도마이드는 ... E3 유비퀴틴 리가아제에 의해 기질의 ... 유비퀴틴화 및 분해를 촉진한다. 이러한 화합물은 CCRBN, CRL4^{CCRBN} E3 유비퀴틴 리가아제에 ... 대한 기질 어댑터에 결합하고, 이를 약물 각각은 ... 전사 인자, IKZF1 및 IKZF3의 분해를 유도한다"(Kronke et al (2015) Nature. 523:183-188).

[0466] 이는 임의의 주어진 마이크로웰, 나노웰, 또는 피코웰이 비드가 공유적으로 연결된 화합물을 갖는 비드를 함유하고, 화합물이 절단 가능한 링커를 통해 부착되고, 웰이 하나 이상의 배양된 포유동물 세포를 함유하는, 세포 기반의 검정에 관한 것이다. 본 개시내용의 화합물 및 약물 후보에 대한 반응은 하나 이상의 생체마커에 의해 평가될 수 있다.

[0467] 생체마커는 진단 생체마커, 주어진 환자가 주어진 약물에 반응할 것인지(더 나아질 것인지) 여부를 예측하는 생체마커, 주어진 환자가 주어진 약물에 대하여 허용되지 않는 독성을 경험할 것인지 여부를 예측하는 생체마커를 포함한다(Brody, T. (2016) Clinical Trials: Study Design, Endpoints and Biomarkers, Drug Safety, and FDA and ICH Guidelines, 2nd ed., Elsevier, San Diego, CA). 본 개시내용은 또 다른 종류의 생체마커, 즉, 약물 요법이 개시된 후, 주어진 약물에 대한 환자의 반응을 모니터링하는 생체마커를 사용한다. 예시를 제공하기

위하여, 하기는 생체마커 "페옥시레독신6(PRDX6) 및 폐암에 관한 것이다. 휴스 등(Hughes et al)에 따르면, "게피티닙 처리 대비히를 후, ... 세포주로부터의 ... 세포 배지에서 PRDX6 수준은 증가하였고, ... 시간에 따른 PRDX6 측정은 게피티닙 감응성과 양성적으로 상관관계가 있었다. 혈청 PRDX6 수준은 ... 처음 처리 24시간 동안 ... 뚜렷하게 증가하였고, 게피티닙 처리 과정 동안 ... 혈청 PRDX6에서 변화하고, 항-EGFR 제제에 대한 반응을 모니터링하기 위한 영상 기반 전략에 대한 이점을 ... 제공한다". 생체마커는 반응의 효능의 더 직접적인 측정, 즉, 종양 크기 및 수에서의 감소를 검출하는 "영상화"의 사용에 대하여 이점을 갖는다는 설명을 주목한다 (Hughes et al (2018) Cancer Biomarkers. 22:333-344). 항암 약물에 대한 반응을 모니터링하는 다른 생체마커는 난소암에 대한 플라틴 요법에 대한 반응을 모니터링하기 위한 CA125, 및 난소암에 대한 화학요법에 대한 반응을 모니터링하기 위한 혈청 HSPB1을 포함한다(문헌[Rohr et al (2016) AntiCancer Res. 36:1015-1022; Stope et al (2016) AntiCancer Res. 36:3321-3327] 참조).

[0468]

사이토킨 발현. 반응은 발현된 사이토킨, 예를 들면, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-감마, 및 TNF-알파를 측정함으로써 평가될 수 있다. 이러한 특정한 사이토킨은 이러한 사이토킨 중 하나를 특정이적으로 인식하는 항체를 갖는 금 나노구조를 사용하여 동시에 측정될 수 있고, 여기서 검출은 플라스몬 공명을 포함한다(Spackova, Wrobel, Homola(2016) Proceedings of the IEEE. 104:2380-2408; Oh et al (2014) ACS Nano. 8:2667-2676). 단일 세포, 예를 들면, 단일 T 세포에 의해 발현된 사이토킨은 마이크로웰을 포함하는 장치에서 형광성 항체에 의해 측정될 수 있다(Zhu, Stybayeva(2009) Anal. Chem. 81:8150-8156). 상기 방법은 본 개시내용의 시약 및 방법으로서 유용하다.

[0469]

몇몇 실시형태에 있어서, 사이토킨에 대한 항체는 피코웰의 벽에 부착될 수 있고, 여기서 임의의 사이토킨은 약물 노출의 기능이 피코웰의 벽에 결합된 항체에 의해 포획될 수 있음에 따라 세포로부터 방출되거나 또는 별도로 방출된다. 포획된 사이토킨은 표지화된 항체의 제2 세트에 의해 동정될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 사이토킨에 대한 항체는 캡핑 비드에 부착될 수 있다. 그 다음, 캡핑 비드는 박리될 수 있고 추가의 분석, 예를 들면, ELISA, 질량 분석법 또는 다른 분석 기술의 대상이 되는 가교결합 하이드로겔 시트에 판매될 수 있다.

[0470]

아톱토시스. 아톱토시스에 대한 실시간 데이터, 및 단일 세포의 아톱토시스에서 초기 사건은 표면-강화 라만 분광법(SERS) 및 국한된 표면 플라스몬 공명(LSPR)에 의해 측정될 수 있다(문헌[Stojanovic, Schasfoort(2016) Sensing Bio-Sensing Res. 7:48-54; Loo, Lau, Kong (2017) Micromachines. 8:338. DOI:10.3390] 참조). 문헌[Stojanovic, 상기 참조]은 사이토크롬 C, EpCam, 및 CD49e의 세포로부터의 방출을 검출한다. 문헌[Loo et al, 상기 참조]은 사이토크롬 C의 세포로부터의 방출을 측정하고, 여기서 검출은 DNA 앱타머를 포함한다(이러한 DNA 앱타머는 항체와 같이 작용한다). 주 등(Zhou et al)은 SERS을 사용하여 단일 세포에서 초기 아톱토시스를 검출하고, 여기서 측정되는 것은 세포막 상의 포스파티딜 세린이다(문헌[Zhou, Wang, Yuan (2016) Analyst. 141:4293-4298] 참조). 아톱토시스에 대한 데이터를 수집하는 것 이외에, SERS는 마이코시스의 단계, 대사물질의 방출, 원형질 막에 결합된 생체분자의 발현에 대한 데이터를 수집함으로써 약물 활성을 측정하는데 사용될 수 있다(문헌[Cialla-May et al (2017) Chem. Soc. Rev. 46:3945-3961] 참조). 플라스몬 공명은 아톱토시스에서 발생하는 단백질 변성 및 DNA 단편화를 측정할 수 있다(문헌[Kang, Austin, El-Sayed(2014) ACS Nano. 8:4883-4892]. 플라스몬 공명(SERS)은 베타 시트 형태에 대한 알파 헬릭스 형태의 유사분열 단백질의 퍼센트를 측정함으로써 암 세포와 정상 세포를 구별할 수 있다(Panikkanvalappil, Hira, El-Sayed(2014) J. Am. Chem. Soc. 136:159-15968). 상기 방법은 본 개시내용에 대한 시약 및 방법으로서 적합하다.

[0471]

아톱토시스는 또한 플라스몬 공명을 사용하지 않고, 대신에 항-절단된 카스파제-3 항체를 사용하는 면역세포화학을 사용하는 방법으로 배양된 세포에서 측정될 수 있다(Shih et al (2017) Mol. Cancer Ther. 16:1212-1223).

[0472]

세포 기반의 검정에 대한 일반적인 정보. 본 개시내용의 세포 기반의 검정은 인간 암 세포, 고형 종양으로부터의 세포, 혈액암으로부터의 세포, 인간 줄기 세포, 인간 간세포, 병원성 박테리아, 감염성 박테리아, 박테리아에 감염된 인간 세포, 바이러스에 감염된 인간 세포 등으로부터의 반응을 시험하는데 사용될 수 있다. 검정은 세포의 형태학적 반응, 예를 들면, 이동뿐만 아니라 유전적 반응 및 생화학적 반응을 검출할 수 있다.

[0473]

본 개시내용의 검정은 피코웰 내부에 위치한 세포의 반응을 검출하거나, 피코웰 외부에, 예를 들면, 피코웰의 어레이 위에 층으로서 위치한 영양 배지에 위치한 세포의 반응을 검출하도록 설계될 수 있다. 또한, 본 개시내용의 검정은 세포 및 비드가 배지 내에 위치하는 경우, 세포가 배지 내에 위치하고 비드가 배지의 위 또는 아래에 위치하는 경우, 세포가 배지의 상부에 위치하고 비드가 배지 위에 또는 내에 또는 아래에 위치하는 경우, 세포의 반응을 검출하도록 설계될 수 있다.

- [0474] 본 개시내용은 피코웰 어레이에 세포의 집단을 제공한다. 실시형태에 있어서, 세포 집단의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 40%, 적어도 약 60%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100%는 피코웰 내부에 존재한다(그리고 피코웰의 위에 위치한 임의의 영역에 존재하지 않는다). 실시형태에 있어서, 웰의 내부에 존재하고 나머지는 웰의 어레이 위에 존재하는 영양 배지의 층에 위치하는 세포의 집단은 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 또는 이러한 숫자 중 2개에 의해 규정되는 임의의 범위, 예를 들면, "약 60% 내지 약 90%" 범위일 수 있다.
- [0475] **세포에 대한 매트릭스.** 세포가 비드로부터 방출된 화합물에 노출되거나, 세포가 비드-결합된 화합물에 노출되는 경우, 세포의 생물학적 활성을 검정하기 위하여, 적합한 매트릭스는 하기 중 하나 이상을 포함하는 것들을 포함한다: 폴리-D-리신(PDL), 폴리-L-리신(PLL), 폴리-L-오르니틴(PL0), 비트로넥틴, 오스테오피온틴, 콜라겐, RGD 서열을 함유하는 웹타이드, RGD 서열을 함유하는 폴리펩타이드, 라미닌, 라미닌/피브로넥틴 복합체, 라미닌/엔탁틴 복합체 등. 적합한 매트릭스는 또한 코닝 인크(Corning, Inc.)로부터 이용 가능한 제품, 예를 들면, 퓨라매트릭스(PuraMatrix)® 웹타이드 하이드로겔®, 셀탁(Cell-Tak)® 세포 및 조직 접착제, 마트리겔(Matrigel)® 등을 포함한다. 문헌[Corning Life Sciences (2015) Corning Cell Culture Surfaces, Tewksbury, MA (20 pages), De Castro, Orive, Pedraz (2005) J. Microencapsul. 22:303-315]을 참조한다. 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 상기 매트릭스 중 하나 또는 상기 중합체 중 하나를 포함하는 임의의 조성물 또는 방법을 배제할 수 있다.
- [0476] 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 개별적인 피코웰이 비드, 하나 이상의 세포, 및 용액(임의의 매트릭스가 없음) 또는 매트릭스 또는 조합된 용액 및 매트릭스를 함유하는 어레이를 제공한다. 매트릭스는 하이드로겔, 폴리리신, 비트로넥틴, 마트리겔® 등일 수 있다.
- [0477] 비드-결합된 화합물 또는 비드-방출된 화합물의 활성을 수행될 수 있다. 활성을 평가하는 검정은 효소의 활성화 또는 억제, 세포-신호전달 캐스케이드 또는 개별적인 세포-신호전달 단백질의 활성화 또는 억제, 항체(또는 항체의 상보 결정 부위(CDR), 또는 항체의 가변 부위)에 대한 결합, 효소(또는 항체, 또는 항체의 가변 부위)에 대한 리간드 또는 기질의 결합의 억제를 포함할 수 있다.
- [0478] 상기 검정을 위하여, 판독은, 예를 들면, 소광제에 연결된 형광단(F-Q)을 포함하는, 형광 검정에 의해 결정될 수 있다. 링커는 엔도프로테아제, DNase, RNase, 또는 포스포리파제에 의해 절단 가능하도록 설계될 수 있다(문헌[Stefflova, Zheng (2007) Frontiers Bioscience. 12:4709-4721] 참조). 용어 "분자 비콘"은 이러한 유형의 F-Q 분자를 나타내고, 하지만, "분자 프로브"는 또한 TaqMan® 검정에서와 같이, F와 Q의 분리가 혼성화에 의해 유도되는 구조물을 나타내는데 사용되었다(Tyagi and Kramer (1996) Nature Biotechnol. 14:303-308; Tsourkas, Behlke, Bao (2003) Nucleic Acids Res. 15:1319-1330).
- [0479] **약물 노출에 대한 반응에서 전사 프로파일링.** 본 개시내용의 DNA 바코드는 반응-포획 요소를 함유하도록 개질될 수 있고, 여기서 반응 포획 요소는 바코드의 인코딩 부분에 의해 인코딩된 섭동에 대한 세포의 반응을 포획한다. 몇몇 실시형태에 있어서, DNA 바코드는 폴리-T 섹션(티미딘 뉴클레오타이드의 다중 반복)에서 종료될 수 있고, 여기서 폴리-T 서열은 용해된 세포로부터 방출된 폴리-A 말단의 mRNA 분자를 포획하는데 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 반응-포획 서열은 관심대상 유전자에 상보적일 수 있고, 이에 따라 이러한 실시형태의 비드에 대한 혼성화를 통해 원하는 유전자의 발현 프로파일을 포획한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피코웰은 이의 전사 프로파일이 비드 상에 포획되는 단일 세포 피코웰을 함유할 수 있다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 복수의 세포는 이의 전사 프로파일이 포획되는 피코웰에 함유될 수 있다.
- [0480] 하나의 예시적인 작업흐름에 있어서, 하기 과정은 약물에 대한 세포의 전사 반응을 포획하기 위하여 따를 수 있다. (a) 웰당 단일 세포를 포획하도록 설계된 피코웰이 제공된다. (b) 화합물-함유된, DNA 바코딩된 비드는 하나의 비드가 피코웰당 존재하도록 피코웰로 도입된다. (c) 화합물은 적절한 방법으로 각각의 피코웰에서 비드로부터 방출된다(실시형태의 비드에 적절한 경우, UV 절단 가능한 링커를 통해 부착된 화합물에 대한 UV 처리, 화합물에 침지된 비드의 경우에 화산, 산 절단 가능, 염기 절단 가능, 온도 절단 가능 등). (d) 피코웰은 피코웰 내에 내용물을 보유하는 캡핑 비드를 통하여거나 피코웰의 상부에 공기 장벽 또는 오일 장벽과 같은 다른 수단에 의해 서로 단리될 수 있다. (e) 피코웰에서 세포는 기간 동안 비드로부터 방출된 화합물의 존재하에 배양되는 것이 허용된다. (f) 적합한 양의 시간, 예를 들면, 1시간, 2시간, 5시간, 9시간, 12시간, 15시간, 18시간, 1일, 3일, 1주, 2주, 1개월, 또는 검정을 기반으로 한 또 다른 적절한 시간 후, 세포는 용해 방법에 의해 용해된다. 용해 방법은 세제의 첨가, 냉동과 해동의 반복된 주기, 가열, 막 파괴 웹타이드의 첨가, 기계적 교반 또는 다른 적합한 수단을 포함할 수 있다. (g) 용해된 후, 세포의 내용물을 피코웰 내의 비드에 노출되고, 이 때 피코웰의

비드 상의 반응-포획 요소는 이들이 설계하는 반응을 포획하는 것이 가능해진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 반응 포획은 각각의 피코엘 내의 세포(또는 세포들)의 완전한 mRNA 프로파일을 포획하는 폴리-T 서열이다. 몇몇 실시 형태에 있어서, 반응-포획 요소는 세포로부터 특이적인 DNA 또는 RNA 서열을 포획하도록 설계된다. 몇몇 실시 형태에 있어서, 세포의 전사 반응은 화합물의 투여량(또는 농도)의 함수로서 포획될 수 있다.

[0481] (XIV) 세포에 대한 섭동-반응 분석

본 명세서에 기재된 방법은 섭동의 라이브러리 및 세포의 라이브러리를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 및 세포는 국한된 환경에서 배양된다. 배양 동안 또는 후, 섭동을 동정하는 바코드("섭동 바코드")는 이와 함께 배양되는 세포로 전달될 수 있다. 방법은 섭동으로부터 세포를 방출하는 것(즉, 분리하는 것 또는 제거하는 것), 및 섭동 바코드와 함께 세포 내용물이 포획되는 제2 컨파인먼트에 세포를 적용하는 것을 더 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 제2 컨파인먼트는 세포-특이적 바코드를 함유할 수 있고, 이는 후속적으로 세포 내용물 및 섭동 바코드를 연구하고, 따라서 섭동을 세포 반응에 관련시키는데 사용될 수 있다.

몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법은 두 가지 반응, 즉, 섭동 바코드에 의해 인코딩되는 섭동 반응 및 측정 반응을 포함할 수 있다. 섭동 반응에서, 세포는 섭동의 대상이 될 수 있다. 측정 반응에서, 섭동의 결과로서 세포 반응은 측정될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 측정 반응은 측정 바코드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 방법은 섭동 바코드를 측정 반응까지 가져가는 것, 및 측정 반응에 함유된 측정 바코드 및 섭동 바코드 둘 다를 포획하는 것, 따라서 섭동을 세포 반응에 관련시키는 것을 포함할 수 있다.

본 명세서에 기재된 방법은 섭동 바코드에 의해 인코딩되는 섭동 반응을 포함할 수 있다. 섭동 반응은 세포를 섭동에 적용하고, 후속적으로 적용된 섭동에 대한 세포의 세포 반응을 측정하는 것을 포함한다. 섭동 바코드는 세포 반응을 측정하기 전 또는 후에, 디코딩될 수 있고, 따라서 섭동의 동일성을 측정된 세포 반응에 관련시킨다.

몇몇 실시형태에 있어서, 방법은 DNA-인코딩된, 비드-결합된 화합물 라이브러리를 제공하는 단계로서, 여기서 화합물은 비드로부터 방출될 수 있는, 단계, DNA-인코딩된, 비드-결합된 화합물 라이브러리를 세포의 라이브러리와 접촉시키는 단계로서, 여기서 접촉은 하나 이상의 세포에 의해 비드를 제1 국한된 부피로 국한함으로써 수행될 수 있는, 단계, 화합물을 비드로부터 방출시키는 단계, 및 화합물을 제1 국한된 부피로 세포와 함께 배양하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 동시에 또는 배양 후에, 화합물을 동정하는 DNA 바코드는 비드로부터 방출되고 세포에 부착될 수 있다. 그 다음, 부착된 DNA 바코드를 갖는 세포는 제1 국한된 부피로부터 방출되고, 다시 제2 국한된 부피로 국한되고, 여기서 제2 국한된 부피는 세포를 용해하는 시약 및 세포에 의해 담지된 비드-특이적 바코드를 포획하는 메커니즘을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 내용물 및 바코드를 포획하는데 사용되는 메커니즘은 단일 세포 또는 세포의 작은 클러스터를 고유하게 동정하는 기능을 할 수 있는 포획 바코드를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 포획 바코드 및 비드-특이적 바코드는 연결될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 개별적으로 바코딩된 물질을 함유하는 모든 국한된 부피는 병합되어 바코딩된 세포 내용물 및 세포 및 비드에 특이적인 바코드의 풀을 생성할 수 있다. 바코딩된 물질의 풀은 개별적인 세포 반응 및 세포 반응을 유발하는 섭동에 대한 이들의 연결을 연구하기 위하여 시퀀싱에 의해 분석될 수 있다.

몇몇 실시형태에 있어서, 방법은 소적 내의 개별적인 세포를 포획하는 것을 포함한다. 세포는 세포에 의해 경험된 섭동을 고유하게 동정하기 위하여 이의 세포막 위에 핵산 바코드를 함유할 수 있다. 세포는 소적 내에서 용해될 수 있고, 세포의 mRNA 및 세포막 결합된 핵산 바코드는 한 세트의 바코딩된 포획 올리고뉴클레오타이드("포획 바코드") 상에 포획될 수 있다. 각각의 소적은 상이한 고유하게 바코딩된 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 여기서 하나의 소적 내의 바코드는 실질적으로 동일한 서열의 스트레치를 갖는다. mRNA 및 세포 막 결합된 바코드는 역전사를 사용하여 소적-바코딩된 올리고뉴클레오타이드 상에 카페될 수 있다. 핵산 물질은 소적을 파괴함으로써 소적으로부터 함께 풀링될 수 있다. 모든 핵산 물질을 서열화하여 개별적인 세포의 전사 프로파일을 연구할 수 있고, 이를 전사 프로파일과 연관된 섭동에 관련시킨다.

본 명세서에 기재된 방법은 2개의 바코딩된 컨파인먼트, 섭동 컨파인먼트 및 용해 컨파인먼트에 세포의 라이브러리를 적용하는 것을 포함할 수 있다. 세포는 개별적으로 또는 작은 클러스터로서 국한될 수 있다. 바코드는 세포를 섭동하는 동안 세포로 도입된 바코드 및 세포를 용해하는 동안 도입된 바코드를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 바코드는 세포에 의해 용해 단계로 운반될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 용해 바코드는 세포 내용물 및/또는 섭동 바코드에 적용될 수 있고, 이는 세포 내용물을 세포에 의해 경험된 섭동에 관련시키는 바코딩된 세포 내용물의 확립을 야기한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 비드는 또한 반응-포획 프로

브를 함유할 수 있다. 이 경우, 2개의 구획 단계 대신에, 단일 피코웰 구획 단계가 충분할 수 있다. 이러한 실시형태에 있어서, 화합물 바코드는 세포 반응을 포획할 수 있도록 작용화될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 바코드는 mRNA 분자의 폴리(A) 꼬리가 혼성화될 수 있는 폴리(T) 단편으로 끝난다.

[0488]

몇몇 실시형태에 있어서, 단일-세포 섭동-반응 분석에 대한 작업흐름은 다음과 같다: (1) 작용화된 섭동 비드를 제공하고, 여기서 섭동 바코드는 포획 서열로 끝나고, 여기서 포획 서열은 mRNA의 포획을 위하여 폴리(T) 뉴클레오타이드, 또는 다른 세포 반응을 포획하기 위하여 다른 적절한 포획 프로브의 세트를 포함할 수 있고, (2) 피코웰 어레이에서 세포의 라이브러리를 포획하고, (3) 작용화된 섭동의 라이브러리를 동일한 피코웰 내에 포획하고, 여기서, 몇몇 실시형태에 있어서, 단일 세포 및 단일 작용화된 비드는 웰당 포획되고, 다른 실시형태에 있어서, 세포의 클러스터는 피코웰 내에 포획되고, (4) 선택적으로 피코웰을 오일 매질로 덮어 웰 사이의 시약의 교차 오염을 방지하고, (5) 화합물을 섭동 비드로부터 방출하고, 섭동 비드로부터 방출된 화합물을 갖는 각각의 웰에서 세포를 배양하고, (6) 용해 버퍼를 피코웰 위에 흐르게 하여 피코웰 내의 세포를 용해시키고, (7) 섭동 바코드의 텁 위에 직접적으로 mRNA 또는 다른 세포 반응을 포획하고, (8) 중합효소 또는 역전사효소를 사용하여 섭동 바코드에 세포 반응을 카피하고, (9) 초음파 처리 후, 방출된 비드로부터 연장된 섭동 바코드를 절단하거나, 단순하게 비드가 여전히 피코웰 내에 있는 채로 비드로부터 섭동 바코드를 절단하여, 비드를 피코웰로부터 방출시키고, (10) 절단된 뉴클레오타이드(연장된 섭동 바코드)에 적절한 라이브러리 제조 방법을 수행하고, 이렇게 제조된 뉴클레오타이드를 시퀀싱한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 시퀀싱된 뉴클레오타이드는 2개의 단편을 함유한다: 세포가 대상이 되는 섭동/화합물을 동정하는 섭동 바코드, 및 섭동 바코드에 의해 동정되는 섭동/화합물의 대상이 되는 세포의 mRNA 발현에 상응하는 반응 단편. 이러한 작업흐름은 공정의 QC에 대하여 임의의 영상화 단계와 함께 도 36에 도시된다. 역전사효소 방법은 비드-부착된 DNA 상의 포획된 RNA를 연장하는 것을 제공할 수 있고, 이에 따라 세포 내용물 정보가 작용화된 비드 상에 전달된다. 그 다음, 비드는 폴링되고, 추출되고, 시퀀서에서 분석될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단일 세포로부터의 DNA는 또한 작용화된 비드 상의 특이적인 프라이머에 대하여 포획될 수 있다. 이러한 실시형태에 있어서, 중합효소는 역전사효소를 대체할 수 있다.

[0489]

몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 및 세포-반응 포획은 도 37에 도시된 바와 같이 2개의 상이한 컨파인먼트에서 발생할 수 있다. 섭동 바코드는 세포-반응-포획 컨파인먼트에 대상이 되기 전에 세포 표면 상에 전달될 수 있다. 세포-반응-포획은 또한 세포-표면 상에 운반된 섭동 바코드를 포획하고, 따라서 세포 반응을 세포가 노출된 섭동에 관련시키는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응의 포획은 드롭-세크(Drop-seq) 방법에 의해 달성될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응의 포획은 임의의 상업적인 단일-세포 분석 장치, 예를 들면, 10X 게노믹스 단일-세포 장치, 레인댄스(Raindance) 단일-세포 분석 프로토콜, 바이오라드(BioRad) 단일-세포 단리 장치, 미션 바이오(Mission Bio) 단일-세포 분석 프로토콜, 기가겐(GigaGen) 장치 및 프로토콜, 및/또는 임의의 다른 상업적으로 이용 가능한 단일-세포 분석 장치 또는 서비스에서 발생할 수 있다.

[0490]

몇몇 실시형태에 있어서, 세포 혼탁액은 섭동 비드와 함께 컨파인먼트를 겪는 세포에 대하여 출발점으로서 사용될 수 있다. 수성 매질 중에 세포를 혼탁하거나 혼탁액 중에 배양 세포를 혼탁하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다. 세포 및 배양 세포를 혼탁액 중에 혼탁하는 방법은 또한 당해 분야에 기재되어 있다. 예를 들면, 몇몇 실시형태에 있어서, 회전타원체 세포 배양은 단리에서 단일 세포보다 더 많은 세포-세포 상호 작용 서명을 포획하기 때문에 섭동에 대한 출발점으로서 사용될 수 있다(예를 들면, 문헌[Edmondson et al., Assay Drug Dev Technol. 12:207-218, 2014, Fennema et al., Trends Biotechnol. 31:108-115, 2013, Han et al., Sci Reports 5:11891, 2015, Zanoni et al., Sci Reports 6:19103, 2016] 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 몇몇 실시형태에 있어서, 오가노이드를 단일 세포 대신에 사용하여 대량신속처리 섭동을 겪을 수 있다(문헌[e.g., Foley, Nat Methods 14:559-562, 2017, Liu et al., Front Pharmacol. 7:334, 2016, Neugebauer et al., BioRxiv April 2017, Skardal et al., Drug Discov Today 21:1399-1411, 2016, Boehnke et al., J Biomol Screen 21:931-941, 2016] 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다).

[0491]

몇몇 실시형태에 있어서, 세포는 질환 모델로부터 수득된다. 본 명세서에 기재된 방법은 섭동/화합물 라이브러리에서 화합물 중 하나 이상에 노출시켜 치료적 반응이 수득되는지 여부를 알기 위하여 질환 모델 세포에 대하여 화합물의 대규모 대량신속처리 스크리닝을 허용한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포는 다양한 계통의 건강한 세포이다. 본 명세서에 기재된 방법은 다양한 화합물에 대한 세포 반응의 대규모 대량신속처리 맵핑을 허용한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포에 대하여 조합적인 화합물 라이브러리의 편향적이지 않은 스크리닝에 의해 수집된 데이터는 약물-세포 상호작용의 공지된 맵을 기반으로 신규한 약물 예측을 가능하게 한다.

[0492] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법에서 사용되는 컨파인먼트는 소적 컨파인먼트를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 소적은 오일 매트릭스 중의 수성 소적을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 소적은 수성 상 및 오일 상의 혼합을 포함하는 미세유체 접합부에서 생성된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 미세유체 접합부는 세포, 섭동 비드, 및 오일 상을 포함한다. 세포 및 비드를 갖는 소적을 생성하기 위한 미세유체 구조물의 하나의 실시형태는 "드롭-세크" 방법에 의해 설명된다(문헌[e.g., Macosko et al., Cell 161:1202-1214, 2015] 참조).

[0493] 몇몇 실시형태에 있어서, 방법은 하이드로겔 컨파인먼트를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법에서 사용되는 컨파인먼트는 하이드로겔 컨파인먼트를 포함하고, 여기서 세포 및 비드는 이들의 유리화산을 방지하는 하이드로겔 매트릭스에 포매된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 서로 아주 가까운 세포 및 비드의 공편재화가 우연히 발생한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 비드는 세포에 접착되는 결합 잔기를 함유하고, 여기서 세포-비드 듀플렉스는 그 다음 하이드로겔에 포매된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 비드의 세포에 대한 인접함은 비드로부터 방출된 화합물이 교차 반응성을 유도하는 확산 없이 오직 세포만을 섭동하는 것을 보장한다(세포 간격은 하이드로겔 중의 화합물의 확산 반경보다 더 멀리 있다). 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 후, 세포는 용해버퍼가 하이드로겔을 통과함에 따라 용해되고, 여기서 방출된 세포 내용물을 세포에 인접한 비드 상에 포획된다. 일부 관련 문헌은 문헌[Zhu and Yang, Acc. Chem. Res. 50:22, 2017, Sung and Shuler, Lab Chip 9:1385-1394, 2009, Gurski et al., Biomaterials 30:6076, 2009, Microfluidic Immunophenotyping Assay Platform for Immunomonitoring of Subpopulations of Immune Cells, pages 1761-1763, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS, 2013] 및 미국 특허 공보 제US20030175824 A1호이고, 이들의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0494] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법에서 사용되는 컨파인먼트는 피코웰 컨파인먼트를 포함하고, 여기서 개별적인 비드 및 세포는 미세제작된 피코웰 내에 포획되고, 검정은 피코웰의 어레이에서 수행된다. 세포 및 비드를 피코웰의 어레이에 로딩하는 상세한 과정은, 예를 들면, 문헌[Yuan and Sims, Sci Rep. 6:33883, 2016]에 기재된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 비드는 또한 반응-포획 프로브를 함유하고, 여기서 2개의 컨파인먼트 단계 대신에, 단일 피코웰 컨파인먼트 단계가 충분하다. 이러한 실시형태에 있어서, 섭동 바코드는 세포 반응을 포획할 수 있도록 작용화될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 섭동 바코드는 mRNA 분자의 폴리(A) 꼬리가 혼성화될 수 있는 폴리(T) 단편으로 끝난다.

[0495] 몇몇 실시형태에 있어서, 단일-세포 섭동-반응 분석에 대한 작업흐름은 하기와 같다(예를 들면, 도 36 참조): (1) 작용화된 섭동 비드를 제공하고, 여기서 섭동 바코드는 포획 서열로 끝나고, 여기서 포획 서열은 mRNA의 포획을 위한 폴리(T) 뉴클레오타이드, 또는 다른 세포 반응을 포획하기 위한 다른 적절한 포획 프로브의 세트를 포함할 수 있고, (2) 세포의 라이브러리를 피코웰 어레이에 포획하고, (3) 작용화된 섭동의 라이브러리를 동일한 피코웰에 포획하고, 여기서, 몇몇 실시형태에 있어서, 단일 세포 및 단일 작용화된 비드는 웰당 포획되고, 다른 실시형태에 있어서, 세포의 클러스터는 피코웰에 포획될 수 있고, (4) 선택적으로 피코웰을 오일 매질로 덮어 웰 사이의 시약의 교차 오염을 방지하고, (5) 화합물을 섭동 비드로부터 방출시키고, 섭동 비드로부터 방출된 화합물과 함께 각각의 웰에서 세포를 배양하고, (6) 용해 버퍼를 피코웰 위에 흐르게 하여 피코웰 내의 세포를 용해시키고, (7) 섭동 바코드의 텁 위에 직접적으로 mRNA 또는 다른 세포 반응을 포획하고, (8) 중합효소 또는 역전사효소를 사용하여 섭동 바코드에 세포 반응을 카피하고, (9) 초음파 처리 후, 방출된 비드로부터 연장된 섭동 바코드를 절단하거나, 단순하게 비드가 여전히 피코웰 내에 있는 채로 비드로부터 섭동 바코드를 절단하여, 비드를 피코웰로부터 방출시키고, (10) 절단된 뉴클레오타이드(연장된 섭동 바코드)에 적절한 라이브러리 제조 방법을 수행하고, 이렇게 제조된 뉴클레오타이드를 시퀀싱한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 시퀀싱된 뉴클레오타이드는 2개의 단편을 함유한다: 세포가 대상이 되는 섭동/화합물을 동정하는 섭동 바코드, 및 섭동 바코드에 의해 동정되는 섭동/화합물의 대상이 되는 세포의 mRNA 발현에 상응하는 반응 단편.

[0496] 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 형태학적 반응으로서 광학적으로 측정된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 섭동 후 측정된 신호에서의 차이를 연구하기 위하여 특정한 세포 특징의 표지화를 통해 측정된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 세포 내로 조작된 반응이고, 여기서 바람직한 자극은 세포가 조작된 반응을 발현하도록 유발한다. 몇몇 실시형태에 있어서 조작된 반응은 리포터 유전자이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조작된 반응은 형광성 단백질의 발현이다.

[0497] 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 세포의 전사체를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 전사 반응은 세포의 mRNA 내용물을 포획하고, mRNA 전사체의 발현 수준을 분석함으로써 측정된다(예를 들면, 문헌[Bacher et al., Genome Biol 17:63, 2016, Svensson et al., Nat Methods 14:381, 2017, Miao and Zhang, Quantitative Biol

4:243, 2016] 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 세포에서 단백질 또는 효소의 발현 및/또는 변역-후 활성화 상태를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응의 포획은 폴리(T) 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 세포로부터 폴리(A) mRNA를 포획하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 세포에서 인핸서 RNA의 발현 수준을 포함한다(예를 들면, 문헌 [Rahman et al., Nucleic Acids Res. 45:3017, 2017] 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 세포에서 발생기 전사체의 수준을 포함한다. 몇몇 실시 형태에 있어서, 발생기 전사 반응은 글로벌 런-온 시퀀싱(Global Run-On Sequencing)(GRO-Seq)에 의해 포획된다(예를 들면, 문헌[Gardini, Meth Mol Biol 1468:111-120, 2017 and Danko et al., Nat Methods 12:433, 2015]을 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다). 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 단백질 농도를 포함하고, 여기서 단백질은 DNA-태깅된 항체에 의해 동정되고, 여기서 추가의 적절한 태그는 비드 상에 전달된다. 본 명세서에 기재된 방법의 몇몇 실시형태에 있어서, 세포 반응은 영상화, 계측 분석, 또는 문자 생물학 및 시퀀싱에서의 임의의 다른 도구에 의해 포획될 수 있다.

[0498] 실시예

[0499] 실시예 1. 제1 작업흐름

본 개시내용은 "제1 작업흐름" 및 "제2 작업흐름"으로서 하기에 요약되는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0500] [0501] 제1 작업흐름은 하기 단계를 포함한다: (1) DELB의 생성, (2) 피코웰로의 비드, (3) 검정 시약의 피코웰로의 로딩, (4) 비드-결합된 화합물의 방출, (5) 검정 판독의 측정, (6) 검정 판독의 순위 매기기, 및 (7) 새로운 세트의 DELB의 생성.

[0502] [0503] **DELB의 생성.** 먼저, 비드 상의 DNA 인코딩된 라이브러리(DELB)를 생성한다. 제조된 화합물의 일부가 불완전한 커플링을 갖거나 화학적 손상, 예를 들면, 고의가 아닌 산화를 겪는 경우에 약간의 이탈이 발생할 수 있지만, 각각의 비드는 정확하게 동일한 화합물의 비율을 함유한다.

피코웰로의 비드. 그 다음, 비드를 피코웰에 놓는다. 바람직한 실시형태에 있어서, 각각의 피코웰은 오직 1개의 비드를 얹는다. 각각의 피코웰은 등근 상단 테두리, 등근 하단 테두리, 고체 원형 하부, 개방된 상부, 및 벽을 가질 수 있다. 벽의 하부는 등근 상단 테두리 및 등근 하단 테두리에 의해 규정된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 벽은 각이 지고, 여기서 등근 상단 테두리의 직경은 등근 하단 테두리의 직경보다 크다. 이러한 방식으로, 벽(그 자체로 볼 때)은 역 원뿔형의 슬라이스와 유사하다. 피코웰 어레이에는 비드의 여분이 존재하도록 제조될 수 있다. 다시 말해서, 어레이에는 피코웰에 배치되는 수천 개의 비드 중 2개의 비드가 정확하게 동일한 화합물을 함유하도록 제조될 수 있다. 여분은, 예를 들면, 2개의 비드, 3개의 비드, 4개의 비드, 5개의 비드, 10개의 비드, 20개의 비드, 40개의 비드, 60개의 비드, 80개의 비드, 100개의 비드 등, 또는 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 10개, 약 20개, 약 40개, 약 60개, 약 80개, 약 100개, 약 200개, 약 500개, 약 1,000개의 비드 등, 또는 2개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 40개 초과, 60개 초과, 80개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1,000개 초과의 비드 등일 수 있다.

[0504] [0505] **검정 시약의 피코웰로의 로딩.** 시약을 각각의 비드-결합된 화합물의 생화학적 활성을 평가하는데 사용될 수 있는 각각의 피코웰에 도입한다. 생화학적 활성은 결합 활성, 효소 억제 활성, 효소 활성화 활성, 살아있는 포유동물 세포의 활성(분자 표적이 공지되지 않은 경우), 살아있는 포유동물 세포의 활성(분자 표적이 공지된 경우) 등의 형태를 가질 수 있다. 시약은 FRET 시약에 효소를 더한 형태를 가질 수 있다. FRET 시약은 프로테아제 기질을 통해 소광제에 연결된 형광단일 수 있다. 효소는 프로테아제에 의해 절단 가능한 그 프로테아제의 기질일 수 있다. 비드-결합된 화합물은 프로테아제를 억제하는 능력에 대하여 시험된다.

검정 물질을 로딩 후, 각각의 피코웰은 필름에 의해 캡핑될 수 있거나, 다수 또는 모든 피코웰은 하나의 필름에 의해 캡필될 수 있거나, 다수 또는 모든 피코웰은 각각의 펌플이 피코웰에 맞는 펌플이 있는 필름에 의해 캡핑될 수 있거나, 각각의 피코웰이 다공성 구체에 의해 맞는다. 실시형태에 있어서, 구체의 부피의 약 5%, 부피의 약 10%, 부피의 약 20%, 부피의 약 30%, 또는 부피의 약 40%는 피코웰에 맞는다(여기서 나머지는 표면과 함께 플러싱되거나 표면 상에 존재한다). 실시형태에 있어서, 펌플의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 40%, 약 60%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100%는 피코웰에 맞는다.

[0506] **비드-결합된 화합물의 방출.** 비드-결합된 화합물의 방출을 유발하는 단계를 수행한다. 실시형태에 있어서, 단계는 주어진 비드에 부착되는 화합물의 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.1%, 약 0.2%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 40%, 약 60%, 약 80%, 약 99%, 또는 약 100%의 방출을 유발할 수 있다. 방출은 빛, 화학적 시약, 효소, 온도 변

화, 이의 임의의 조합 등에 의해 수행될 수 있다.

[0507] 방출은 다음 형태를 가질 수 있다: (i) 단일 방출, (ii) 다중 방출, (iii) 연속 방출. 예를 들면, 다중 방출은 자외선의 몇몇 방출의 형태를 가질 수 있고, 여기서 각각의 방출은 빛 방출의 시작시 비드에 부착되는 것이 발생하는 비드-결합된 화합물의 약 10%를 절단하는데 충분하다. 예를 들면, 연속 방출은 1시간의 과정 동안 빛의 연속적인 방출의 형태를 가질 수 있고, 이는 유리 화합물의 꾸준하게 증가하는 농도를 야기한다. 이러한 상황에서, 유리 화합물(절단된 화합물)의 꾸준하게 증가하는 농도는 그 화합물의 표적을 적정하는 목적을 위한 것일 수 있다. 이러한 종류의 적정 실험은 주어진 화합물의 효능을 평가하는데 사용될 수 있다. 비제한적인 예를 제공하기 위하여, 단일 방출 방법으로, 광 노출의 기간 후, 판독이 수행되는 후속적인 기간이 뒤따르고, 연속 방출 방법으로, 광 노출은 판독이 수행되는 기간 중 일부, 대부분, 또는 모두 동안 계속된다.

[0508] 배제 실시형태에 있어서, 본 개시내용 단일 방출을 사용하거나, 다중 방출을 사용하거나, 연속 방출을 사용하는 임의의 방법, 시약, 조성물, 또는 시스템을 배제할 수 있다.

[0509] 검정 판독의 측정. 상기 개시된 생화학적 활성, 및 그 활성에 대한 방출된 화합물의 영향을 검출한다. 이러한 생화학적 활성은 효소 활성, 리포터 유전자의 활성, 유전자 활성(예를 들면, 전사 또는 번역의 속도), 결합 활성(예를 들면, 항체에 대한 항원), 세포 활성(예를 들면, 이동의 변화, 세포-신호전달 경로의 변화, 형태학의 변화)의 형태를 가질 수 있다. 활성은 형광, 발색성 활성, 발광, 광 현미경, TaqMan® 검정, 분자 비콘, 질량 분석법, 라만 분광법, 국지화된 표면 플라스몬 공명(LSPR), 표면 플라스몬-커플링된 방출(SPCE), 표면-강화된 라만 산란(SERS) 등에 의해 검출될 수 있다. 검출은 전체적으로 떨어진 방법, 예를 들면, 형광 검출 또는 광 현미경 또는, 대안적으로, 피코웰로부터 샘플을 얻는 것을 포함하는 방법에 의할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 반응물 및 생성물의 혼합물을 함유하는 샘플은 피코웰 중 하나로 부분적으로 삽입된 구형 다공성 스펀지를 통해 분석을 위해 빼내질 수 있다.

[0510] 검정 판독의 순위 매기기. 이러한 단계에서, 복수의 상이한 화합물(하나의 특정한 비드와 연관된 화합물의 각각의 유형)로부터의 검정 판독을 생화학적 활성을 활성화하거나, 억제하거나, 어떻게 해서든 조절하는 이들의 능력에 관하여 순위를 매긴다.

[0511] 새로운 세트의 DELB의 발생. 상기 기재된 단계는 생화학적 활성을 나타내는 다양한 화합물에 대하여 사용자에게 정보를 제공한다. 정보는 약 절반 최대 활성 또는 그 미만을 갖는 나머지와 함께 최대 활성을 갖는 하나의 화합물의 형태를 가질 수 있다. 대안적으로, 정보는 약 절반 최대 활성 또는 그 미만을 갖는 다른 화합물과 함께 유사한 최대 활성을 갖는 몇몇 화합물의 형태를 가질 수 있다. DELB의 새로운 세트는 하기와 같이 생성될 수 있다. 가장 순위가 높은 화합물(선두 화합물) 중 하나 이상은 하기 비제한적인 전략 중 하나 이상을 기반으로 DELB의 새로운 세트를 제조하기 위한 기반으로서 사용될 수 있다: (i) 지방족 사슬을 상동체로 교체, 예를 들면, 프로판을 측쇄를 부탄을 측쇄로 교체; (ii) 지방족 사슬을 이성체로 교체, 예를 들면, 프로판을 측쇄를 아이소프로판을 측쇄로 교체; (iii) 웹타이드 결합을 웹타이드 결합의 유사체로 교체, 예를 들면, 웹티다제에 의해 가수분해될 수 없는 결합으로 교체; (iv) 하전된 기의 하나의 유형을 하전된 기의 또 다른 유형으로 교체, 예를 들면, 포스페이트기를 포스포네이트, 살포네이트, 살포네이트, 또는 카복실기로 교체.

실시예 2. 제2 작업흐름

[0513] 제2 작업흐름은 캡으로 밀봉되는 피코웰을 포함한다. 캡은 피코웰의 직경보다 약간 큰 직경의 구체의 형태를 가질 수 있고, 여기서 이러한 직경은 피코웰의 상단 테두리에서 측정된다(피코웰의 하단에서는 측정되지 않는다). 캡은 전체 피코웰 플레이트에 온화한 중력 원심분리를 적용하여 피코웰의 상부에 꼭 맞게 만들어질 수 있다. 제2 작업흐름에서, 캡은 링커를 함유하는 비드의 형태를 갖고, 여기서 각각의 링커는 화합물에 연결된다. 링커는 절단 가능한 링커이고, 여기서 절단은 화합물을 방출하고, 이들이 세포에 확산되도록 한다. 이러한 유형의 캡은 "능동형 캡"이라고 지칭된다. 제2 작업흐름은 단계 (1) DELB의 생성, (2) 피코웰로의 검정 시약, (3) DELB에 의한 피코웰의 캡핑, (4) 캡으로서 작용하는 비드로부터의 비드-결합된 화합물의 방출, (5) 검정 판독의 측정, (6) 비드 상에 있는 DNA 바코드의 서열의 결정; (7) 검정 판독의 순위 매기기, 및 (8) 새로운 세트의 DELB의 발생을 포함한다.

실시예 3. 방출 조절

[0515] 이는 비드-결합된 화합물의 방출을 조절하고 모니터링하는 것에 관한 것이다. 출원인은 비드-결합된 방출-모니터를 합성하기 위하여 하기 과정을 고안하였다. 도 11 및 하기 문서를 참조한다.

[0516] 도 11은 비드-결합된 방출-모니터의 상기 예시적인 실시형태의 유기 합성에서 단계를 설명한다.

단계 1. 수지의 제공

[0518] 텐타겔® 수지(M30102, 10 μM NH₂, 0.23 mmol/g, 10 mg; MB160230, 160 μM RAM, 0.46 mmol/g, 2 mg)를 튜브(1.5 mL 에펜도르프(Eppendorf))로 중량 측정해 넣고 팽창시켰다(400μl, DMA).

[0519] 수지를 프럿 스픈-칼럼(MoBiCol® 스픈 칼럼, 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific))으로 옮기고, 진공하에 필터를 통해 용매를 제거하고, 웬던트 Fmoc를 탈보호화시켰다(DMA 중의 2% DBU와 함께 5% 피페라진, 400μl; 40°C에서 2x 10분). MoBiCol 스픈 칼럼은 10 마이크로미터 대형 프럿 및 루어락(lever-lock) 캡을 갖는다.

[0520] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(2×DMA, 400μl; 3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl).

단계 2. 리신 링커의 수지에 대한 커플링

[0522] DMA(350μl) 중에 혼합된 L-Fmoc-Lys(Mtt)-OH(21 μmol, 6.6 eq.), DIEA(42 μmol, 13.3 eq.), COMU(21 μmol, 6.6 eq.)를 함유하는 용액을 제조하고, 배양한 다음(1분, 실온), 프럿 스픈-칼럼 내부의 건조한 수지에 가하고, 보텍싱하고, 배양하여(15분, 40°C) 유리 아민을 아미드화하였다. 수지를 진공하에 여과하고, 이러한 반응을 1회 반복하였다.

[0523] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(2×DMA, 400μl; 3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl).

단계 3. Fmoc 보호기의 제거

[0525] 웬던트 Fmoc를 탈보호화시켰다(DMA 중의 2% DBU와 함께 5% 피페라진, 400μl; 40°C에서 2x 10분).

[0526] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(2×DMA, 400μl; 3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl).

단계 4. 소광제의 커플링

[0528] DMA(350μl) 중에 혼합된 QSY7-NHS(4.9 μmol, 1.55 eq.), Oxyma(9.5 eq, 3.3 eq.), DIC(21 μmol, 6.6 eq.), TMP(3.5 μmol, 1.1 eq.)를 함유하는 용액을 제조하고, 배양한 다음(1분, 실온), 플럿 스픈-칼럼 내부의 건조한 수지에 가하고, 보텍싱하고, 배양하여(14시간, 40°C) 유리 아민을 아미드화시켰다.

[0529] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(2×DMA, 400μl; 3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl).

[0530] DMA(400μl) 중에 혼합된 무수 아세트산(80 μmol, 25.3 eq.), TMP(80 μmol, 25.3 eq.)를 함유하는 용액을 제조하고, 혼합한 다음, 플럿 스픈-칼럼 내부의 건조한 수지에 가하고, 보텍싱하고, 배양하였다(20분, 실온).

[0531] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하고(2×DMA, 400μl; 3×DCM), DCM(1시간, 실온) 중에 배양한 다음, 진공하에 여과하고, 진공 챔버에서 건조하였다(30분, 2.5 PSI)

단계 5. Mtt 보호기의 제거

[0533] DCM(1488μl) 중에 혼합된 TFA(96μl), 메탄올(16μl)을 함유하는 Mtt 탈보호화 칵테일을 제조하여 6:1:93%의 TFA:메탄올:DCM 용액을 수득하였다.

[0534] Mtt 탈보호화 칵테일을 완전히 건조된 수지(400μl)에 가하고, 혼합하고, 진공하에 여과로 용리시킨 다음, Mtt 탈보호화 칵테일(4×400μl)의 순차적인 분취액을 가하고, 혼합하고, 배양하고(5분, 실온), 실온에서 20분의 조합된 총 배양 시간 동안 용리시켰다.

[0535] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl; 1×DMA with 2% DIEA, 400μl; 3×DMA, 400μl).

단계 6. 리신의 엡실론-아미노에 대한 광 절단 가능한 링커의 커플링

[0537] DMA(400μl) 중에 혼합된 Fmoc-PCL-OH(32 μmol, 10 eq.), Oxyma(32 μmol, 10 eq.), DIC(50 μmol, 15.8 eq.), TMP(32 μmol, 10 eq.)를 함유하는 용액을 제조하고, 배양한 다음(1분, 실온), 플럿 스픈-칼럼 내부의 건조한 수지에 가하고, 보텍싱하고, 배양하여(14시간, 40°C) 유리 ε-아민을 아미드화시켰다.

[0538] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다(2×DMA, 400μl; 3×DCM, 400μl; 1×DMA, 400μl).

단계 7. 이전에 커플링된 광 절단 가능한 링커로부터 Fmoc 보호기의 제거

- [0540] 펜던트 Fmoc를 탈보호화시켰다(DMA 중의 2% DBU와 함께 5% 피페라진, $400\mu\text{l}$; 40°C 에서 $2\times 10\text{분}$).
- [0541] 수지를 진공하에 여과하고, 세척하였다($2\times \text{DMA}$, $400\mu\text{l}$; $3\times \text{DCM}$, $400\mu\text{l}$; $1\times \text{DMA}$, $400\mu\text{l}$).
- [0542] 단계 8. 형광단의 커플링
- [0543] DMA($400\mu\text{l}$) 중에 혼합된 TAMRA($6\ \mu\text{mol}$, 1.9 eq.), TMP($24\ \mu\text{mol}$, 7.6 eq.), COMU($16\ \mu\text{mol}$, 5 eq.)를 함유하는 용액을 제조하고, 배양한 다음(1분, 실온), 플랫 스판-칼럼 내부의 건조한 수지에 가하고, 보텍싱하고, 혼합하에 배양하여(2시간, 40°C , 800 RPM) 유리 아민을 아미드화시켰다.
- [0544] 수지를 진공하에 여과하고, 세척한 다음($2\times \text{DMA}$, $400\mu\text{l}$; $3\times \text{DCM}$, $400\mu\text{l}$; $2\times \text{DMA}$, $400\mu\text{l}$; $2\times \text{DMSO}$), DMSO 중에 혼합하에 배양하였다(16시간, 40°C).
- [0545] 하기는 상기 개시된 실험실 과정의 더 넓은 설명을 제공한다.
- [0546] **비드에 부착된 이작용성 링커.** 이작용성 링커를 용액 중에 합성하고, 아민-작용화된 비드에 부착시켰다. 도 11은 리신으로 출발하는 유기 합성의 경로를 개시한다. 그 다음, 리신-Boc를 TCO 링커에 연결하였다. 링커의 주요 부분은 하나의 말단에 질소를 갖는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 형태를 갖는다. Boc는 이러한 연결 반응에서 이탈 기였다. 사용된 TCA는 실제로 하이드록시-TCO의 라세메이트였다. 이러한 TCO 유도체의 하이드록실기를 이중 결합 중 하나의 면으로부터 떨어진 4개의 탄소 원자에 위치한 탄소 원자에 연결하였다(이는 이중 결합 중 다른 면으로부터 떨어진 3개의 탄소 원자에 위치한 것과 동일한 것이다). 도 11에 도시된 바와 같이, 다단계 합성에서 제1 생성물은 Boc-리신-링커-TCO의 형태를 가졌다. 하이드록시-TCO의 한 부분인 하이드록실기는 여전히 TCO기에 부착된 상태이고, 여기서 이는 아미노화된 폴리에틸렌 글리콜기와 TCO기 사이에 위치한다(도 11).
- [0547] 합성 경로에서 제2 세트는 HCl에 의한 처리 및 광 절단 가능한 링커(PCL)의 첨가를 포함하였다. 이러한 제2 단계의 생성물은 Boc기가 광 절단 가능한 링커로 교체되는 것을 제외하고 제1 단계의 생성물과 동일하였다. 리신 잔기는 제2 단계의 생성물에서 중심 위치를 갖는다. 리신 잔기에 관하여, 이러한 리신 잔기는 유리 카복실기를 갖고, 과정의 제3 단계에서, 아미노화된 비드를 이러한 유리 하이드록실기에 연결시켜, 비드-결합된 시약의 합성을 야기하고, 여기서 시약은 2개의 가지 형태를 갖고, 여기서 하나의 가지의 말단에 TCO 태그가 있고, 다른 가지의 말단에 절단 가능한 결합을 갖는 방향족 고리가 있다. 화학적 단량체를 광 절단 가능한 링커의 원위 말단에 부착하기 위하여, 제1 Fmoc기를 제거하고, 여기서 Fmoc기는 수소 원자로 교체된다.
- [0548] **Fmoc의 제거.** 이시드로-라베트 등(Isidro-Llobet et al)에 따르면, "Fmoc는 ... 주로 2차 아민인 염기에 의해 제거되고, 이는 이들이 제거 동안 발생된 다이벤조풀렌을 포획하는데 더 우수하기 때문이다"(Isidro-Llobet et al (2009) Chem. Rev. 109:2455-2504). 대안적으로, Fmoc는 Pd/BaSO₄에 의한 촉매 가수소분해에 의해 또는 액체 암모니아 및 모르폴린 또는 피페리딘에 의해 제거될 수 있다.
- [0549] **Fmoc기의 제거 후, 화학적 단량체의 부착.** 그 다음, 출원인은 카복실산기를 갖는 화학적 단량체를 축합하였고, 여기서 결과는 아마이드 결합의 생성이었다.
- [0550] 실시예 4. 활성 화합물을 위한 세레브론 기반의 검정
- [0551] **화합물의 세포 기반의 검정으로부터의 결과(세레브론 기반의 검정).** 세포 기반의 검정을 위한 시약 및 방법. 출원인은 ATCC(American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 머내서스 소재)로부터 입수한 CCL-2 HeLa 세포를 사용하였다. 세포 배지는 HEPES로 완충된 깁코(Gibco) DMEM 고 글루코스 배지였다. 세포 배지 위의 대기는 5% 이산화탄소로 보충된 대기였고, 배양기는 37°C 였다. 세포 배지는 GlutaMAX®(Gibco ThermoFisher)로 보충되고, 또한 비필수 아미노산 및 스트렙토마이신을 더한 페니실린(Gibco ThermoFisher, 미국 매사추세츠주 월섬 소재)로 보충된 DMEM에 10% 소 태아 혈청을 더한 것이었다. HeLa 세포를 LTR-CTCF-프로모터-IKZF1(또는 IKZF3)-mNeon-P2A-mScar-LTR-CTCF의 형태를 갖는 구조물로 감염시켰다. mScarlet은 양성 대조군으로서 사용된 요소이다. mScarlet은 "mScarlet"으로 지칭되는 적색 형광성 단백질을 인코딩한다(문헌[Bindels et al (2017) Nature Methods. 14:53-56] 참조). 프로모터는 독시사이클린 유도성 프로모터이고, 이는 신속한 개시 유도 및 기질의 적정을 가능하게 한다. P2A는 2개의 다른 폴리펩타이드 사이에 위치한 요소이다. P2A는 번역 동안 2개의 분리된 폴리펩타이드를 생성하는 작용을 하고, 따라서 mScar 폴리펩타이드가, IKZF1/녹색 형광성 단백질(GFP)로 구성되는 융합 단백질의 유비퀴틴화 및 분해에 의해 영향을 받지 않고, 적색 광을 생성하는 양성 대조군으로서 작용하도록 한다. mNeonGreen은 창고기(*Branchiostoma lanceolatum*) 다합체 황색 형광 단백질로부터 유래된다(Allele Biotechnology, 미국 캘리포니아주 산디에고 소재). P2A는 P2A 단백질에서 한 지점에서 자가 절단을 가능하게 하는 영역이다. 더 정확하게는, P2A 웹타이드는 리보솜이 2A 웹타이드의 C-말단에서 글리신-프롤린 웹타

이드 결합의 합성을 생략하는 것을 유발하고, 이는 2A 웹타이드와 이의 즉각적인 다운스트림 웹타이드 사이의 절단을 야기한다(Kim, Lee, Li, Choi (2011) PLoS ONE. 6:e18556(8 pages)).

[0552] 시험 화합물을 위한 세포 기반의 검정의 효능의 증명. 하기는 레날리도마이드 및 레날리도마이드의 유사체의 형태를 갖는 시험 화합물에 대한 세포 기반의 검정의 사용을 증명한다. 도 5는 렌티바이러스 벡터로 감염된 HeLa 세포로부터의 결과를 개시하고, 여기서 벡터는 녹색 형광성 단백질(GFP) 및 적색 형광성 단백질(mScarlet)을 발현하였다. 첨가된 레날리도마이드의 농도 증가는 계속해서 적어지는 녹색 형광을 야기하고, 가장 높은 농도에서 녹색 형광의 제거를 야기하였다. 하지만, 레날리도마이드는 적색 형광을 실질적으로 감소시키지 않았다. 상부: IKZF1/GFP 융합 단백질의 발현. 하부: mScarlett 대조군의 발현. 레날리도마이드를 0, 0.1, 1.0, 또는 10 마이크로몰로 가하였다.

[0553] 도 6은 렌티바이러스 벡터로 감염된 HeLa 세포로부터의 결과를 개시하고, 여기서 벡터는 녹색 형광성 단백질(GFP) 및 적색 형광성 단백질(mScarlet)을 발현하였다. 첨가된 레날리도마이드의 농도 증가는 계속해서 적어지는 녹색 형광을 야기하고, 가장 높은 농도에서 녹색 형광의 제거를 야기하였다. 하지만, 레날리도마이드는 적색 형광을 실질적으로 감소시키지 않았다. 상부: IKZF3/GFP 융합 단백질의 발현. 하부: mScarlett 대조군의 발현. 레날리도마이드를 0, 0.1, 1.0 또는 10 마이크로몰로 가하였다.

[0554] 레날리도마이드가 융합 단백질의 단백질분해를 유발하는 경로를 요약하면, 제1 레날리도마이드를 HeLa 세포에 가한다. 그 다음, 레날리도마이드를 이러한 세포에서 자연적으로 발생하는 세레브론에 결합시킨다. 이러한 세레브론은 E3 유비퀴틴 리가아제와의 복합체에서 발생한다. 재조합 IKZF1 융합 단백질(또는 재조합 IKZF3 융합 단백질)을 유비퀴틴으로 태깅함으로써 E3 유비퀴틴 리가아제는 레날리도마이드에 반응한다. 최종 결과는 유비퀴틴-태깅된 융합 단백질이 세포의 프로테아솜에서 분해되는 것이다.

[0555] 피코웰 플레이트의 코팅. 이는 피코웰 플레이트의 상부 표면에 적용되지만, 피코웰의 내부에 진입하고 이를 코팅할 필요는 없는 용액을 기재한다. 이는 또한 피코웰 플레이트의 상부 표면에 적용되고 피코웰에 진입하고 피코웰의 하부 표면을 코팅하는 용액에 대한 것이다. 출원인은 플루로닉(Pluronic)® 127(Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 용액을 건조한 플라스틱에 가하였다. 결과는 더 이상 소수성이 아니고 친수성인 표면이다. 그 다음, 표면을 물로 세척하였다. 그 다음, 인산염 완충 식염수(PBS)를 가하고, 여기서 이러한 PBS는 피코웰의 내부로 진입한다. 진공을 통해 움직이는 공기를 적용하고, 여기서 결과는 이것이 피코웰에서 작은 벼블을 확장하게 유발한다는 것이고, 그 다음, 벼블은 PBS로 교체되고, 여기서 최종 결과는 다수의 피코웰이 PBS로 채워진다는 것이다. 그 다음, PBS를 비트로넥틴 코팅 용액(AF-VMB-220)(PeproTech, 미국 뉴저지주 록키힐 소재)로 교체하였다. 플루로닉스® 127은 H(OCH₂CH₂)_x(OCH₂CHCH₃)_y(OCH₂CH₂)_zOH이다. 비트로넥틴 코팅 용액을 적용 후, 출원인은 30분 동안 37°C에서 배양하여 코팅 용액이 피코웰로 들어가도록 하였다. 플루로닉 127은 피코웰을 분리하는 렛지를 코팅하고, 비트로넥틴은 피코웰의 하부에 있다. HeLa 세포는 비트로넥틴에 부착되고, 이들이 비트로넥틴에 부착되면, 이들은 피코웰의 하부에 접착된다.

[0556] HeLa 세포는 유세포 분석을 통해 성공적으로 감염된 세포에 대하여 스크리닝된다. 성공적인 감염을 결정하기 위하여 2개의 기준이 동시에 사용된다. 먼저, 레날리도마이드를 유세포 분석에 의해 분류하기 2일 전에 세포 배지에 가하였다. 양성 세포는 적색-플러스 및 녹색-마이너스인 것이고, 적색-플러스는 세포가 녹색 인코딩 mScar로 감염되었다는 것을 의미하고, 녹색-마이너스는 레날리도마이드가 융합 단백질, IKZF1/mNeon(또는 융합 단백질, IKZF3/mNeon)의 유비퀴틴화 및 분해를 촉진한다는 사실을 갖는다는 것을 의미한다. 독시사이클린에 관하여, 렌티바이러스 벡터 구조물의 발현을 유도하기 위하여 독시사이클린을 3 마이크로몰로 사용하였다. 독시사이클린에 의한 농도/유도 곡선은 문헌[Go and Ho (2002) J. Gene Medicine. 4:258-270]에 기재된다. 렌티바이러스 벡터에 의한 감염 후, 하기 조건을 사용하여 성장하는 세포에서 정상적으로 발현되는 IKZF1을 유지하였다. 조건은 독시사이클린을 배지로부터 빼내고, 또한 구조물에서 "인슐레이터 서열"(insulator sequence)을 사용하는 것이었다. 인슐레이터 서열은 구조물의 프로모터 내부로부터의 판독을 방지한다. 인슐레이터 서열은 기재되었다(문헌[Anton et al (2005) Cancer Gene Therapy. 12:640-646; Carr et al (2017) PLoS ONE. 12:e0176013] 참조). 인슐레이터 서열은 구조물의 부분인 개방형 해독틀(ORF)의 발현의 구동으로부터 구조물의 외부에 있는 프로모터를 방지한다. 세포를 피코웰에 넣기 위하여, 세포를 [세포의 수]/[피코웰의 수]의 주어진 비율로 피코웰 플레이트의 상부 표면으로 옮길 수 있다. 비율은, 예를 들면, 약 1 세포/40 웰, 약 1 세포/20 웰, 약 1 세포/10 웰, 약 2 세포/10 웰, 약 4 세포/10 웰, 약 8 세포/10 웰, 약 16 세포/10 웰, 약 32 세포/10 웰, 약 50 세포/10 웰, 약 100 세포/10 웰 등일 수 있다. 세포는 세포가 피코웰의 하부를 코팅하는 비트로넥틴에 부착되자마자 피코웰에서 검정에 사용될 수 있다.

- [0557] **렌티바이러스 구조물 및 세포 배양의 세부사항.** 이는 IKZF1/3에 대하여 리포터 세포주를 건설하고, 이들을 피코웰에서 배양하고, 및 이들을 별크 레날리도마이드와 함께 검정하는 것에 관한 것이다. 플라스미드를 운반하는 리포터 구조물은 Gibson 조립체를 사용하여 부품으로부터 조립하였다(첨부된 맵 참조). 리포터 구조물을 갖는 렌티바이러스뿐만 아니라 UbC 구동된 rtTA-M2.2를 제3 세대 포장 시스템(키메라 CMV 프로모터 및 tat 단백질 없음)에 의해 Lent iX HEK293T 세포(Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)에서 만들었다. 칼슘 침전 방법을 통해 플라스미드를 감염시켰다. 바이러스 상청액을 1% 소 혈청 알부민(BSA)을 더한 권고된 Lent iX 배지에서 수집하고, 0.45um 저 단백질 결합 필터(Millipore)를 통해 여과하였다. 숙주 HeLa 세포는 ATCC로부터 입수하였고, 표준 조건으로 배양하였다. 바이러스 상청액을 준합류(sub-confluent) HeLa 배양에 적용하고, 24시간 후 Lent iX 배지를 독시사이클린으로 변경하였다. 클론 선택 2일 전에, 레날리도마이드를 배양에 가하였다. 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 통해 클론을 선택하고, 알렉사 플루오르 488(음성) 및 Cy3 채널(양성) 둘 다에 대하여 게이팅하였다. 클론을 검정 전에 레날리도마이드 없이 10일 동안 성장시켰다. 가장 안정한 발현 수준의 클론을 스크리닝에 사용한다.
- [0558] 이는 세포를 비드로 밀봉하고 다공성 비드를 통해 세포를 용해시키는 실험을 기재한다. 피코웰 패턴 하부를 갖는 96 웰 플레이트(MuWells)를 진공 적용 없이 플루오닉 F127 세제(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)로 처리하여 웰의 상부 부분을 부동태화시켰다. 30분 배양 후, 과량의 세제를 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 중류 H₂O로 세척한다. 웰을 에탄올로 풀러싱하고, 공기 흐름하에 생물안전 캐비넷에서 건조시킨다. 완성품에 강한 진공을 적용하여 웰을 PBS로 적시고, PBS를 비트로넥틴 코팅 시약(Preprotech)으로 교체한다. 플레이트를 30분 동안 37°C에서 배양하고, 비트로넥틴 코팅 시약을 제거하고, 리포터 세포를 바람직한 밀도로 접종한다. 세포 접종의 순간으로부터, 배지는 검정 전체에서 디쉬에 남아 있다. 광 절단 가능한 화합물을 운반하는 텐타겔® 비드는 비트로넥틴 코팅 전에, 또는 세포 접종 후에 접종될 수 있다. PEG 중합체 비드는 웰 수에 비하여 과량으로 배양의 상부에 로딩한다. 1분 동안 400rcf로 플레이트를 회전시킨다. 365nm LED 광원을 적절한 시간량 동안 사용하여 비드로부터 화합물을 광 방출시킨다. 영상화(형광성 리포터의 판독)까지 CO₂ 배양기에서 배양한다.
- [0559] **구조물.** 도 20 및 도 21은 관련 구조물을 개시한다. 이들 도면은 각각 HeLa 세포 계놈에 통합되는 서열을 개시하고, 각각의 도면은 담체 서열(렌티바이러스에 속하는 서열)을 개시한다. 렌티바이러스에 속하는 서열은 약 1시부터 약 9시까지이고, 여기서 이러한 서열은 2개의 긴 말단 반복(LTR)에 의해 괄호로 묶인다. 약 9시부터 약 1시까지의 서열은 HeLa 세포 계놈에 통합된다. 상세하게는, 먼저 플라스미드를 프로듀서 세포(HEK93T)로 감염시킨다(Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로알토 소재). 프로듀서 세포는 렌티바이러스를 생성한 다음, 방출한다. 그 다음, 방출된 렌티바이러스는 HeLa 세포를 감염시키고, 핵산을 HeLa 세포 계놈에 통합시킨다.
- [0560] **광학.** 본 세포 배양 실험을 위하여, 출원인은 HBO 100에 연결된 EBQ100 단리된 수은 램프(Carl Zeiss Microscopy, GmbH, 독일 소재)을 사용하였고, 이는 Ludl 전자기기 스테이지(Ludl Electronic Products, Ltd., 미국 뉴욕주 호손 소재)를 갖는 악시오버트(Axiovert) 200-M 칼 자이스(Carl Zeiss) 현미경에 연결되었다. 출원인은 또한 수은 램프가 있는 필터 큐브를 사용하였고, 여기서 필터 큐브는 여기 광장을 조절하였고, 또한 방출을 검출하는 광장을 조절하였다. 이미지는 바슬러(Basler) ACA2440-35UM(Basler AG, 독일 아렌스부르크 22926 소재)에 의해 캡처하였다. 수은 램프의 대체제로서 할로겐 램프를 사용하였다. 마이크로웰 플레이트, 피코웰 플레이트 등은 플레이트 홀더 및 조절기가 있는 "XY 스테이지"에 놓았다. XY 스테이지 및 광학 사용을 위한 다른 정밀한 위치조정 스테이지는 뉴마크 시스템스 인크(Newmark Systems, Inc., 미국 캘리포니아주 웨인 산타 마가리타 소재); 에어로텍 인크(Aerotech, Inc., 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재), 피식 인스트루먼트 게임베하(Physik Instrumente GmbH, 독일 칼스루에 76228 소재)로부터 이용 가능하다.
- [0561] **실시예 5. 활성 화합물에 대한 MDM2 기반의 검정**
- [0562] **유리를 아미노기를 함유하도록 개질한다.** 다수의 "작용성 실란" 중 하나 이상을 통해 실리카 기질을 아미노기를 함유하도록 개질할 수 있다. 이러한 "작용성 실란"은 3-아미노프로필-트라이에톡시실란(APTES), 3-아미노프로필-트라이메톡시실란(APTMS), N-(2-아미노에틸)-3-아미노프로필트라이에톡시실란(AEAPTES), N-(2-아미노에틸)-3-아미노프로필트라이메톡시실란(AEAPTMS), 및 N-(6-아미노헥실)아미노메틸트라이에톡시실란(AHAMTES)이다. 이러한 시약과 유리의 반응은 기상 또는 용액 상으로 수행될 수 있다(문헌[Zhu, Lerum, Chen (2012) Langmuir. 28:416-423] 참조).
- [0563] **생화학적 검정 of 화합물의 생화학적 검정의 결과(MDM2 기반의 검정).** **실험실 방법.** 하기 시약을 유리 슬라이드에 적용하였다. 유리 슬라이드를 아미노기를 갖도록 개질하였다. 시약은 NHS-PEG-mTET이었다. NHS는 N-하이드록

시-석신이미드이다. NHS는 활성화된 에스터의 유형이다. NHS는 생접합 반응, 예를 들면, 마이크로비드 또는 마이크로어레이 슬라이드의 표면 활성화에서 유용하다(Klykov and Weller (2015) *Analytical Methods.* 7:6443-6448).

[0564] PEG는 폴리에틸렌 글리콜이다. mTET는 메틸테트라진이다. 이러한 시약을 DMSO와 혼합한 다음, 2 마이크로리터의 부피를 유리 슬라이드에 적용하였다. 50mM NHS-PEG-mTET 10 마이크로리터와 DMSO 30 마이크로리터를 혼합하여 혼합물을 만들었다. NHS기는 유리 슬라이드의 아미노기와 반응하고, 여기서 결과는 mTET기가 유리 슬라이드에 고정되는 것이다. mTET의 목표는 슬라이드와 비드 사이의 공유 결합을 생성하는 것이었다.

[0565] TCO 및 테트라진은 "클릭 화학" 반응을 매개할 수 있다. 이러한 클릭 화학 반응의 예는 테트라진에 의해 작용화되어 TCO에 의해 작용화된 DNA와 커플링되는 항체를 사용하는 것이다. 또는 테트라진-개질된 비드와 커플링되는 TCO로 개질된 항체를 사용한다(문헌[van Buggenum et al (2016) *Scientific Reports.* 6:22675(DOI:10.1038); Rahim et al (2015) *Bioconjug. Chem.* 18:352-360; Haun et al (2010) *Nature Nanotechnol.* 5:660-665] 참조).

[0566] 상세하게는, 슬라이드의 상부에 파라필름의 시트를 적용하여 유리 슬라이드를 제조하고, 여기서 파라필름은 중간에서 절단된 애페처를 갖고, 여기서 상기 혼합물의 액성을 유리 슬라이드에 직접적으로 애페처에 적용하였다. 파라필름과 슬라이드 사이의 단단한 밀봉을 생성하기 위하여, 파라필름에서 개방 면(애페처)에 혼합물을 적용한 후, 액체의 누수를 방지하기 위하여, 혼합물을 적용하기 전에, 상부 상에 파라필름이 있는 유리 슬라이드를 완전한 가열로 90초 동안 가열하였다. 파라필름에 삽입된 애페처에 있는 2 마이크로리터 소적을 갖는 유리 슬라이드를 실온에서 밤새 배양하였다. 배양 동안, 유리 슬라이드를 페트리 디쉬 내에 두고, 여기서 디쉬는 페트리 디쉬의 상부와 측면을 덮고 있는 유리 덮개로 덮여있다. 밤새 배양하기 전에, 물이 액적으로부터 증발하는 것을 방지하기 위하여 사각형의 파라필름을 방울과 주변 파라필름 위에 놓는다.

[0567] **슬라이드/비드/항체의 복합체를 제조하는 본 발명의 방법.** 출원인의 방법은 TCO에 의해 작용화된 비드를 사용하였다. 비드의 TCO기는 비드에 대한 메틸테트라진-작용화된 슬라이드의 공유 부착을 매개하였다. 또한, 비드의 TCO기는 비드에 대한 메틸테트라진-작용화된 항-p53 항체의 공유 부착을 매개하였다.

[0568] 출원인은 놀랍게도, 제1 단계가 슬라이드와 비드를 접촉시키는 것인 경우, 항체의 후속적인 첨가는 비드에 대한 항체의 공유 부착을 야기하지 않을 것이라는 것을 발견하였다. 또한, 출원인은 놀랍게도, 제1 단계가 비드를 항체와 접촉시키는 것인 경우, 이러한 혼합물의 슬라이드로의 후속적인 전달은 슬라이드에 대한 비드의 공유 부착을 야기하지 않을 것이라는 것을 발견하였다. 바람직한 방법에서, 이러한 세 가지 시약, 즉, 슬라이드, 비드, 및 항체는 모두 서로 동시에 접촉될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 비드 및 항체를 먼저 함께 혼합하여 항체에 대한 비드의 공유 연결을 개시하고, 그 직후 또는 수분 후에, 이 혼합물을 슬라이드에 적용하고, 여기서 결과는 슬라이드에 대한 비드의 공유 연결이다.

[0569] **효소 기반의 스크리닝 검정의 성질.** 검정은 부착된 비드를 갖는 유리 슬라이드의 형태를 갖는다. 비드는 전사인자, p53에 대한 결합에 특이적인 부착된 항체를 함유한다. 이러한 항체는 인간 p53 및 또한 유비퀴틴화된 인간 p53에 결합할 수 있다. 지금까지, 검정 방법은 하기 시약 사이의 샌드위치를 포함한다고 볼 수 있다:

[0570] 슬라이드/공유 결합된 비드/비드-결합된 항-p53 Ab/유비퀴틴화된 p53

[0571] 이러한 검정으로부터의 관독은 유비퀴틴화된-p53이고, 여기서 유비퀴틴화된-p53은 유비퀴틴에 특이적인 형광성 항체에 의해 검출된다. 상세하게는, 항체는 염소에서 만들어진 다클론 항체이고, 여기서 항체는 형광단(AF488)으로 태깅된다. 도 8은 AF488의 구조를 개시한다. 이러한 형광성 항체는 유비퀴틴에 결합한다. 따라서, 유비퀴틴화된-p53이 검출되는 경우, 존재하는 것은 하기 샌드위치이다:

[0572] 슬라이드/공유 결합된 비드/비드-결합된 항-p53 Ab/유비퀴틴화된 p53/형광성 Ab

[0573] **실시예 6. 피코웰에서 DNA의 시퀀싱.**

[0574] 비드-결합된 DNA 바코드의 시퀀싱을 수행하였고, 여기서 비드는 피코웰당 하나의 비드로 피코웰에 위치하였다. 검정 방법은 형광성 뉴클레오타이드의 일시적인 결합을 통해, 한번에 하나씩, 비드-결합된 DNA 바코드 상의 각각의 위치로부터의 질문을 포함하였다. 각각의 비드는 약 수백 아토몰의 커플링된 DNA 바코드를 함유하였고, 여기서 커플링은 클릭-화학에 의한 것이다. 이러한 수는 비드당 커플링된 약 6천만개의 올리고뉴클레오타이드와 등가이다. 각각 DNA 바코드를 기반으로, 검정은 모든 4개의 형광성 dNTP를 동시에 첨가하는 것을 포함한다. 임의의 제한을 암시하지 않고, 4개의 형광성 dNTP는 AF488-dGTP, CY3-dATP, TexasRed-dUTP, 및 CY5-dCTP이었다.

형광 신호를 포획한 다음, ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, NIH)로 처리하여, 상응하는 수치를 제공한다. 데이터는 비드-결합된 DNA 바코드의 부분인 5개의 연속 뉴클레오타이드(모두 연달아)의 시퀀싱으로부터의 것이다. 비드-결합된 DNA 바코드는 DNA 헤어핀 영역을 포함하였다. DNA 헤어핀 영역에서 염기는 그 자체로 어닐링되었고, 이는 헤어핀의 정보를 야기하고, 여기서 이러한 DNA 헤어핀에서 3'-말단 뉴클레오타이드는 시퀀싱 프라이머로서 역할을 하였다. 일시적인 결합에 의한 시퀀싱은 이러한 3'-말단에서 개시되었다. 시퀀싱 검정은 3중으로 수행하였고, 즉, 3개의 상이한 비드를 사용하였고, 여기서 하나의 DNA 바코드 서열을 3개의 비드 각각에 대하여 사용하였다. 다시 말해서, 3개의 비드 각각은 다른 2개의 비드에 의해 제공되는 것과 동일한 시퀀싱 패턴을 제공하는 것으로 예상되었다.

[0575] 도 28은 시퀀싱 결과를 개시하고, 여기서 시퀀싱은 비드-결합된 DNA 바코드 상에서 수행되었다. 도시되는 것은 제1 염기, 제2 염기, 제3 염기, 제4 염기, 및 제5 염기로부터 질문으로부터의 결과이다. 이를 염기 각각에 대하여, 개별적인 히스토그램 막대를 통해 개별적으로 도시되는 것은 AF488-dGTP, CY3-dATP, TexasRed-dUTP, 및 CY5-dCTP 각각에 의한 질문에 의해 생성된 형광성 방출이다. 4개의 히스토그램 막대 각각은 상이한 도식을 갖는다: AF488-dGTP(흑색 윤곽, 회색 내부), CY3-dATP(흑색 윤곽, 백색 내부), TexasRed-dUTP(채워진 흑색 히스토그램 막대), 및 CY5-dCTP(채워진 회색 히스토그램 막대). 비드 직경은 수성 용액에서 팽창 후, 10-14 마이크로미터였다. 피코웰의 부피는 12 피코리터였다.

[0576] 질문되는 주형 서열은 5'-**CTCACATCCCATTTCGCTTAGT-3'**이었다. 이러한 특정한 시퀀싱 검정을 위하여, 5개의 연속 염기에 대하여 질문하였고, 여기서 가장 큰 형광성 신호를 제공하는 형광성 dNTP는 형광성 dGTP, dATP, dGTP, dUTP, 및 dGTP이었고, 이는 dC, dT, dC, dA, 및 dC인 주형 상의 서열에 상응한다. 따라서, 시퀀싱 결과는 100% 정확하였다. 결과는 비드-결합된 DNA 바코드가, 즉, DNA 바코드가 비드에 여전히 결합한 채로, 시퀀싱 될 수 있다는 것을 증명한다. 다시 말해서, 비드-결합된 DNA 바코드는 시퀀싱될 수 있다.

실시예 7. 세포 바코딩

[0578] **바코딩 개념의 소개.** 이는 바코딩 개념을 소개한다. 혼란 바코딩 기술은 주어진 단일 세포의 전사체를 바코딩하는 것이다. 도 36 및 도 37은 미래 시퀀싱을 위한 제조에서 전사체가 포획되고 증폭되는 과정 동안 단계를 설명한다. 도 36은 mRNA를 방출하는 세포의 용해 후, 역전사를 나타낸다. 도 37은 고정된 폴리(dT)를 통한 mRNA의 포획 후, 역전사, 및 최종적으로 시퀀싱을 나타낸다. 시퀀싱은 차세대 시퀀싱(NGS)에 의한 것일 수 있다.

[0579] 주어진 세포로부터의 일부 또는 대부분의 메신저 RNA(mRNA) 분자는 혼란 바코드로 태깅될 수 있고, 여기서 이러한 태깅은 연구자들에게 임의의 주어진 mRNA 서열에 있어서, 주어진 세포의 관점에서 코딩 서열의 기원을 결정하는 것을 가능하게 한다. 예를 들면, 100개의 상이한 단일 세포로부터 별개의 전사체 각각을 나타내는 핵산이 함께 혼합되고, 100개의 상이한 단일 세포 각각으로부터의 핵산이 그 자체의 바코드를 갖는 경우, 하기 이점이 야기될 것이다. 이점은 모든 전사체로부터의 핵산이 하나의 시험관에서 함께 혼합된 다음, 차세대 시퀀싱의 대상이 될 수 있다는 것이고, 여기서 바코드는 사용자가 정보가 동일한 세포로부터 오는지를 확인할 수 있게 한다.

[0580] 상기 이점은 하기와 같이 상이한 방식으로 기재된다. mRNA 바코딩의 사용에서, 주어진 단일 세포는 그 세포로부터의 mRNA의 일부 또는 대부분으로부터의 정보가 cDNA의 상응하는 문자로 전환되도록 처리되고, 여기서 각각의 이러한 cDNA 문자는 정확하게 동일한 DNA 바코드를 갖는다. 이러한 바코딩 과정은 10개, 20개, 100개, 수백개, 또는 1,000개 이상의 상이한 세포에 의해 반복될 수 있고, 여기서 이러한 세포로부터의 cDNA 문자는 고유한 세포-특이적 바코드를 가짐으로써 구별된다. 이러한 방법은 연구자가 모든 세포로부터의 모든 바코딩된 cDNA 문자의 풀(시퀀싱 전에, 함께 혼합된 모든 바코딩된 cDNA 문자)로부터, 모두 하나의 시퀀싱 작동에서, DNA 시퀀싱을 수행할 수 있게 한다(문헌[Avital, Hashimshony, Yanai (2014) Genome Biology. 15:110] 참조).

[0581] **원형질 막을 태깅하는 바코드와 비교된 핵산을 태깅하는 바코드.** 지침은 화학물질의 라이브러리의 제조에 이용 가능하고, 여기서 각각의 화학물질, 또는 화학물질의 각 부류의 모든 멤버는 고유한 DNA 바코드와 연관된다(문헌[Brenner and Lerner (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 89:5381-5383; Bose, Wan, Carr (2015) Genome Biology. 16:120. DOI 10.1186] 참조). 상기 바코딩 예를 고려하여, 하기는 특정한 단일 세포에 또한 적용될 수 있는 또 다른 유형의 바코딩을 제공한다. 본 개시내용은 세포의 원형질 막에 안정하게 부착되는 태그의 형태를 갖는 세포-연관된 바코딩을 제공한다.

[0582] **결합된 원형질 막에 부착되는 적어도 2종의 바코드의 선택사항.** 주어진 세포의 원형질 막을 캐깅하기 위해 사용되는 바코드는 세포의 유형을 동정하는 제1 바코드, 및 세포에 노출된 섭동체(perturbant)를 동정하는 제2 바코

드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 바코드는 건강한 인간 대상체, 임상 연구 7번으로부터의 인간 대상체 38번, 인간 원발성 직장결장암 세포주, 5회 계대배양된 인간 원발성 직장결장암 세포주, 다발성 골수종이 있는 다발성 골수종 인간 대상체, 다발성 골수종이 있는 치료를 경험하지 않은 인간 대상체 23번, 또는 다발성 골수종이 있는 치료를 경험한 인간 대상체 32번으로부터 유래된 세포를 동정할 수 있다.

[0583] 또한, 바코드는 특정한 단일 세포에 제공된(바코드 전 또는 후에 제공됨) "접동체"를 동정할 수 있다. "접동체"는 항암 약물, 항암 약물의 조합, 조합적으로 생성된 화합물, 또는 항체 약물과 소분자 약물의 조합일 수 있다. 바코드는 주어진 단일 세포의 추적을 유지하는데 사용될 수 있고, 세포를 후속적인 행동, 예를 들면, 하나 이상의 세포-신호전달 경로의 활성화 또는 억제, 증가되거나 감소된 이동, 아폽토시스, 괴사, 하나 이상의 CD 단백질(CD; 분화의 클러스터)의 발현 변화, 하나 이상의 중양형성 유전자의 발현의 변화, 하나 이상의 마이크로 RNA(miRNA)의 발현의 변화와 관련시키는데 사용될 수 있다. 발현은 전사 속도, 세포에서 주어진 폴리펩타이드의 수준, 세포액으로부터 결합된 막에 주어진 단백질의 위치의 변화 등의 관점일 수 있다.

[0584] 막-결합된 당단백질의 세포-표면 올리고당의 태깅. 방법 및 시약은 태그, 예를 들면, DNA 바코드를 살아있는 세포의 원형질 막에 연결하는데 이용 가능하다. 태깅은 막-결합된 당단백질의 올리고당을 공격하고 이에 공유 결합하는 반응성 잔기와 DNA 바코드의 공유 복합체로 구성되는 시약에 의해 달성될 수 있다. 문헌은 하이드라지드 비오사이틴이 비오틴을 막-결합된 당단백질 상의 탄수화물에 연결하는데 사용될 수 있다는 것을 확립한다. 본 개시내용은 비오틴을 DNA 바코드로 교체하는 것을 제외하고 이러한 시약을 사용한다. 탄수화물은 산화되어 알데하이드를 형성할 필요가 있다. 하이드라지드는 알데하이드와 반응하여 하이드라진 연결을 형성한다. 올리고당 상의 시알산 구성분은 1mM Na 메타-페리오데이트(NaIO₄)에 의해 용이하게 산화된다. 산화 단계, 및 하이드라지드-연결 단계의 수행에서, 일차 아민기를 갖는 베폐는 피해야 한다. 예를 들면, 문헌[Instructions. EZ-Link Hydrazide Biocytin. Number 28020. ThermoScientific (2016) (4 pages), Bayer (1988) Analyt. Biochem. 170:271-281; Reisfeld (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 142:519-526, Wollscheid, Bibel, Watts (2009) Nature Biotechnol. 27:378-386]을 참조한다.

[0585] 살아있는 세포 상의 당단백질의 올리고당 잔기를 태깅하는 또 다른 방법은 페리오데이트 산화 및 아닐린-촉매 작용된 옥심 결찰을 사용하는 것이다. 이 방법은 시알산의 온화한 페리오데이트 산화 후, 아닐린의 존재하에 아민옥시 태그로 결찰하는 것을 사용한다. 다양한 이러한 방법에서, 갈락토스 옥시다제는 알데하이드를 올리고당의 말단 갈락토스 잔기 및 말단 N-아세틸갈락토스아민(GalNAc) 잔기로 도입하는데 사용될 수 있다. 갈락토스 옥시다제는 탄소-6에서 산화를 촉매 작용하여 알데하이드를 생성한다. 알데하이드 생성 후, 아닐린-촉매 작용된 결찰을 사용하여 아민옥시비오틴과 커플링시킬 수 있다(문헌[Ramya, Cravatt, Paulson (2013) Glycobiology. 23:211-221] 참조). 본 개시내용은 비오틴은 DNA 바코드로 교체하고, 아민옥시-DNA 바코드의 아닐린-촉매 작용된 결찰을 제공한다.

[0586] 세포 표면에 결합된 항체에 의해 매개된 태깅. 본 개시내용은 세포의 원형질 막에 바코드를 부착하기 위한 방법 및 시약을 제공하고, 여기서 부착은 막-결합된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 의해 매개된다. 항체는 트랜스-사이클로옥텐(TCO)에 의해 공유적으로 개질될 수 있고, 여기서 이러한 개질은 4°C에서 밤새 배양하에 수행될 수 있다(문헌[Supporting Information (5 pages) for Devaraj, Haun, Weissleder (2009) Angew. Chem. Int'l. 48:7013-7016] 참조). 항체의 이러한 공유 개질은 시약, 트랜스-사이클로옥텐 석신이미딜 카보네이트에 의해 수행될 수 있다(Devaraj, Haun, Weissleder (2009) Angew. Chem. Int'l. 48:7013-7016). 그 다음, 항체-테트라진 복합체는 세포와 접촉할 수 있고, 이는 막-결합된 항체를 야기한다. 막-결합된 항체는 각각 테트라진 잔기를 갖고, 이는 클릭 화학을 통해, 예를 들면, DNA 바코드-테트라진 복합체에 항체를 노출시켜 항체를 태깅할 수 있다.

[0587] 테트라진은 시약, N-하이드록시석신이미드 에스터(NHS)를 사용하여 항체의 유리 아미노기에서 도입될 수 있다(문헌[van Buggenum, Gerlach, Mulder (2016) Scientific Reports. 6:22675]). 항체가 하나 이상의 테트라진기를 함유한 후, 항체는 TCO-DNA 바코드인 시약을 통해 DNA 바코드를 부착함으로써 추가로 개질될 수 있다. 이러한 개질된 항체와 함께, 그 후, 항체는 살아있는 세포를 태깅하는데 사용될 수 있고, 여기서 항체는 세포의 막-결합된 단백질에 결합된다.

[0588] 테트라진-DNA 바코드의 복합체가 제조될 수 있다. 그 다음, 이러한 복합체는 세포 배지로 도입될 수 있고, 여기서 배지는 세포를 포함하고, 여기서 세포는 부착된 항체-TCO 복합체를 갖는다. 테트라진-DNA 바코드가 막-결합된 항체-TCO 복합체와 접촉하는 경우, 결과는 세포가 DNA 바코드로 태깅되는 클릭 화학 반응이다. 이러한 클릭 화학 반응은 30분 동안 37°C에서 수행될 수 있다.

- [0589] 상기 과정에서 사용을 위하여 바람직한 항체는 원형질 막의 막-결합된 단백질에 단단하게 특이적으로 결합하는 것들이고, 여기서 막-결합된 단백질은 매우 풍부하게, 예를 들면, 세포막 당 50,000개 이상의 카페로 발생하고, 여기서 막-결합된 단백질은 세포 표면 상에서 안정하고, 세포의 내부로 별로 재순환되지 않고, 여기서 막-결합된 막은 배양 배지로 별로 떨어지지 않는다.
- [0590] 아자이드에 의한 막-결합된 단백질의 태깅 후, 옥틴 접합체에 의한 클리 화학. 아자이드는 효소, 리포산 리가아제를 통해 살아있는 세포의 막-결합된 단백질 상에 도입될 수 있고, 그 다음, DNA 바코드에 접합되는 플루오린화된 옥틴 화합물의 부착이 뒤따른다. 플루오린화된 옥틴 화합물의 형광단에 대한 접합이 기재된다(문헌[Jewett and Bertozzi (2010) Chem. Soc. Rev. 39:1272-1279; Fernandez-Suarez, Bertozzi, Ting (2007) Nature Biotechnol. 25:1483-1487] 참조). 반복하기 위하여, "팅(Ting)과 동료들은 ... 리포산 리가아제를 사용하여 ... 아자이드를 포유동물 세포-표면 단백질에 도입하였고, 그 다음, 단백질을 플루오린화된 사이클로옥틴-접합된 형광성 염료-접합된 형광성 염료로 표지화할 수 있었다"(Jewett et al, 상기 참조).
- [0591] 실시예 7. 피코웰 위의 캡
- [0592] 피코웰의 캡핑. 각각의 피코웰에 대하여 하나의 구체로, 각각의 피코웰을 구체로 캡핑하였고, 여기서 구체는 피코웰의 애피처(상부 개구)에 맞는다. 구체를 피코웰 플레이트에 적용하기 위하여, 구체를 성장 배지에 넣고 혼탁시킨 다음, 피코웰 플레이트의 상부 표면에 적용하고, 구체가 침강되도록 하였다. 그 다음, 각각의 피코웰의 애피처에 구체가 단단하게 위치하도록 하기 위하여, 전체 플레이트를 원심분리기에 넣고 저-중력으로 회전시켰다.
- [0593] 능동형 캡 및 수동형 캡. 도 18A는 피코웰의 상부에 삽입된 능동형 캡을 도시하고, 도 18B는 피코웰의 상부에 삽입된 수동형 캡을 도시한다. 바람직하게는, 캡은 피코웰 플레이트를 만드는데 사용된 물질보다 연성인 물질로 만들어지고, 여기서 결과는 피코웰의 애피처로 압축될 때 캡의 약간의 변형이고, 여기서 결과는 누출을 방지하는 꼭 맞음이다. 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 하나 이상의 능동형 캡, 수동형 캡, 또는 능동형 캡 및 수동형 캡 둘 다를 제공한다. 각각의 캡은 임의의 다른 캡과 연결되지 않고 단독으로 서 있을 수 있다. 대안적인 실시형태에 있어서, 예를 들면, 플레이트의 상부 표면 상에 적층될 수 있는 중합체의 시트를 통해 더 많은 캡이 함께 연결될 수 있고, 여기서 복수의 캡은 중합체의 시트의 하부로부터 돌출되고, 여기서 돌출 캡은 각각의 피코웰에 맞추기 위하여 미리 결정된 간격을 갖는다. 능동형 캡은 피코웰의 바닥에 앉을 수 있는 비드 대신에 사용될 수 있다. 능동형 캡은 실질적으로 동일한 화합물을 다수의 부착된 카페를 함유하고, 여기서 각각의 화합물은 능동형 캡에 부착되고(여기서 구형 비드의 샘플에서 도시됨), 여기서 절단은 피코웰에 존재하는 용액으로 화합물의 방출을 야기한다(도 18A).
- [0594] 수동형 캡에 관하여, 수동형 캡은 다공성이고, 이는 스펜지와 같이 작용한다. 생화학적 반응으로부터의 생성물을 흡수하고, 따라서 사용자의 목표가 피코웰에서 배양되는 살아있는 생물학적 세포에 대한 주어진 화합물의 영향을 결정하는 것인 경우, 생성물의 수집을 촉진한다. 다시 말해서, 화합물은 세포가 반응하는 것을 자극하고, 여기서 반응은 하나 이상의 대사물질의 증가된(또는 감소된) 발현의 형태를 갖고, 여기서 일부 대사물질은 수동형 캡을 향해 확산되고 수동형 캡에 흡수된다. 그 다음, 사용자는 수동형 캡을 수집하고 수동형 캡에 흡수된 대사물질을 분석할 수 있다(도 18B).
- [0595] 캡의 어레이에 접합되는 중합체 매트. 도 19는 다공성 캡의 어레이에서 각각의 캡에 접착될 수 있는 중합체 매트를 설명한다. 접착된 후, 중합체 매트는 어레이에서 각각의 다공성 캡과 함께 박리되고 제거될 수 있다. 그 결과, 다공성 캡을 갖는 중합체 매트는 다공성 캡과 연관된 대사물질 또는 다른 화학물질을 검정하는데 사용될 수 있다.
- [0596] 단계식 예시를 제공하기 위하여, 수천 개의 피코웰의 어레이에서 각각의 웰은 하나의 비드를 함유할 수 있고, 여기서 각각의 비드는 하나의 유형의 화합물을 함유하고, 여기서 화합물은 절단 가능한 링커를 통해 부착된다. 피코웰은 또한 용액뿐만 아니라 배양된 세포도 함유한다. 피코웰은 다공성 캡으로 밀봉되고, 여기서 다공성 캡은 용액과 접촉하고, 배양된 세포로부터 방출되는 대사물질을 포획(샘플링, 흡수)할 수 있다. 대사물질은 화합물의 대사물질일 수 있거나, 대사물질은 사이토킹, 인터류크린, 중간 대사의 생성물, 마이크로RNA 분자, 엑소좀 등의 형태를 가질 수 있다. 최종적으로, 폴리아크릴아마이드의 용액을 피코웰 플레이트 위에 뿐고, 폴리아크릴아마이드가 수천 개의 다공성 캡에 침지되도록 한 다음, 각각 및 모든 캡에 단단하게 접착된 매트의 형태로 고체화시킨다. 그 다음, 고체화된 매트를 제거하고, 여기서 각각의 캡은 흡수된 대사물질에 대하여 개별적으로 분석된다.

[0597]

바람직한 실시형태에 있어서, 캡핑 비드를 얹매이는 층 또는 매트로 가교결합하는데 폴리아크릴아마이드 젤을 사용한다. 캡핑 비드를 경화시키고 얹매이게 하기 위하여 피코웰 어레이 상에 부을 수 있는 폴리아크릴아마이드 용액의 20% 용액을 생성하는 프로토콜을 하기와 같다. 4 ml의 40% 비스-아크릴아마이드 용액 및 2 ml의 1.5 M Tris pH 8.8을 1.8 ml의 중류 탈이온수에 가한다. 이 혼합물을 캡핑된 피코웰 어레이에 붓기 직전에, 80 마이크로리터의 유리 라디칼 개시제 암모늄 퍼설페이트(APS, 10% 스톡 용액), 및 8 마이크로리터의 유리 라디칼 안정화제 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌-다이아민(TEMED)를 가하여 젤의 가교결합을 시작한다. 완전한 가교결합 전에 젤 층을 끓고, 캡핑된 피코웰 어레이 위에서 완전하게 가교결합되도록 한다. 완전히 가교결합된 후(최급하기 충분하게 단단하거나, 대략 60분 배치함), 핀셋을 사용하여 폴리아크릴아마이드 층을 박리할 수 있다. 캡핑 비드는 피코웰의 상부로부터 떨어지고, 폴리아크릴아마이드 층에 부착된다는 것이 확인된다. 이러한 행동은 폴리아크릴아마이드 비드, 텐타겔 비드, 폴리스타이렌 비드 및 실리카 비드를 포함하는 다양한 비드 유형에서 관찰될 수 있다.

[0598]

누수를 방지하는 캡의 효능 측정. 실시형태에 있어서, 캡의 효능은 광 절단 가능한 링커를 갖는 비드를 사용하여 측정할 수 있다. 피코웰, 또는 하나의 특정한 피코웰 어레이에서 몇몇 피코웰의 이미지는 피코웰을 UV 광에 노출하기 직전에, 그리고 피코웰을 UV 광에 노출한 후의 시간 프레임에 캡쳐될 수 있다. 예를 들면, 이미지는 $t = -10$ 초 및 $t = 10$ 초, 20초, 40초, 60초, 2분, 4분, 8분, 15분, 60분, 90분, 2시간, 3시간, 및 4시간에 캡쳐될 수 있다. 우수한 효능은 $t = -10$ 초에 찍인 배경 이미지의 차감하에, 2시간에 주어진 웰의 형광이 $t = 10$ 초에서 확인된 형광의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 약 100%와 동일하나는 것을 보여줄 수 있다. 이미지는 또한 피코웰 외부의 피코웰 플레이트의 영역, 예를 들면, 캡의 바로 근처에서 찍힐 수 있다. 우수한 효능은 플레이트(피코웰의 외부)의 표면 및 캡의 바로 근처에서 면적의 형광이 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만, 0.05% 미만, 0.01% 미만, 0.005% 미만, 또는 0.001% 미만이라는 것을 보여줄 수 있다. 이러한 비교는 웰 내의 유체의 부피와 관련 없이, 그리고 플레이트의 상부 및 캡의 외부에 위치한 임의의 유체의 부피와 관련 없이 만들어질 수 있고, 여기서 비교는 광 검출기에 의해 캡쳐되는 전체 시계를 단순하게 고려할 수 있다. 대안적으로, 비교는 유체의 깊이(피코웰의 깊이; 피코웰 플레이트의 상부 상의 유체의 깊이)의 보정에 의해 만들어질 수 있다. 또한 대안적으로, 비교는 피코웰 플레이트의 전체 표면 위의 임의의 누수되는 형광단의 확산을 고려할 수 있다.

[0599]

바코드를 본 개시내용의 시약 및 방법에 맞추는 방법. 하기는 본 개시내용의 시약 및 방법의 추가의 실시형태를 제공한다.

[0600]

시약 및 능력. 현미경 비드를 제공한다. 현미경 비드는 복수의 제1 링커에 의해 공유적으로 개질될 수 있고, 이들은 각각 고체 상 합성을 통해 단량체와 커플링될 수 있고, 여기서 고체 상 합성의 완료는 **화학적 라이브러리**의 멤버를 생성한다. 화학적 라이브러리의 이러한 멤버는 비드-결합된다. 동일한 현미경 비드는 복수의 제2 링커에 의해 공유적으로 개질될 수 있고, 이들은 각각 복수의 DNA 바코드와 커플링될 수 있다. DNA 바코드의 이러한 멤버는 비드-결합된다.

[0601]

실시예 9. 본 개시내용의 DNA 바코드

[0602]

이는 종이에 인쇄될 수 있거나 컴퓨터 언어로 저장될 수 있고, DNA와 화학적 라이브러리 멤버를 관련시키는 "DNA 바코드"를 제공하는 정보의 세트에 관한 것이다. 이러한 DNA 바코드는 "범례" 또는 "기호설명(key)"으로 지칭될 수 있다. DNA 바코드는 또한 화학적 화합물의 특정한 부류, 예를 들면, 특이적인 FDA-승인된 항암 약물의 유사체를 동정할 수 있거나, 사용자 명칭을 확인할 수 있거나, 비드-결합된 화학적 라이브러리에 의해 시험되는 특정한 질환을 동정할 수 있는 핵산을 제공한다.

[0603]

실시예 10. 레날리도마이드 유사체

[0604]

도 13, 14, 및 15는 레날리도마이드의 3개의 상이한 유도체로의 전환을 개시하고, 각각의 유도체는 카복실산기를 갖는다. 이러한 카복실산기 각각은 후속적으로 비드-링커 복합체와 축합되는데 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 카복실산기는 비드-링커 복합체와 축합되는 경우, 이는 Fmoc에 의해 미리 점유된 위치에 부착된다.

[0605]

일차 아민과 함께 출발하고, 이를 카복실산으로 전환시킨다(도 13). 출원인은 일차 아민을 갖는 화합물을 카복실기를 갖는 화합물로 전환시킴으로써 화합물의 라이브러리를 생성하는 접근법을 갖는다. 도 13은 레날리도마이드와 함께 출발하는 것을 개시한다. 레날리도마이드는 일차 아민이다. 이에 4-다이메틸아미노페리딘(DMA) 및 아세토나이트릴(ACN) 중의 무수 석신산을 가한다. 무수 석신산은 일차 아미노기와 축합되어, 카복실산기를 갖는 레날리도마이드를 야기한다. 용어 도면에서 "cat."은 축매를 의미한다.

- [0606] 후속적으로, 이러한 카복실산기는 비드에 연결될 수 있다. 따라서, 수득된 복합체는 **비드-석신산 잔기-레날리도마이드**이다.
- [0607] 도 14는 레날리도마이드와 함께 출발하고, t-부틸-브로모아세테이트를 첨가하여 중간체를 수득하는 것을 개시한다. 그 다음, 중간체를 FmocOSu(o-석신이미드)로 처리하여, 레날리도마이드의 카복실산 유도체인 최종 생성물을 생성한다. 그 다음, 카복실산 잔기를 유리 아미노기, 예를 들면, Fmoc기가 부착된 유리 아미노기와 축합할 수 있다. 대안적으로, 카복실산은 비드 상에 존재하는 화학적 단량체의 유리 아미노기와 축합될 수 있고, 여기서 축합의 결과는 서로 부착된 2개의 화학적 단량체이다.
- [0608] 도 15는 출발 물질로서 레날리도마이드를 개시한다. 레날리도마이드는 3-카복시벤즈알데하이드와 반응하고, 여기서 알데하이드기는 아미노기와 축합하여, 레날리도마이드의 카복실산 유도체의 또 다른 유형을 야기한다.
- [0609] 도 16A, 도 16B, 및 도 16C는 신규하고 고유한 비드-결합된 화합물의 라이브러리를 생성하기 위한 출원인의 또 다른 접근법을 개시하고, 여기서 화합물은 비드로부터 방출된 다음, 세포 기반의 검정 또는 세포-유리 검정에서 활성에 대하여 시험될 수 있다. 세 가지 화합물 각각은 레날리도마이드 유사체이고, 여기서 일차 아민은 벤젠고리의 고유한 위치에 있다.
- [0610] 실시예 11. 커플링된 반응-포획 요소를 갖는 비드와 함께 세포를 함유하는 피코웰.
- [0611] 본 개시내용은 화합물에 대한 세포의 반응을 평가하기 위한 시약, 시스템 및 방법을 제공하고, 여기서 측정되는 반응은 전사체에서의 변화의 형태를 갖는다. "전사체에서의 변화"는, 임의의 제한을 암시하지 않고, 세포에서 고유한 mRNA의 각각 및 모든 유형의 양의 변화뿐만 아니라, 세포에서 mRNA 분자의 미리 결정된 세트의 양의 변화를 나타낼 수 있다. "전사체에서의 변화"는 검출 하한 아래부터 검출 가능해지는 것까지의 변화뿐만 아니라, 검출 가능한 것부터 검출 하한 아래로 떨어지는 것까지의 포함하고, 이러한 변화는 비드-결합된 화합물의 방출과 연관된다.
- [0612] 세포는 피코웰 어레이에 세제 또는 계면활성제를 첨가함으로써 용해될 수 있다. 예를 들면, 세제를 함유하는 버퍼의 부피는 이의 내에 수천 개의 피코웰을 함유하는 마이크로웰로 패팅될 수 있다. 세제는 모든 피코웰로 확산되도록 할 수 있고, 이는 그 안의 세포의 용해, mRNA의 방출, 및 최종적으로 비드-결합된 "포획 반응 요소"에 의한 결합을 유발한다.
- [0613] 세포 용해. 세포는 냉동 및 해동의 하나 이상의 주기에 의해 용해될 수 있다(Bose, Wan, Carr (2015) *Genome Biology*. 16:120. DOI 10.1186). 세포는 또한 쉐이킹하에 퍼플루오로-1-옥탄올에 의해 용해될 수 있다(Macosko, Basu, Satija (2015) *Cell*. 161:1202-1214; Ziegenhain (2017) *Molecular Cell*. 65:631-643; Eastburn, Sciambi, Abate (2014) *Nucleic Acids Res.* 42:e128). 또한, 세포는 계면활성제(Tween-20®) 및 프로테아제의 조합에 의해 용해될 수 있다(Eastburn, Sciambi, Abate (2013) *Anal. Chem.* 85:8016-8021). 세포의 용해는 mRNA의 방출을 야기한다. mRNA는 용해된 세포(또는 세포들)과 동일한 피코웰에 존재하는 비드에 의해 포획된다. 비드는 다수의 비드-결합된 폴리뉴클레오타이드를 함유하고, 여기서 각각의 폴리뉴클레오타이드는 2개의 핵산을 함유하고, 여기서 제1 핵산은 공통의 DNA 바코드를 함유하고, 제2 핵산은 "반응 포획 요소"를 함유한다. 목표가 세포에서 모든 mRNAs의 무분별한 포획인 경우, "반응 포획 요소"는 폴리(dT)의 형태를 가질 수 있다. 이러한 폴리(dT)는 mRNA 분자의 폴리(A) 꼬리에 결합한다.
- [0614] 더 많은 세포 용해 조건. 세포 용해는 나이트륨 염을 갖는 세제, 예를 들면, 15mM NaCl, 25mM NaCl, 50mM NaCl, 75mM NaCl, 100mM NaCl을 갖는 0.05% 트리톤(X-100), 15mM NaCl, 25mM NaCl, 50mM NaCl, 75mM NaCl, 100mM NaCl을 갖는 0.1% 트리톤 X-100, 또는 15mM NaCl, 25mM NaCl, 50mM NaCl, 75mM NaCl, 100mM NaCl을 갖는 0.2% 트리톤 X-100, 또는 15mM NaCl, 25mM NaCl, 50mM NaCl, 75mM NaCl, 100mM NaCl을 갖는 0.5% 트리톤 X-100, 또는 칼륨 염을 갖는 세제, 예를 들면, 15mM KC1, 25mM KC1, 50mM KC1, 75mM KC1, 100mM KC1을 갖는 0.05% 트리톤 X-100, 15mM KC1, 25mM KC1, 50mM KC1, 75mM KC1, 100mM KC1을 갖는 0.1% 트리톤 X-100, 15mM KC1, 25mM KC1, 50mM KC1, 75mM KC1, 100mM KC1을 갖는 0.2% 트리톤 X-100, 또는 15mM KC1, 25mM KC1, 50mM KC1, 75mM KC1, 100mM KC1을 갖는 0.5% 트리톤 X-100에 노출시킴으로써 수행될 수 있다. 노출은 약 4°C, 또는 실온(23°C) 등에서 10분, 20분, 40분, 또는 60분 동안일 수 있다.
- [0615] 본 개시내용은 발현 프로파일에 대한 화합물의 영향을 평가할 수 있다. 비드-결합된 포획 요소는 하나 이상의 관심대상 mRNA 분자에 특이적으로 혼성화될 수 있는 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드의 형태를 가질 수 있고, 여기서 하나 이상의 mRNA 분자는 특정한 질환과 연관된다. 다양한 질환에 대한 발현 프로파일은, 예를 들면, 결장암(Llarena(2009) *J. Clin. Oncol.* 25:155(e22182), 난소암(Spantzos(2005) *J. Clin. Oncol.*

23:7911-7918), 및 폐선암(Takeuchi (2006) *J. Clin. Oncol.* 24:1679-1688)에 이용 가능하다. 유사한 예를 제공하기 위하여, 또한 특성화될 수 있는 것은 간에 전이된 비-간 종양 세포와 연관된 mRNA에 대한 방출된 화합물의 영향이다(문현[Barshack, Rosenwald, Bronfeld(2008) *J. Clin. Oncol.* 26:15 Suppl. 11026, Barshack(2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:1355-1362] 참조).

[0616] **전사체의 포획.** 이들의 폴리A기를 고정된 폴리(dT)에 혼성화함으로써 mRNA를 포획하는 방법이 이용 가능하다(문현[Dubiley(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2259-2265; Hamaguchi, Aso, Shimada(1998) *Clinical Chem.* 44:2256-2263; D.S. Hage (2005) *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd ed, CRC Press, page 549] 참조).

[0617] 용해된 세포(또는 세포들)로부터 방출된 mRNA 분자의 포획 후, 비드-결합된 폴리뉴클레오타이드는 mRNA로부터의 역전사를 지지하는 프라이머로서 역할을 하고, 이는 비드-결합된 상보적 DNA(cDNA)를 야기하고, 여기서 이러한 비드-결합된 cDNA는 시퀀싱될 수 있다. 대안적으로, 비드-결합된 cDNA는 비드로부터 방출될 수 있고, 여기서 비드-결합된 "반응 포획 요소"는 절단 가능한 링커, 예를 들면, 광 절단 가능한 링커에 의해 비드에 커플링된다. 광 절단 가능한 링커가 사용되는 경우, 절단 조건은 비드-결합된 "반응 포획 요소"를 절단하지 않지만 비드-결합된 화합물(화학적 단량체 라이브러리로부터 만들어진 화합물)을 방출시키는 것이다.

[0618] 세포가 비드-결합된 화합물 또는 비드로부터 방출된 화합물에 노출되는 경우, 세포는, 예를 들면, 화합물에 대한 노출과 함께 또는 부재하에 전사체에서 임의의 변화를 특성화함으로써, 유전자 반응에 대하여 스크리닝될 수 있다. 또한, 세포는 표현형 반응, 예를 들면, 아폽토시스, 하나 이상의 세포-신호전달 단백질의 활성에서의 변화, 또는 하나 이상의 CD 단백질의 세포-표면 발현에서의 변화에 대하여 스크리닝될 수 있다. CD는 분화의 클러스터이다(문현[Lal (2009) *Mol. Cell Proteomics.* 8:799-804; Belov(2001) *Cancer Res.* 61:4483-4489; IUIS/WHO Subcommittee on CD Nomenclature(1994) *Bull. World Health Org.* 72:807-808; IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee (1984) *Bull. World Health Org.* 62:809-811] 참조). 일부 표현형 반응 검정을 위하여, 세포는 용해되면 안된다.

[0619] 본 개시내용은, 예를 들면, 단일 세포를 하나의 유형의 약물에 노출하고, 여기서 노출은 피코웰에서 발생함으로써, 상이한 약물을 상이한 세포에 분할하는 미충족 요구를 해결한다.

[0620] 본 개시내용은 또한 바코드된 mRNA를 제조할 필요성을 제거하고, 여기서 mRNA는 세포로부터 방출된 후, cDNA를 제조한다(이러한 유형의 바코드에서, 전사체가 cDNA의 상응하는 라이브러리로 전환되는 경우, 주어진 세포로부터의 모든 mRNA는 동일한 바코드를 수용한다).

[0621] **접동체와의 세포 배양 동안 파라미터.** 임의의 주어진 화합물 또는 일부 다른 유형의 접동체에 있어서, 파라미터는 다양할 수 있거나, 세포 배지의 조절된 빛, 온도, pH, 음파, 농도 및 시약에 대한 노출 시간(시약은 비드로부터 방출된 화합물, 효소 기질, 사이토kin, 이미 확립된 약물인 화합물, 염일 수 있다), 기계적 교반, 세포-표면 단백질에 대한 항체 등일 수 있다.

[0622] **세포의 바코드.** 세포는 비드-결합된 화합물 또는 비드-결합된 절단 가능한 링커로부터 절단 후의 화합물과 함께 배양될 수 있다. 배양 동안 또는 그 후, 세포는 접동체를 동정하는 막-결합된 바코드에 의해 바코드될 수 있다. 이러한 막-결합된 바코드는 세포막의 올리고당, 세포막의 폴리펩타이드, 또는 세포막의 인지질에 커플링될 수 있다.

[0623] **폴리(dT) 이외의 반응 포획 요소.** 메신저 RNA는 5-프라임 7-메틸구아노신 캡을 통해 포획될 수 있다. 이러한 방법은 폴리A 꼬리가 짧은 경우에 특히 유용하다(문현[Blower, Jambhekar (2013) *PLOS One.* 8:e77700] 참조). 또한, mRNA는 mRNA의 코딩 영역에 특이적인 고정된 DNA를 사용하여 포획될 수 있다. 이러한 방법은 "RNA 엑손 포획" 및 이러한 명칭의 변형으로 지칭된다. 시슬릭 등(Cieslik et al)에 따르면, "포획 전사체에 고유한 것은 엑손-표적화 RNA 프로브를 사용하여 밤새 반응(RNA-DNA 혼성화)을 포획하는 것이다"(Cieslik (2015) *Genome Res.* 25:1372-1381).

[0624] **마이크로RNA(miRNA).** 본 개시내용은 주어진 세포에서 miRNA의 발현 프로파일 또는, 대안적으로, miRNA의 주어진 종에 의해 특이적으로 결합되는 mRNA의 집단의 발현 프로파일에 대한 방출된 비드-결합된 화합물의 영향을 평가할 수 있다(Jain, Ghosh, Barh(2015) *Scientific Reports.* 5:12832). 예를 들면, 본 개시내용은 (1) 비드-결합된 화합물; (2) 비드-결합된 DNA 바코드; 및 (3) 비드-결합된 반응 포획 요소를 함유하는 비드를 제공하고, 여기서 반응 포획 요소는 miRNA를 포획하거나, 여기서 반응 포획 요소는 miRNA의 종을 포함한다(반응 포획 요소의 부분으로서). 마이크로RNA에 대한 발현 프로파일은 다양한 유형의 암, 예를 들면, 유방암에서 발견되었다(Tanja

(2009) J. Clin. Oncol. 27:15 Suppl. 538).

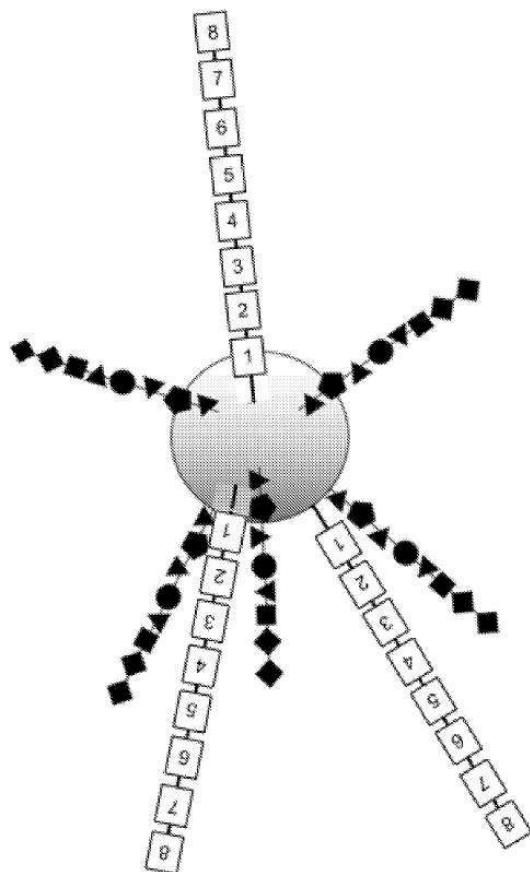
[0625] 전체 전사체로부터 mRNA의 선택된 집단을 포획하는 방법이 이용 가능하다. 선택성은 "풀-다운(pull-down)" 검정에서 브리지 화합물로서, 마이크로RNA의 한 유형, 예를 들면, miR-34a를 사용하여, 부여될 수 있다. 간략하게, "miR-34a에 의해 풀 다운된 전사체는 ... 성장 인자 신호전달 및 세포 주기 연쇄에서 이들의 역할을 위하여 풍부해졌다"(Lal, Thomas, Lieberman (2011) PLOS Genetics. 7:e1002363). 포획되는 mRNA 분자는 miR-34A에 결합하는 것들이다.

[0626] mRNA를 포획하고 발현 수준을 분석하는 추가의 방법이 이용 가능하다(Bacher (2016) Genome Biology. 17:63; Svensson (2017) Nature Methods. 14:381; Miao and Zhang (2016) Quantitative Biol. 4:243; Gardini (2017) Nature Methods. 12:443). 인핸서 RNA에서의 변화의 형태를 갖는 세포 반응이 측정될 수 있다(문현[Rahman (2017) Nucleic Acids Res. 45:3017] 참조).

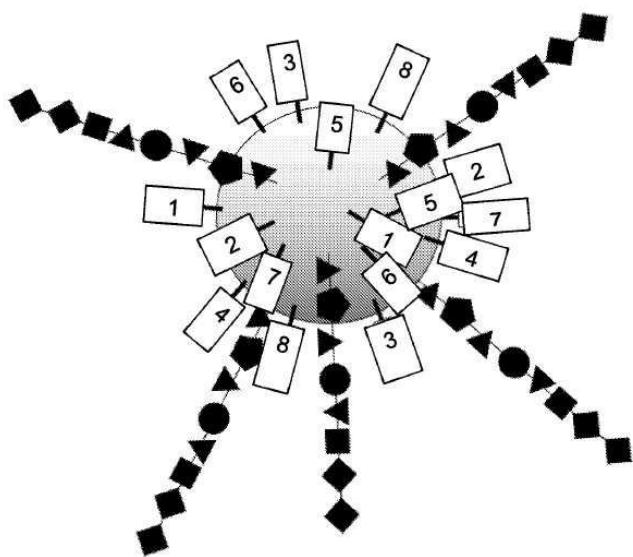
[0627] 본 발명은 본 개시내용의 조성물, 시약, 방법, 시스템, 진단, 실험실 데이터 등으로 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 본 명세서에 개시된 임의의 바람직한 실시형태로 한정되지 않는다.

도면

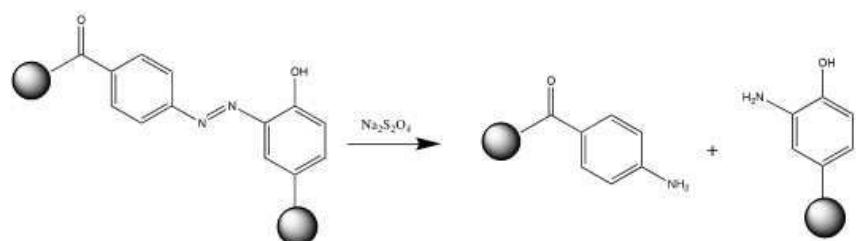
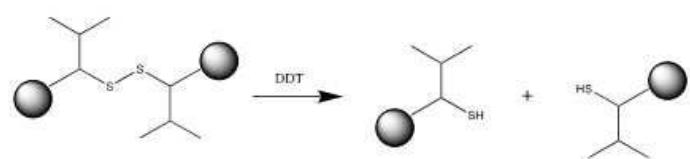
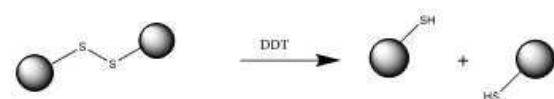
도면1



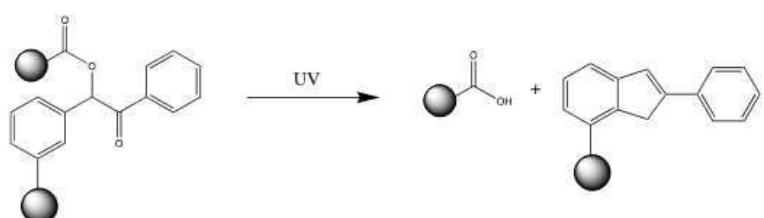
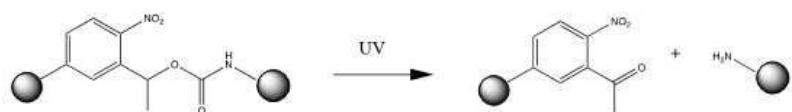
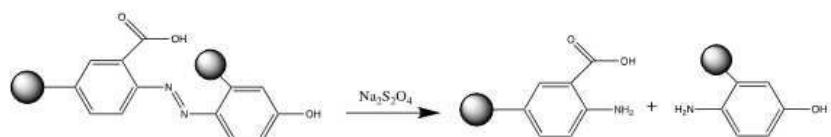
도면2



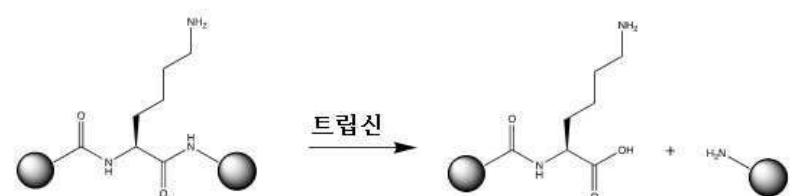
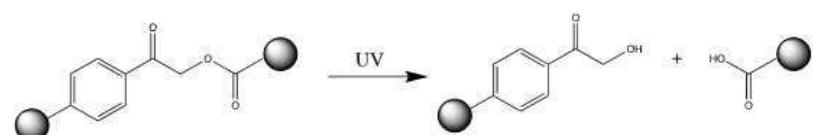
도면3a



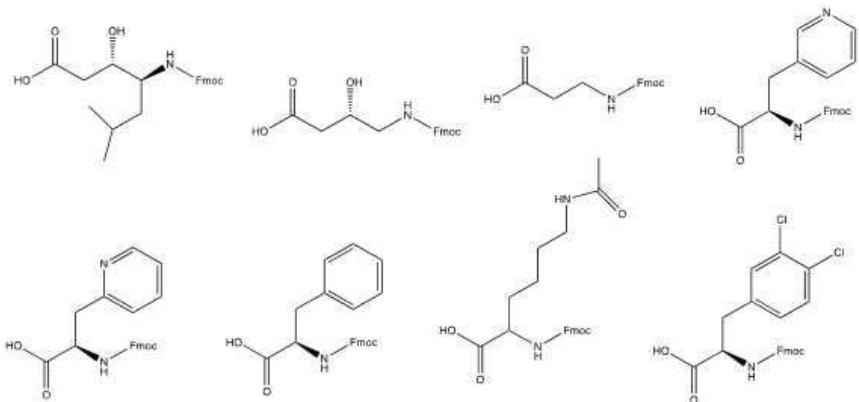
도면3b



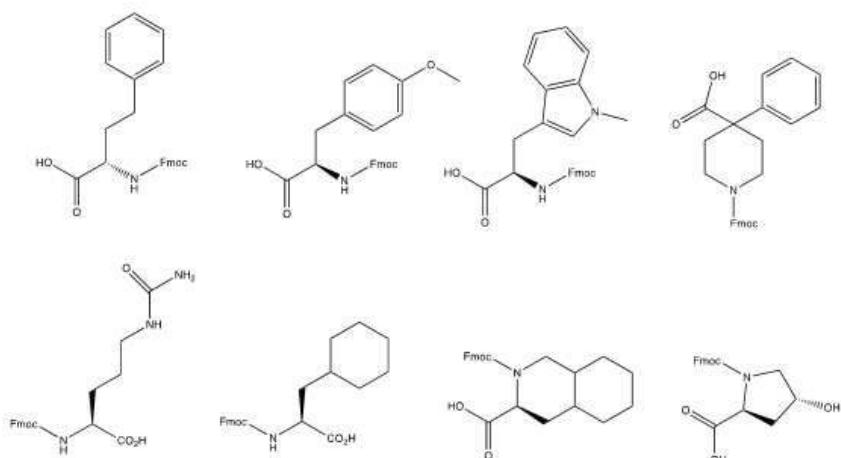
도면3c



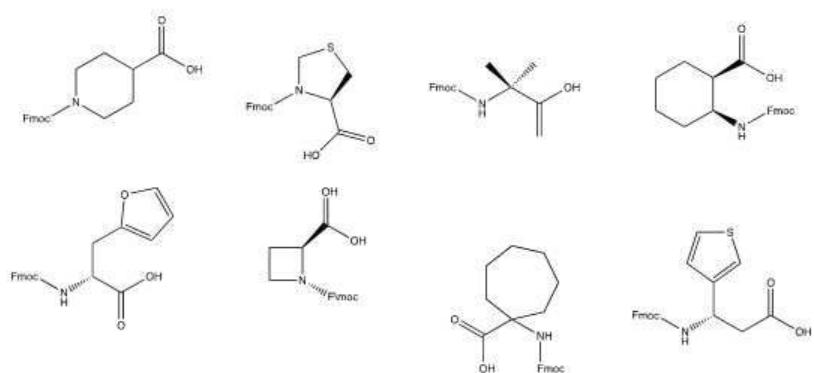
도면4a



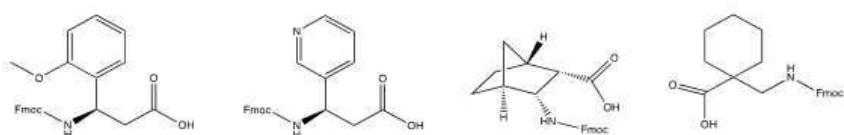
도면4b



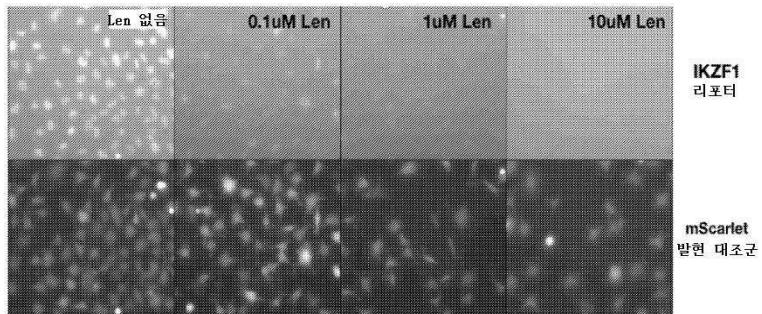
도면4c



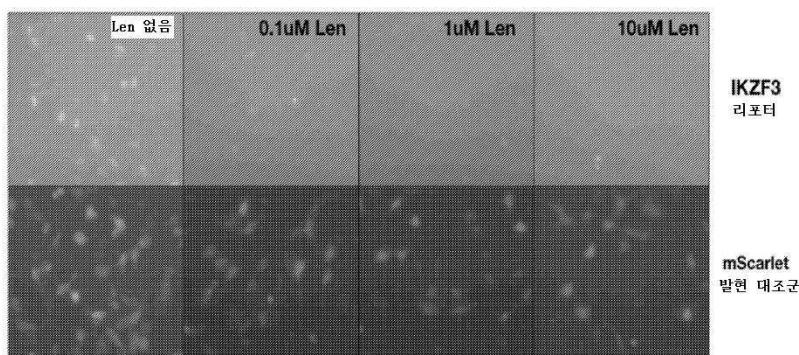
도면4d



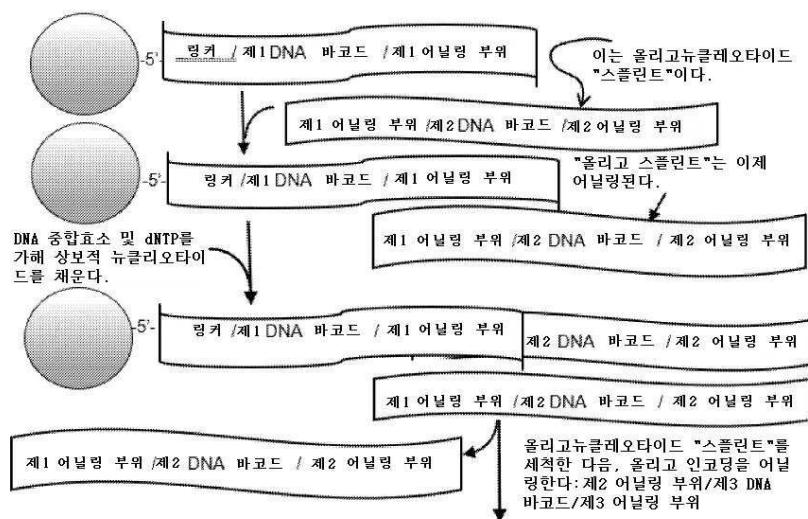
도면5



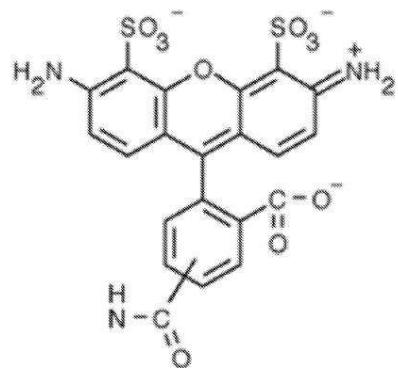
도면6



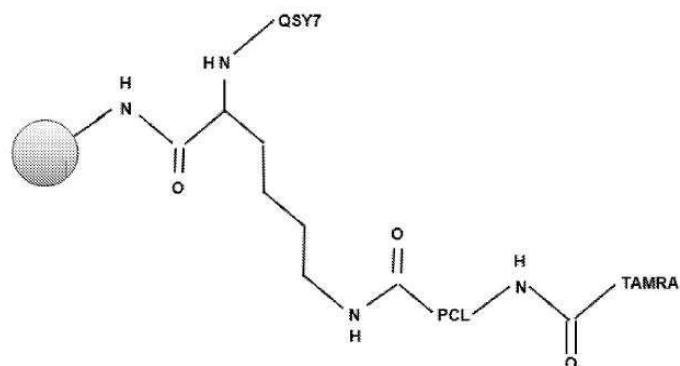
도면7



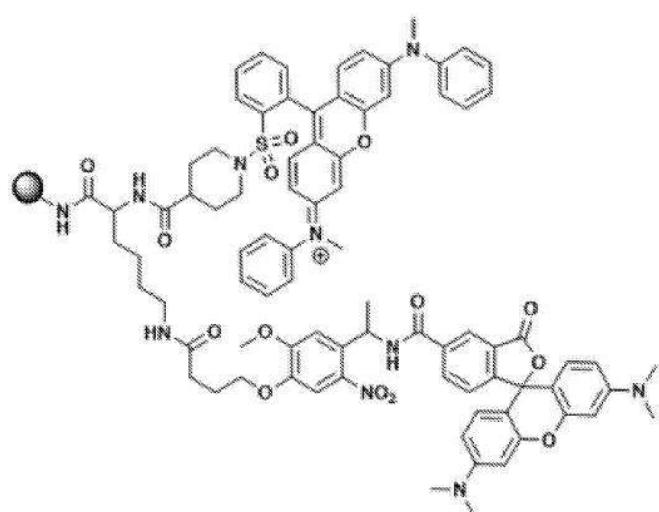
도면8



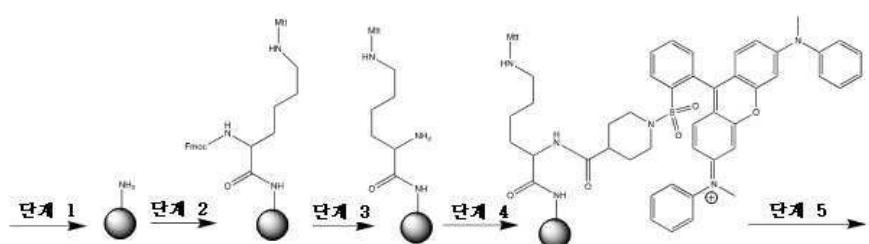
도면9



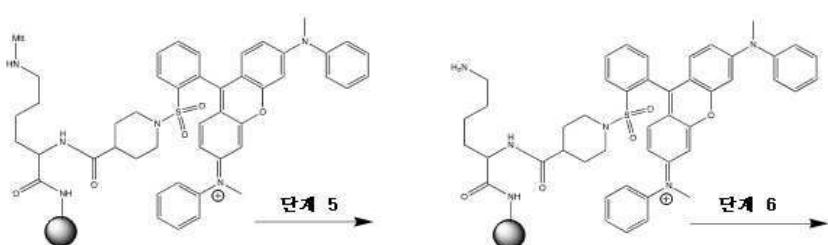
도면10



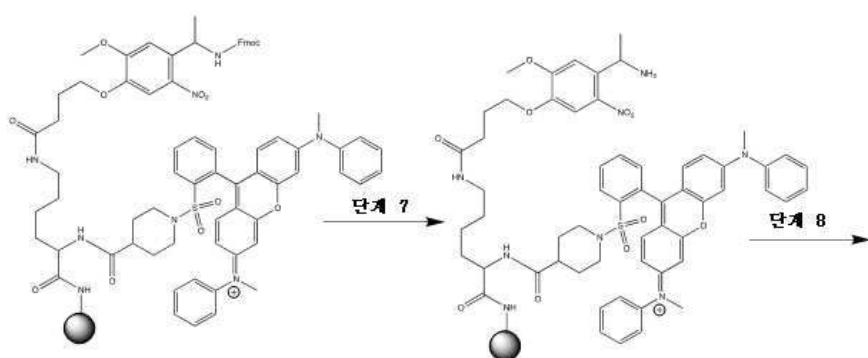
도면11a



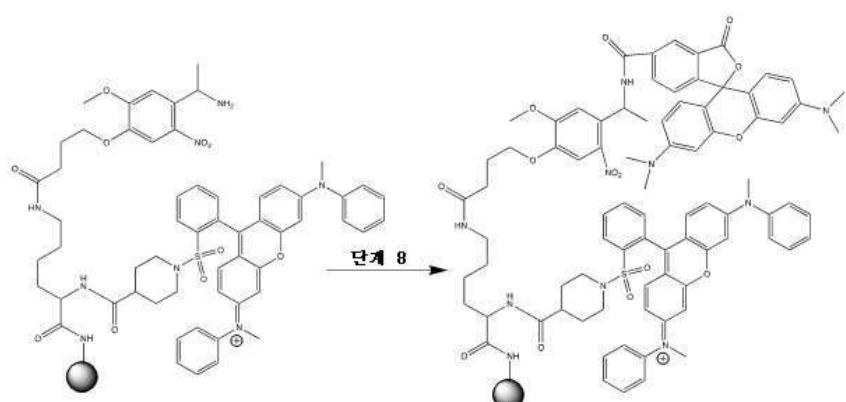
도면11b



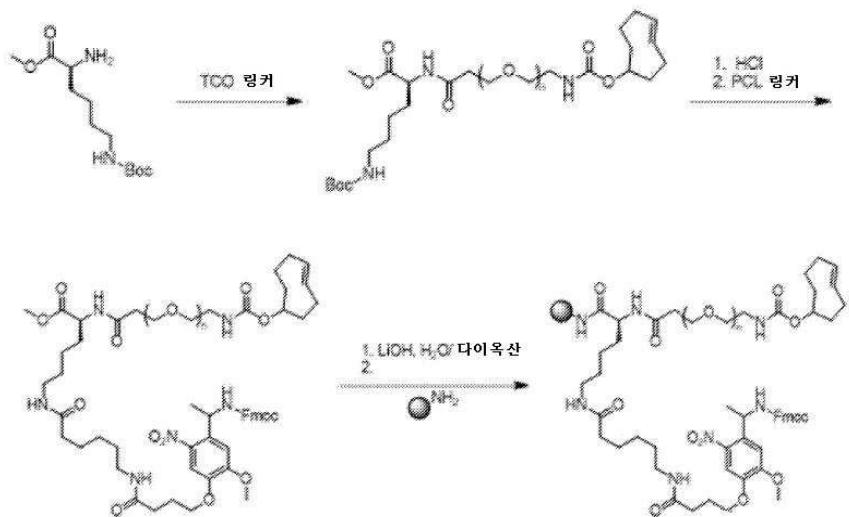
도면11c



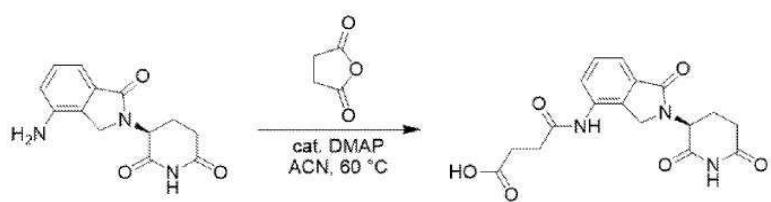
도면11d



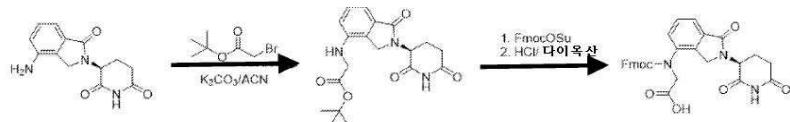
도면12



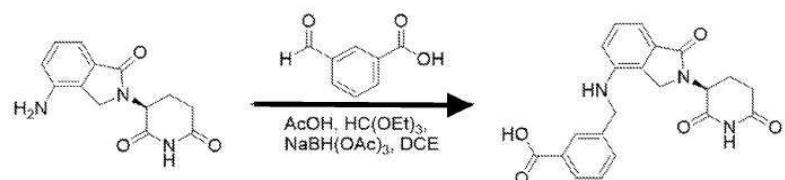
도면13



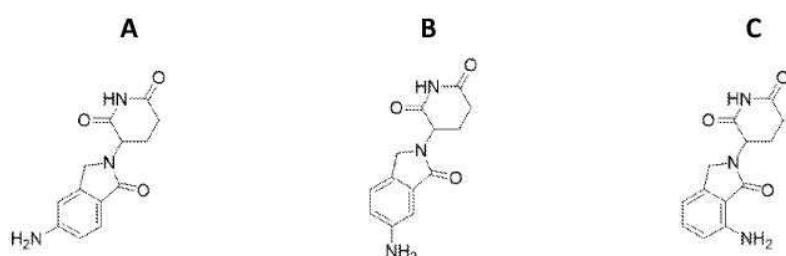
도면14



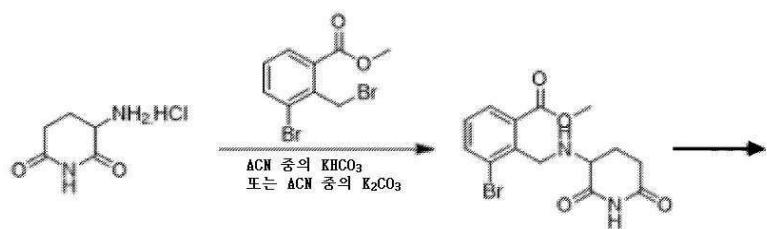
도면15



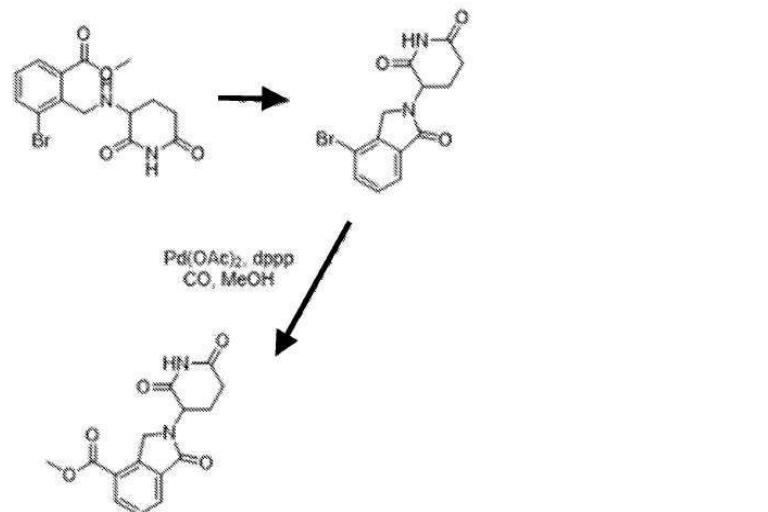
도면16



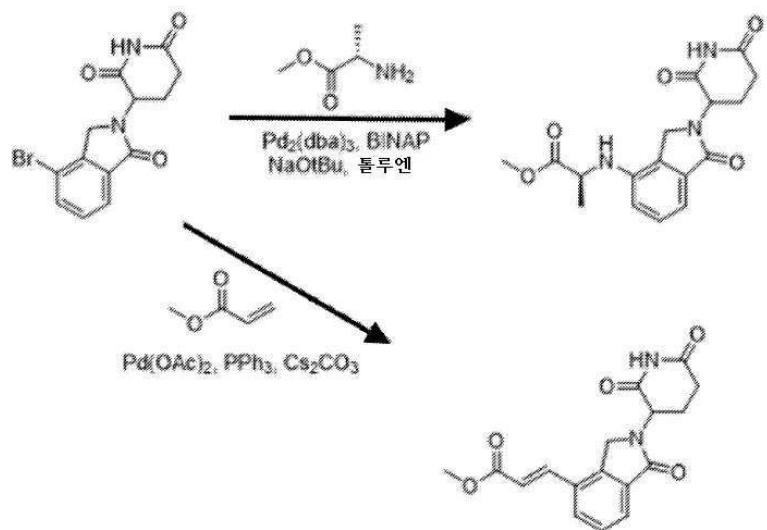
도면 17a



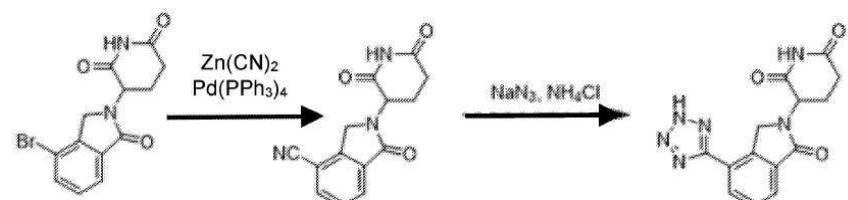
도면 17b



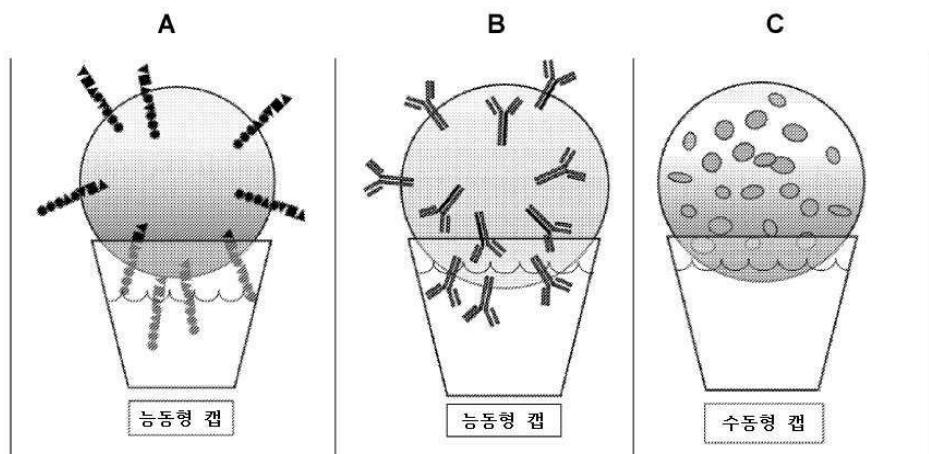
도면 17c



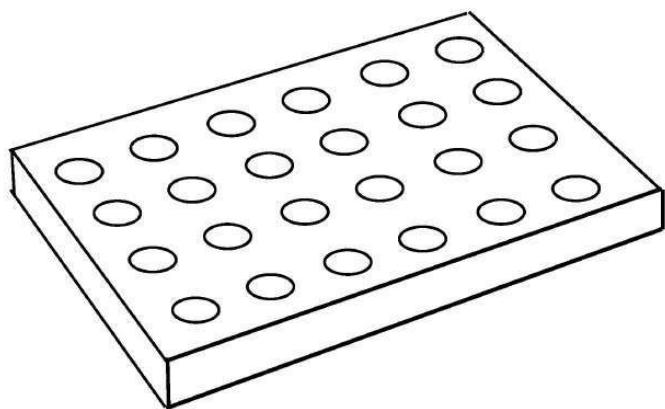
도면 17d



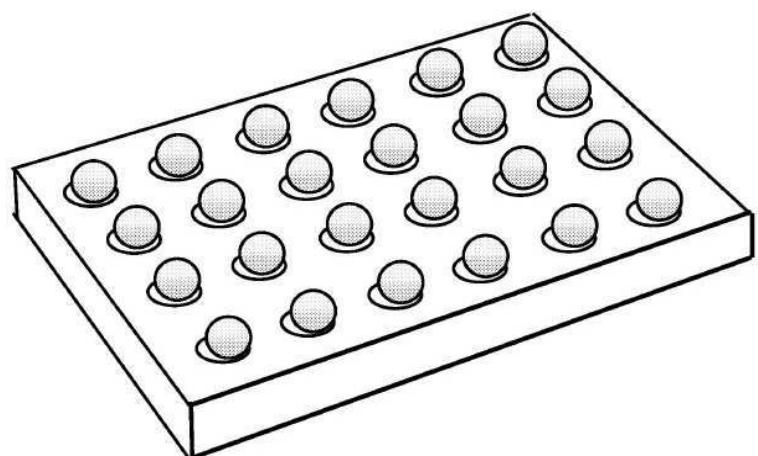
도면18



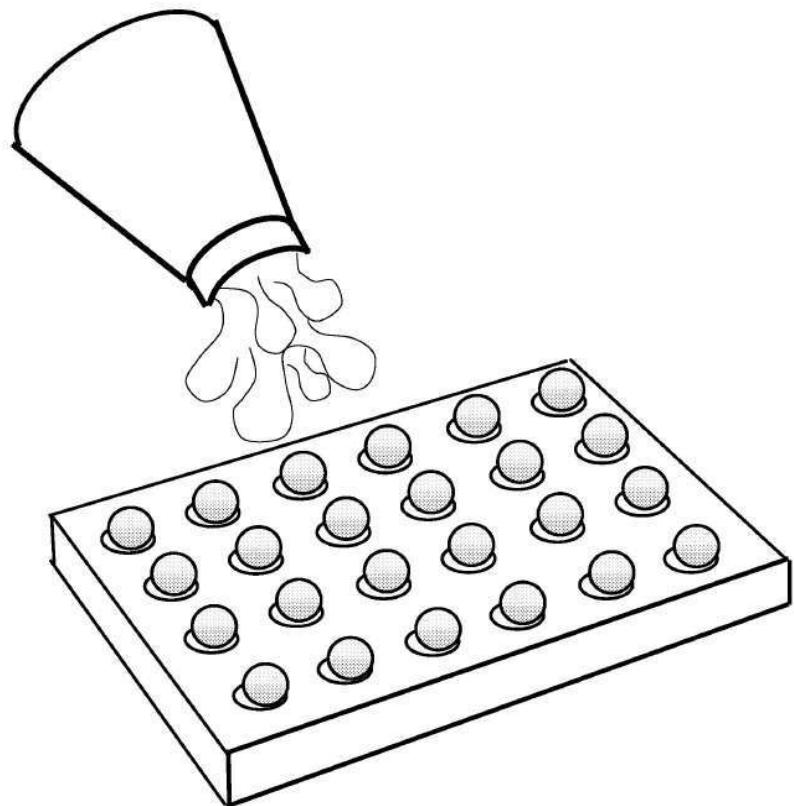
도면19a



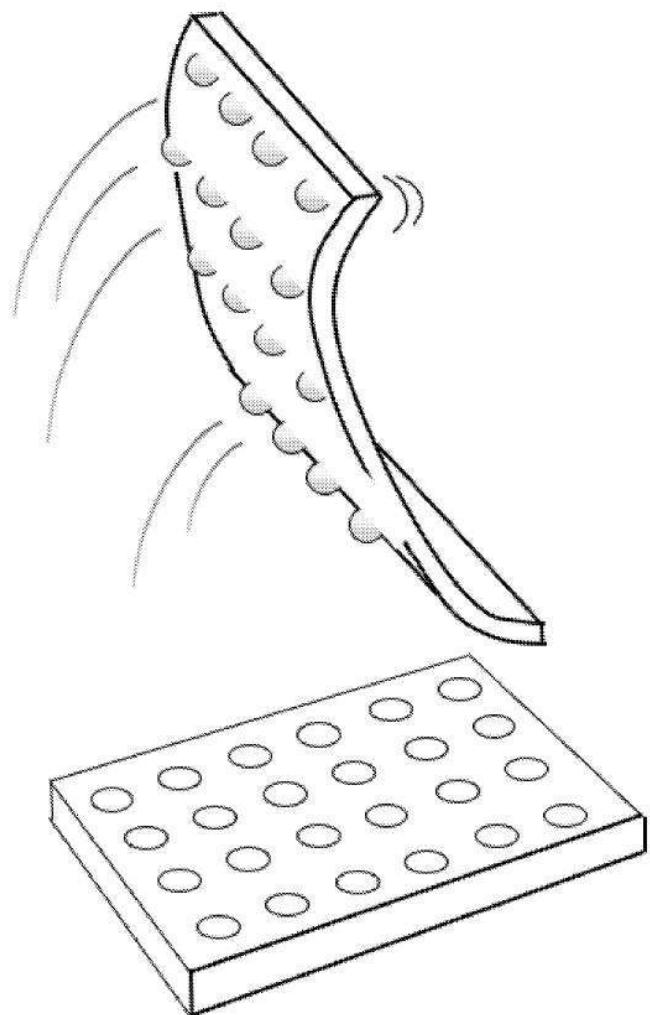
도면19b



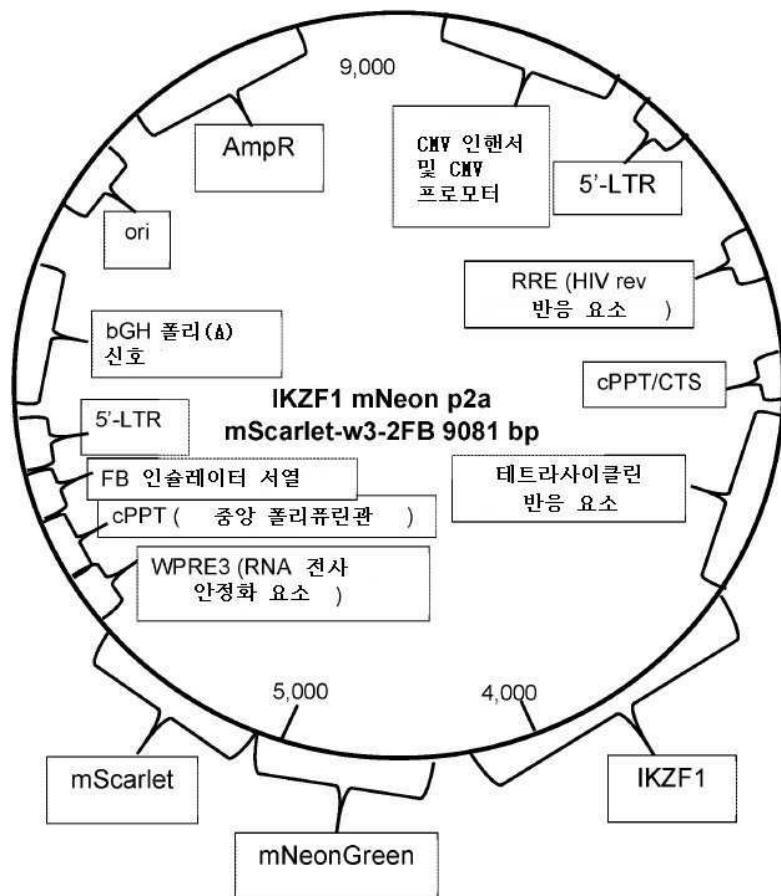
도면 19c



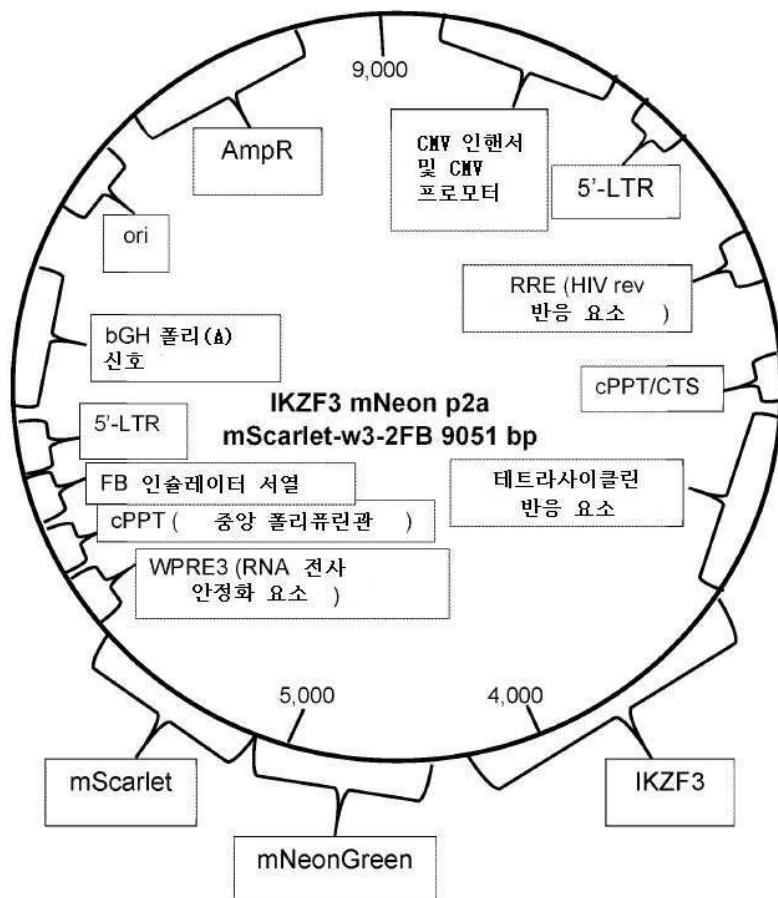
도면 19d



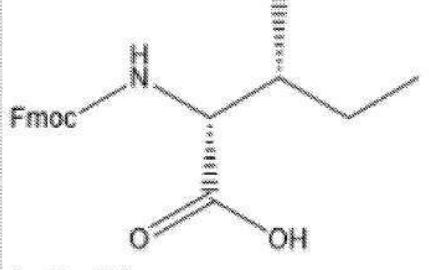
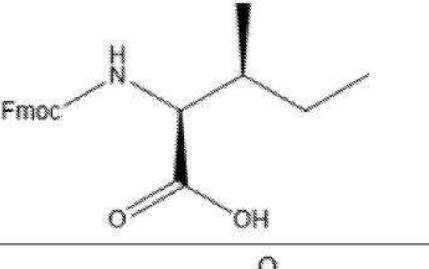
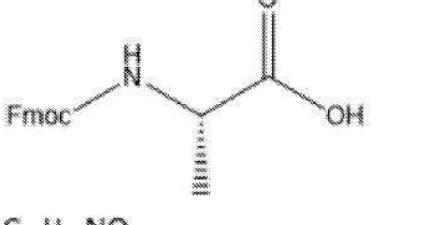
도면20



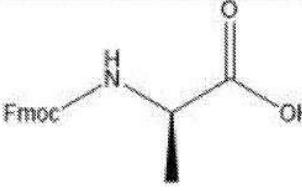
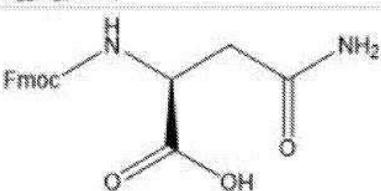
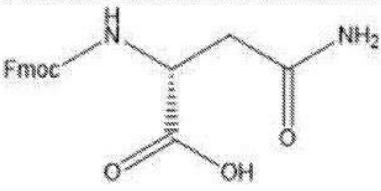
도면21



도면22a

 $C_{21}H_{23}NO_4$	Fmoc-D-Ile 바코드: ACGT
 $C_{21}H_{23}NO_4$	Fmoc-L-Ile 바코드: ACTC
 $C_{18}H_{17}NO_4$	Fmoc-L-Ala 바코드: AGAC

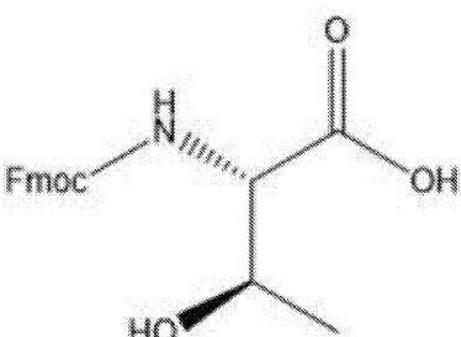
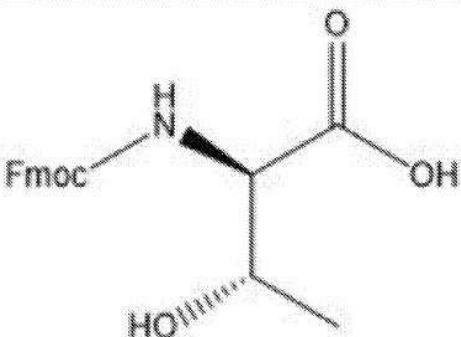
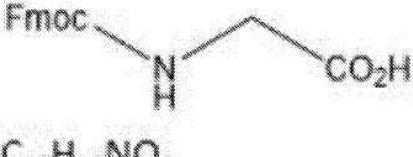
도면22b

 $C_{18}H_{17}NO_4$	Fmoc-D-Ala 바코드: AGCG
 $C_{19}H_{18}N_2O_5$	Fmoc-L-Asn 바코드: AGTA
 $C_{19}H_{18}N_2O_5$	Fmoc-D-Asn 바코드: ATAT

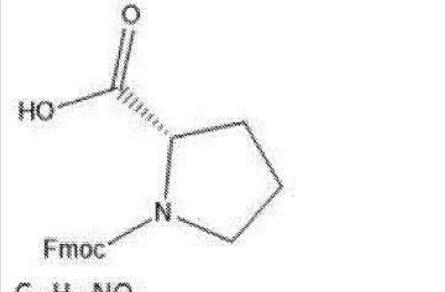
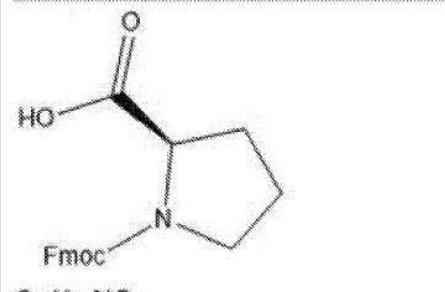
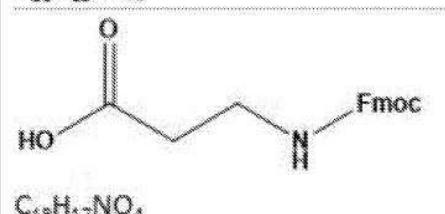
도면23

<p>$C_{20}H_{20}N_2O_5$</p>	Fmoc-L-Gln 바코드: ATGA
<p>$C_{20}H_{20}N_2O_5$</p>	Fmoc-D-Gln 바코드: CACG
<p>$C_{24}H_{21}NO_4$</p>	Fmoc-L-Phe 바코드: CAGC
<p>$C_{24}H_{21}NO_4$</p>	Fmoc-D-Phe 바코드: CATA

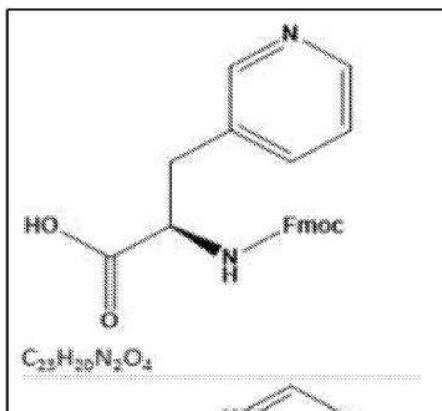
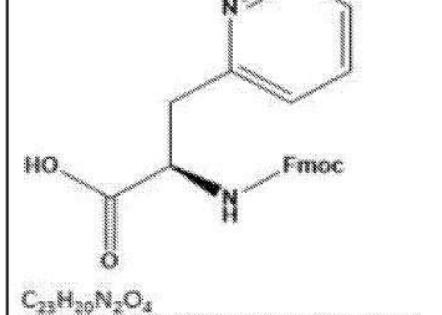
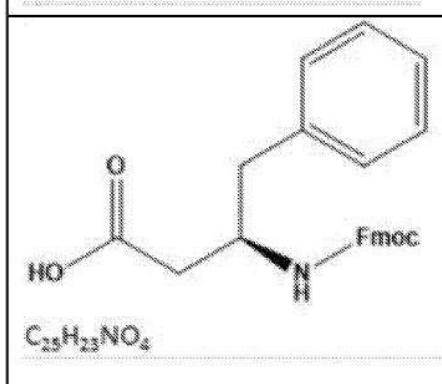
도면24a

 <chem>C1CC(O)C(C(=O)O)N(Fmoc)C1</chem> $C_{19}H_{19}NO_5$	Fmoc-L-Thr 바코드: CGAG
 <chem>C1CC(O)C(C(=O)O)N(Fmoc)C1</chem> $C_{19}H_{19}NO_5$	Fmoc-D-Thr 바코드: CGCT
 <chem>CN(Fmoc)C(=O)O</chem> $C_{17}H_{15}NO_4$	Fmoc-Gly 바코드: CGTC

도면24b

 $C_{20}H_{19}NO_4$	Fmoc-L-Pro 바코드: CTAC
 $C_{20}H_{19}NO_4$	Fmoc-D-Pro 바코드: CTGT
 $C_{19}H_{17}NO_4$	Fmoc-β-Gly 바코드: GACT

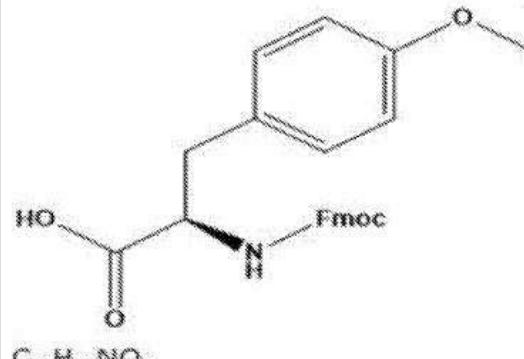
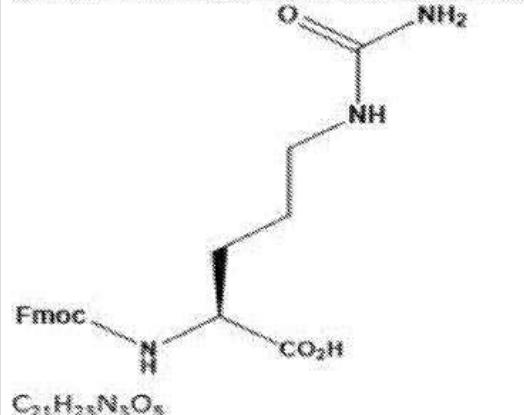
도면25a

 <p>$C_{23}H_{29}N_2O_4$</p>	Fmoc-L-3- 피리딜알라닌 바코드: GAGA
 <p>$C_{23}H_{29}N_2O_4$</p>	Fmoc-L-2- 피리딜알라닌 바코드: GCAC
 <p>$C_{23}H_{29}NO_4$</p>	Fmoc- β -Ala 바코드: GCTG

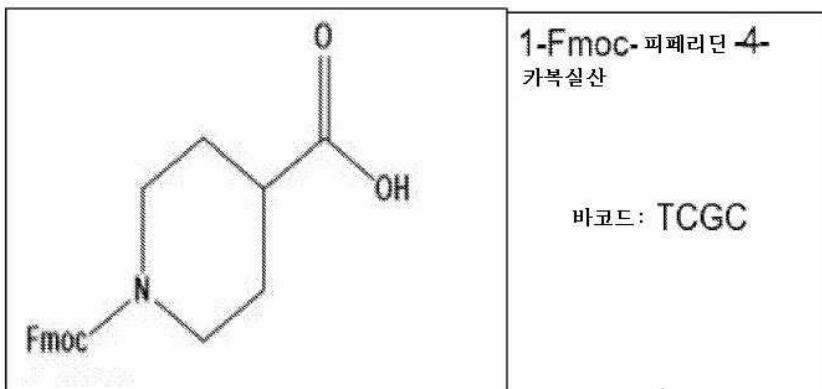
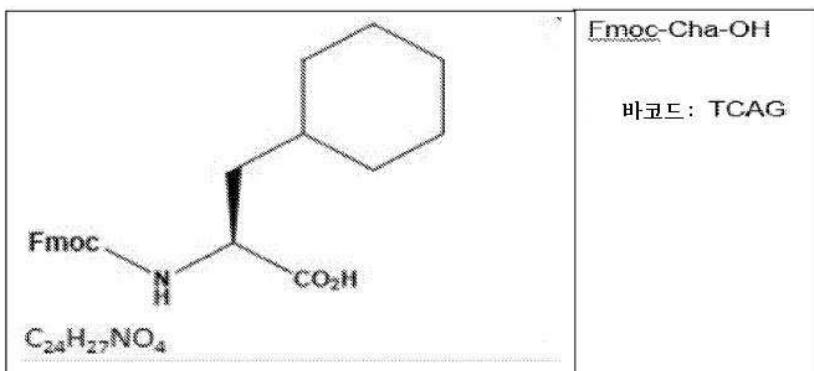
도면25b

<p><chem>C23H36N2O2</chem></p>	Fmoc-Lys(Ac)-OH 바코드: GTAG
<p><chem>C24H19Cl2NO2</chem></p>	Fmoc-3,4-다이클로로-L-페닐알라닌 바코드: GTCA

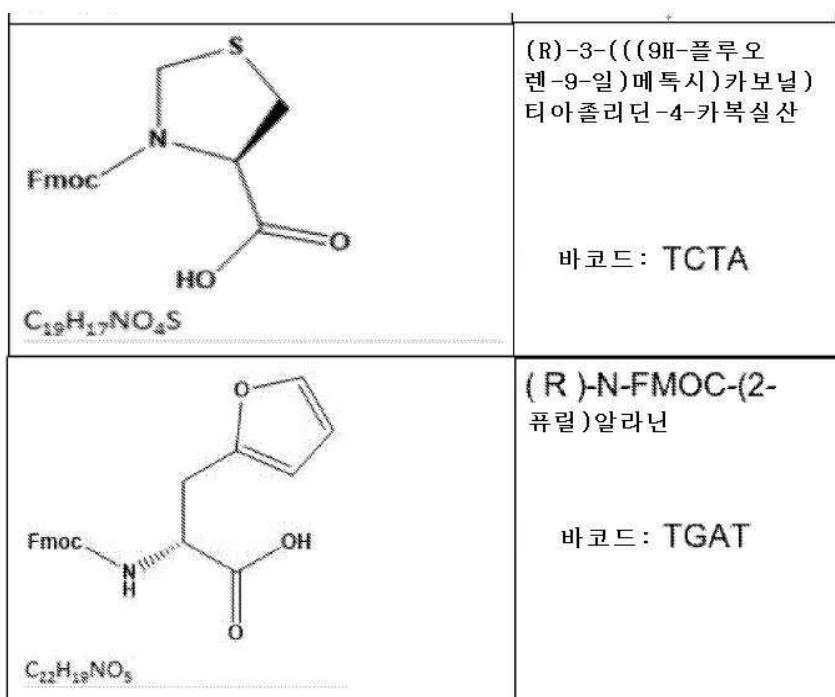
도면26a

 <p><chem>C25H23NO5</chem></p>	Fmoc-O-methyl-L-티로신 바코드: TAGT
 <p><chem>C21H23N2O5</chem></p>	Fmoc-Cit-OH 바코드: TATC

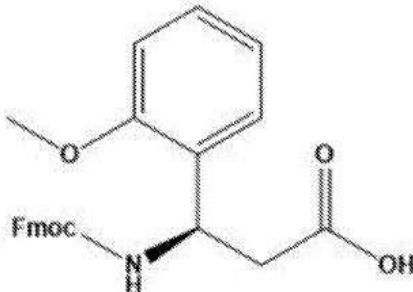
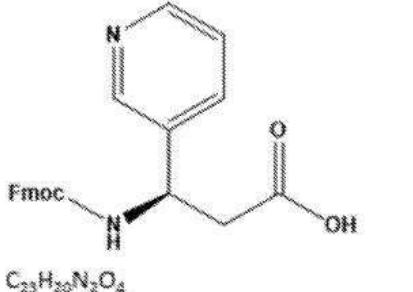
도면26b



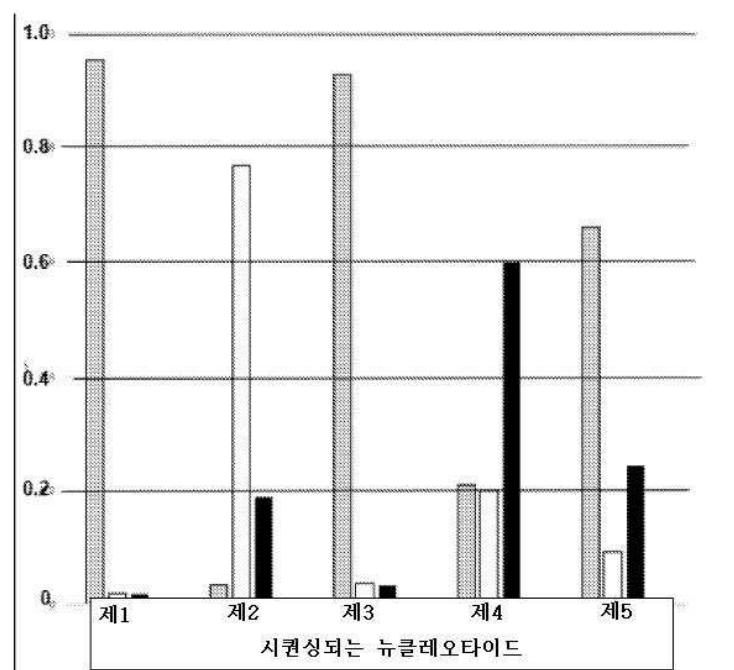
도면27a



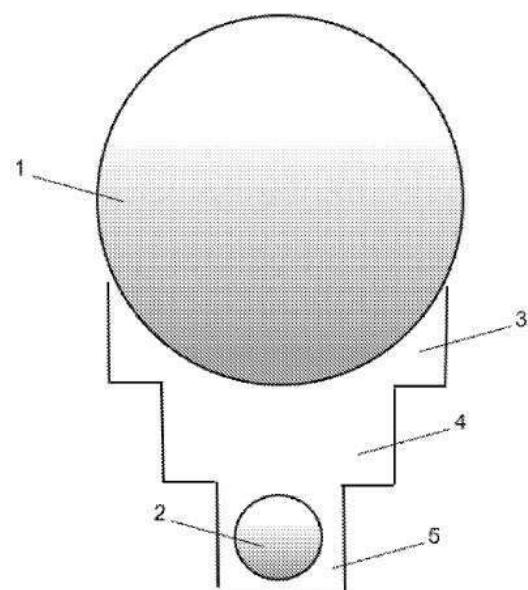
도면27b

 <p><chem>C25H23NO5</chem></p>	<p>(R)-3-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노-3-(2-메톡시페닐)프로판산</p> <p>바코드 : TGCA</p>
 <p><chem>C23H20N2O4</chem></p>	<p>(R)-3-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노-3-(피리딘-3-일)프로판산</p> <p>바코드 : TGTG</p>

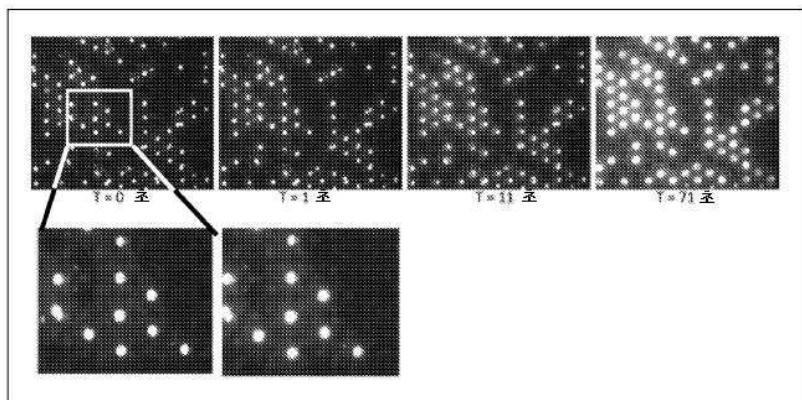
도면28



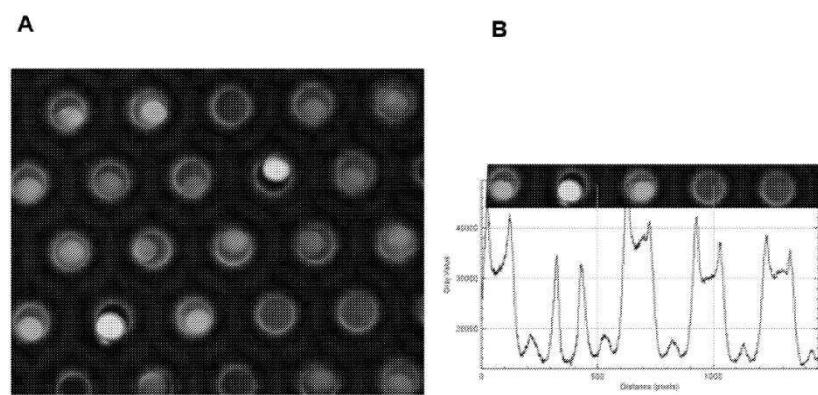
도면29



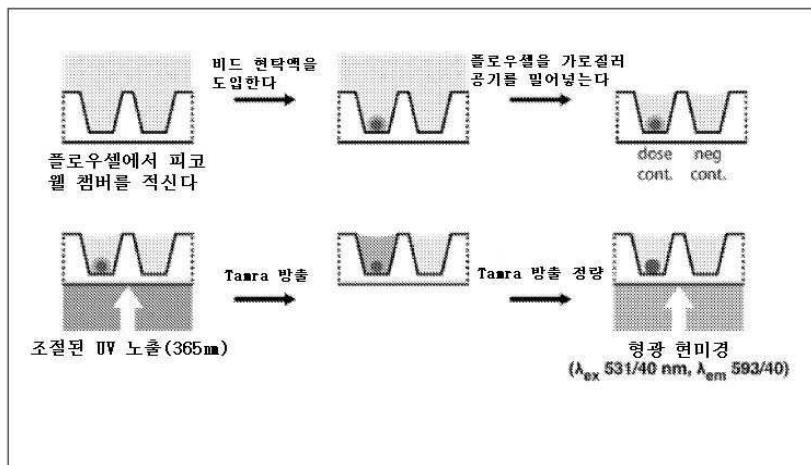
도면30



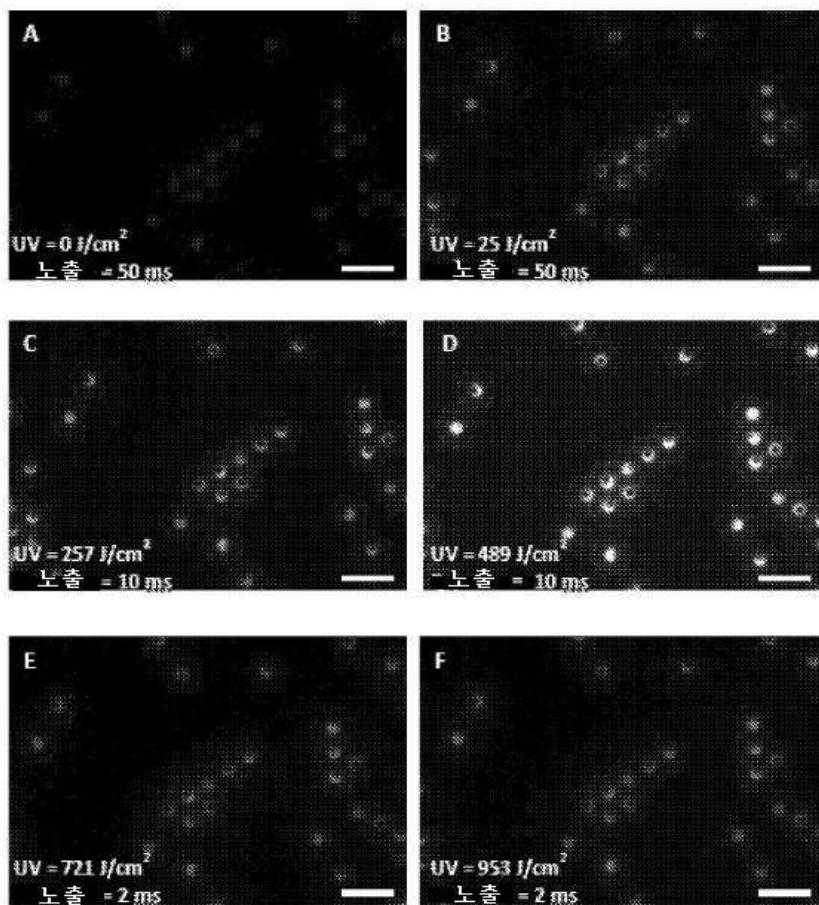
도면31



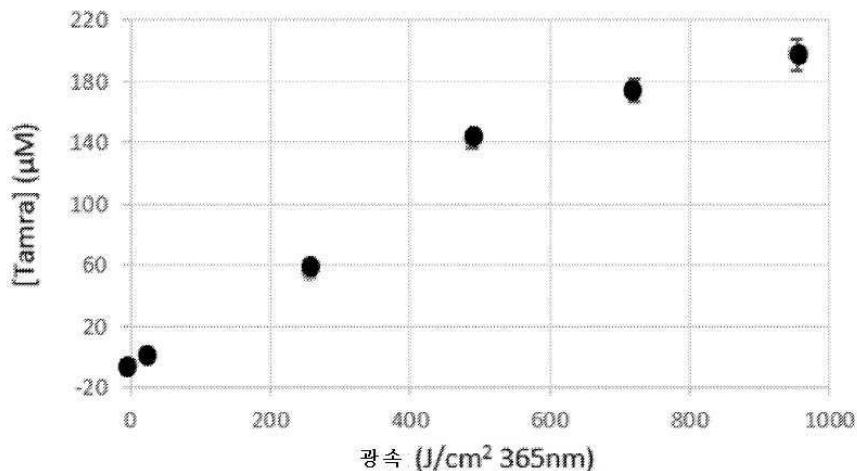
도면32



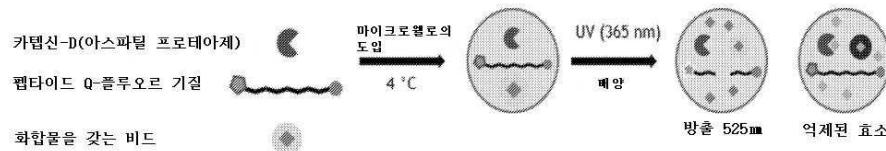
도면33



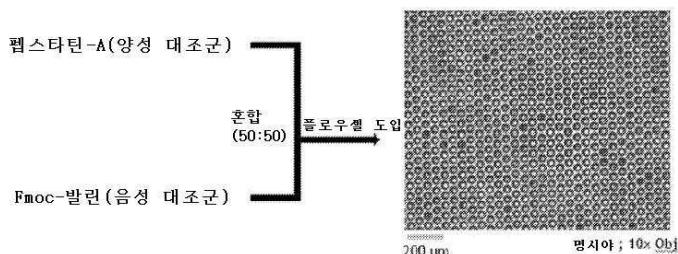
도면34



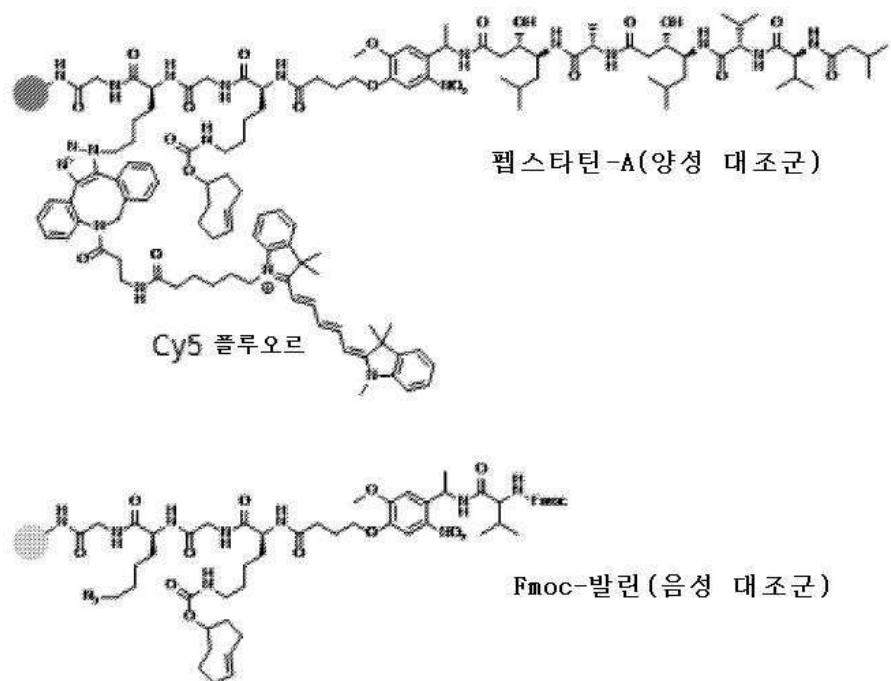
도면35a



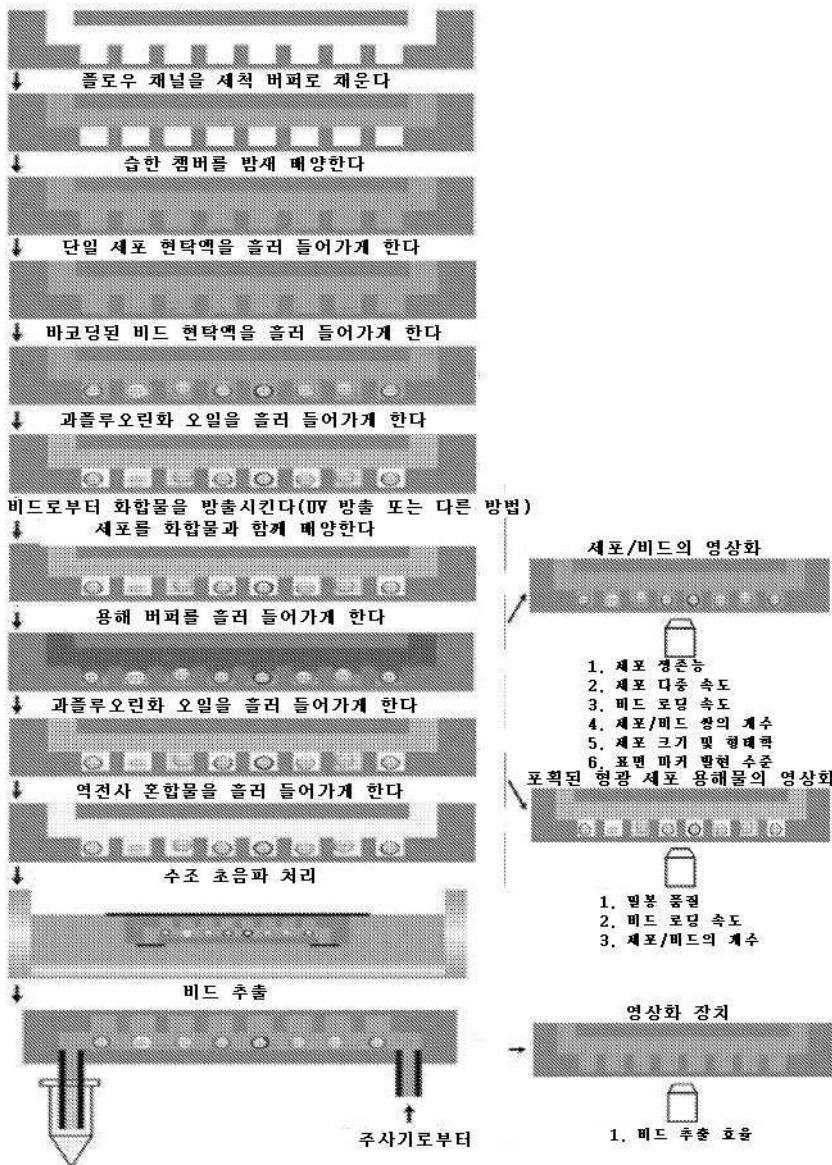
마이크로웰에서의 효소 검정



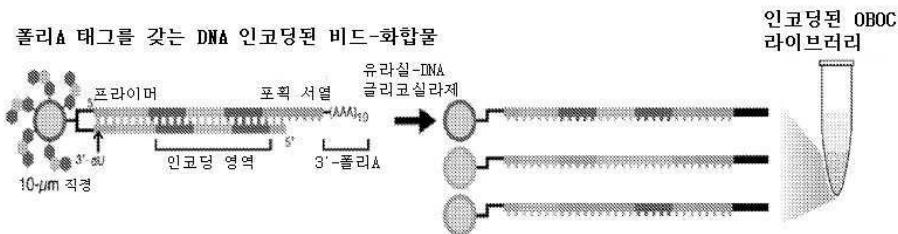
도면35b



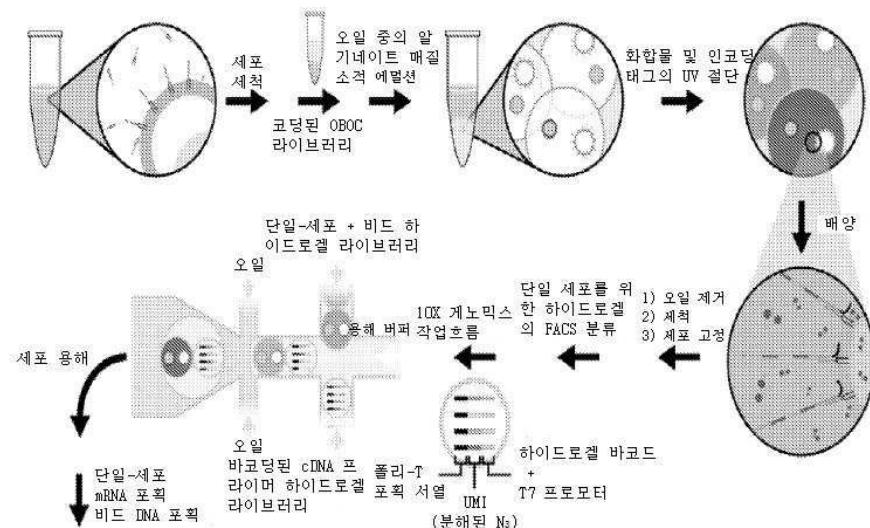
도면36



도면37



포획에 상보적인 지질-DNA 서열로 표지화된 세포



화합물과 상관관계를 갖는 대량신속처리 단일-세포 mRNA 발현 맵

