



(10) 授权公告号 CN 111971124 B

(45) 授权公告日 2022.08.23

(21) 申请号 201880072082.7

(22) 申请日 2018.09.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111971124 A

(43) 申请公布日 2020.11.20

(30) 优先权数据
62/562,905 2017.09.25 US
62/562,912 2017.09.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/052497 2018.09.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/060857 EN 2019.03.28

(73) 专利权人 普莱克斯姆公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·F·罗基德基 M·范阮
A·B·麦康奈尔 K·维贾伊安

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 魏延玲

(51) Int.Cl.
C40B 20/04 (2006.01)

审查员 赵文俊

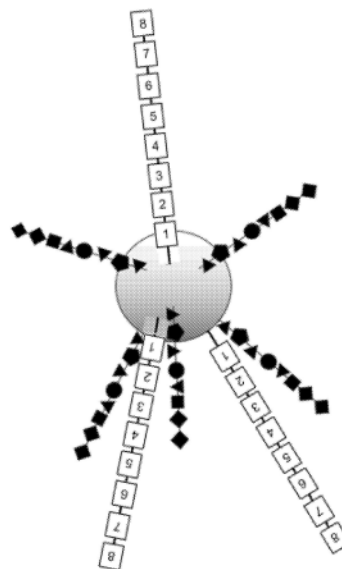
权利要求书10页 说明书89页 附图54页

(54) 发明名称

寡核苷酸编码的化学文库

(57) 摘要

本申请提供了一种具有共价连接的化合物和共价连接的DNA条形码的珠粒以及使用这种珠粒的方法。所述珠粒具有所述化合物的许多基本上相同的拷贝和所述DNA条形码的许多基本上相同的拷贝。所述化合物由一个或多个化学单体组成,其中所述DNA条形码采取条形码模块的形式,其中每个模块对应于对应的化学单体并允许标识对应的化学单体。所述核酸条形码可以具有级联结构或正交结构。提供了一种用于对珠粒结合的核酸条形码进行测序、用于从珠粒切割化合物以及用于评估所释放化合物的生物学活性的方法。



1. 一种用于筛选化合物的系统,所述系统包括:

(a) 皮可孔阵列板,所述皮可孔阵列板包括多个皮可孔,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板由壁间隔开,并且其中所述壁位于所述顶部孔口与所述底板之间,

(b) 珠粒,所述珠粒安置在皮可孔中,其中所述珠粒包括多个相同的珠粒结合的DNA条形码和多个相同的珠粒结合的化合物,

(c) 其中所述珠粒包括采取级联DNA条形码或正交DNA条形码的形式的珠粒结合的DNA条形码,并且其中如果所述DNA条形码采取级联DNA条形码的形式,则所述级联DNA条形码通过使用以下中的一项或两项的方法制成:

(i) 使用点击化学,或

(ii) 使用重复步骤循环,其中所述重复步骤循环包括使用夹板寡核苷酸,所述夹板寡核苷酸能够与部分制成的珠粒结合的DNA条形码杂交,并且其中所述杂交通过所述夹板寡核苷酸上的退火位点以及所述部分制成的珠粒结合的DNA条形码中的对应的互补退火位点介导,

其中经过退火的夹板寡核苷酸作为模板用于使用DNA聚合酶延伸所述部分制成的DNA条形码,并且其中所述夹板寡核苷酸含有与要和所述部分制成的珠粒结合的DNA条形码聚合的DNA条形码模块互补的碱基,并且其中所述夹板寡核苷酸还含有与要和所述部分制成的珠粒结合的DNA条形码聚合的退火位点互补的碱基,并且

(d) 其中所述多个相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物包括一个或多个化学文库单体,并且其中每个珠粒结合的DNA条形码模块标识对应的化学文库单体,其中术语“化合物”用于指代包括一个或多个化学文库成员的完整的产物,并且其中完整的DNA条形码标识所述化合物。

2. 根据权利要求1所述的系统,其进一步包括寡核苷酸测序引物,所述寡核苷酸测序引物能够引导对由珠粒结合的DNA条形码包括的一个或多个DNA条形码模块进行的测序,其中任选地所述系统包括DNA测序机,并且其中所述DNA测序机不是基于发光的测序仪,也不是基于pH的DNA测序机。

3. 根据权利要求1所述的系统,其进一步包括多个球形盖,其中每个盖能够装配到皮可孔的所述孔口中,其中所述孔口是圆形的,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的蒸发,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的泄漏。

4. 根据权利要求1所述的系统,其中安置在至少一个皮可孔中的至少一个珠粒包括与所述至少一个珠粒偶联的至少一个应答捕获元件。

5. 根据权利要求1所述的系统,其中安置在皮可孔中的至少一个珠粒包括与所述至少一个珠粒偶联的至少一个应答捕获元件,其中所述至少一个应答捕获元件包括:

(a) poly (dT) ;

(b) 外显子靶向性RNA探针;

(c) 抗体;或

(d) 适体。

6. 根据权利要求1所述的系统,其中所述DNA条形码是级联DNA条形码或正交DNA条形码,并且其中所述DNA条形码包括一个或多个DNA条形码模块,其中所述一个或多个DNA条形

码模块中的每个DNA条形码模块编码标识化学文库单体的信息,并且其中所述级联DNA条形码或所述正交DNA条形码进一步包括以下中的一项或两项:

- (a) 一个或多个功能性核酸;以及
- (b) 编码除化学文库单体的身份以外的类型的信息的一个或多个核酸。

7. 根据权利要求1所述的系统,其中所述珠粒结合的级联DNA条形码包括:

- (i) 第一DNA条形码模块;或
- (ii) 第一DNA条形码模块、第一退火位点和第二DNA条形码模块;或
- (iii) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点和第三DNA条形码模块;或
- (iv) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点和第四DNA条形码模块;或
- (v) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点、第四DNA条形码模块、第四退火位点和第五DNA条形码模块;或
- (vi) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点、第四DNA条形码模块、第四退火位点、第五DNA条形码模块、第五退火位点和第六DNA条形码模块。

8. 根据权利要求1所述的系统,其中所述珠粒包括本身为正交DNA条形码的DNA条形码,其中所述珠粒包括外表面,并且其中所述正交DNA条形码包括:

- (a) 第一核酸,所述第一核酸包括第一DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第一核酸在第一位置处与所述珠粒偶联,
- (b) 第二核酸,所述第二核酸包括第二DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第二核酸在第二位置处与所述珠粒偶联,以及
- (c) 第三核酸,所述第三核酸包括第三DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第三核酸在第三位置处与所述珠粒偶联,并且

其中所述珠粒上的所述第一位置、所述第二位置和所述第三位置各自定位于所述珠粒的外表面上的不同位置处。

9. 根据权利要求1所述的系统,其中所述级联DNA条形码通过使用以下的方法制成:

- (i) 点击化学和使用所述夹板寡核苷酸的所述重复步骤循环两者;
- (ii) 点击化学和不是点击化学方法的化学方法两者;
- (iii) 仅点击化学;或
- (iv) 仅使用所述夹板寡核苷酸的所述重复步骤循环。

10. 根据权利要求1所述的系统,其中所述多个相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物通过可切割连接子、或通过本身为光可切割连接子的可切割连接子或通过不可切割连接子与所述珠粒偶联。

11. 根据权利要求1所述的系统,其中至少一个珠粒包括由接枝有聚乙二醇的低交联聚苯乙烯基质组成的接枝共聚物。

12. 根据权利要求1所述的系统,其中至少一个皮可孔包括至少一个细胞,

其中所述多个相同的珠粒结合的化合物通过可切割连接子与所述至少一个珠粒结合,并且其中切割所述可切割连接子使所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以产生所释放

化合物,并且

其中所述所释放化合物能够接触所述至少一个细胞,并且其中所述至少一个细胞为:

- (i) 不是癌细胞的哺乳动物细胞,
- (ii) 哺乳动物癌细胞,
- (iii) 死亡的哺乳动物细胞,
- (iv) 凋亡的哺乳动物细胞,
- (v) 坏死的哺乳动物细胞,
- (vi) 细菌细胞,
- (vii) 疟原虫细胞,
- (viii) 具有代谢活性但具有交联基因组且无法进行细胞分裂的细胞,或
- (ix) 被病毒感染的哺乳动物细胞。

13. 根据权利要求1所述的系统,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板间隔开,并且其中在所述顶部孔口与所述底板之间存在壁,并且

其中所述孔口是圆形的,其中所述底板是圆形的,并且其中所述壁采取截锥体的形式,并且其中所述孔口具有第一直径,所述底板具有第二直径,并且其中所述第一直径大于所述第二直径。

14. 根据权利要求1所述的系统,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板间隔开,并且其中在所述顶部孔口与所述底板之间存在壁,并且

其中所述孔口是圆形的,其中所述底板是圆形的,并且其中所述壁采取截锥体的形式,并且其中所述孔口具有第一直径,所述底板具有第二直径,并且其中所述第一直径大于所述第二直径,

所述系统进一步包括紧密装配到所述孔口中的盖,其中所述孔口由硬度计较大即较硬的聚合物构成,并且其中所述盖由硬度计较小即较软的聚合物制成,并且其中所述盖和所述孔口的相对硬度计允许所述盖可逆且紧密地装配到所述孔口中,并且

其中所述盖为:

- (i) 仅旨在塞住所述皮可孔并防止泄漏的盖,
- (ii) 在所述皮可孔中培养细胞培养基中的细胞的情况下,本身为无源盖并且能够吸收细胞释放的代谢物的盖,
- (iii) 本身为有源盖并且采取包括多个相同的化合物的珠粒形式的盖,并且其中所述多个相同的化合物中的每个化合物通过可切割连接子与所述珠粒偶联;
- (iv) 本身为有源盖并且采取包括多个相同试剂的珠粒的形式的盖,并且其中所述多个相同的试剂中的每个试剂通过可切割连接子与所述珠粒偶联。

15. 根据权利要求14所述的系统,其进一步包括至少一个球形盖。

16. 根据权利要求14所述的系统,其进一步包括至少一个非球形盖。

17. 根据权利要求1所述的系统,其中所述DNA条形码包括一个或多个核酸,所述一个或多个核酸不编码任何化学单体,而是标识以下中的一项或多项:

- (a) 与所述珠粒可切割连接的化合物的类别;

(b) 多步骤有机合成途径中的步骤,其中珠粒结合的核酸对应于用于制备珠粒结合的化合物的给定化学单体,并且其中对应于给定化学单体的所述珠粒结合的核酸标识所述化学单体;

(c) 所述珠粒结合的化合物合成的日期;

(d) 所述珠粒结合的化合物旨在治疗的疾病;

(e) 所述珠粒结合的化合物旨在刺激或抑制的细胞事件;或

(f) 用于使给定化学文库单体与所述珠粒偶联的反应条件。

18. 根据权利要求1所述的系统,其中不存在将所述珠粒结合的化合物中的任何化合物与所述珠粒结合的DNA条形码中的任何DNA条形码连接的任何头片。

19. 根据权利要求1所述的系统,其中所述级联DNA条形码包括本身为DNA条形码模块的至少一个核酸以及至少一个功能性核酸,所述至少一个功能性核酸:

(a) 能够用作测序引物的退火位点,

(b) 能够形成发夹结构,并且其中所述发夹结构包括测序引物、所述测序引物的退火位点和所述发夹结构中的弯曲,其中所述弯曲在所述测序引物的5'并且在所述测序引物的所述退火位点的3',或

(c) 为间隔区核酸。

20. 根据权利要求1所述的系统,其中所述正交DNA条形码含有多个DNA条形码模块,其中所述DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块与所述珠粒上的不同位点直接偶联或通过连接子与所述珠粒上的不同位点偶联,并且其中所述多个DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块含有至少一个功能性核酸,所述至少一个功能性核酸:

(a) 能够用作测序引物的退火位点,

(b) 能够形成发夹结构,并且其中所述发夹结构包括测序引物、所述测序引物的退火位点和所述发夹结构中的弯曲,其中所述弯曲在所述测序引物的5'并且在所述测序引物的所述退火位点的3',或

(c) 为间隔区核酸。

21. 一种用于控制存在于皮可孔中的溶液中的化合物的浓度的方法,其中所述方法应用于皮可孔中的珠粒结合的化合物,其中所述皮可孔含有溶液,并且其中所述珠粒结合的化合物通过可切割连接子与所述珠粒偶联,所述方法包括:

(a) 将所述珠粒结合的化合物暴露于实现所述可切割连接子的切割的条件步骤,其中所述条件包括能够切割所述可切割连接子的光,

(b) 使所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以生成所释放化合物的步骤,其中在释放之后,所述所释放化合物扩散或分散在所述溶液中,从而产生所述溶液中的所述化合物的均匀浓度,

(c) 调节所述条件以产生所述均匀浓度的所确定浓度的步骤,其中所述所确定浓度是关于从珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度而确定的。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述条件是通过调节所述光的波长、所述光的强度和曝光的持续时间中的一个或多个来调节的,并且其中任选地:

(i) 从珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度是在实现所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以产生所释放化合物的同时确定的,或

(ii) 从珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度是在实现所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以产生所释放化合物之前的时间点确定的。

23. 一种与皮可孔板组合的盖, 所述皮可孔板包括多个皮可孔, 其中所述盖能够与所述皮可孔板一起使用,

其中所述多个皮可孔中的每个皮可孔由孔口、底板和壁限定, 其中所述壁由顶部的所述孔口和底部的所述底板限定, 并且其中所述孔口是圆形的, 其中所述底板是圆形的, 并且其中所述壁采取截锥体的表面的形式, 并且

其中所述孔口具有第一直径, 所述底板具有第二直径, 并且其中所述第一直径大于所述第二直径,

其中所述盖是能够紧密装配到所述孔口中的球形盖, 其中所述孔口由硬度计较大即较硬的聚合物构成, 并且其中所述盖由具有硬度计较小即较软的聚合物制成,

并且其中所述盖和所述孔口的相对硬度计允许所述球形盖可逆且紧密地装配到所述孔口中, 并且其中所述盖:

(i) 能够塞住所述皮可孔并防止泄漏,

(ii) 为无源盖并且在所述皮可孔中培养细胞培养基中的细胞的情况下能够吸收细胞释放的代谢物,

(iii) 为采取包括多个相同的化合物的珠粒的形式的有源盖, 并且

其中所述多个相同的化合物中的每个化合物通过可切割连接子与所述珠粒偶联, 其中所述多个皮可孔中的至少一个皮可孔含有水性介质, 并且其中所述可切割连接子的切割使所述多个相同的化合物中的至少一些化合物从所述珠粒释放到所述水性介质中。

24. 一种筛选化合物的系统, 其包括: 皮可孔阵列板, 所述皮可孔阵列板包括平坦的上表面、多个皮可孔, 其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部, 其中所述顶部孔口与所述底板由壁间隔开, 并且其中所述壁位于所述顶部孔口与所述底板之间;

以及任选地珠粒, 所述珠粒安置在所述多个皮可孔中的至少一个皮可孔中, 其中所述珠粒包括多个相同的珠粒结合的DNA条形码和多个相同的珠粒结合的化合物,

其中所述皮可孔阵列板进一步包括垫子, 所述垫子能够牢固地覆盖处于所述多个皮可孔中的至少一个皮可孔或全部皮可孔的顶部处的所述开口, 或者实际上牢固地覆盖处于所述多个皮可孔中至少一个皮可孔或全部皮可孔的顶部处的所述开口, 其中所述牢固地覆盖是可逆的, 其中所述垫子任选地包括以下中的一项或全部:

(a) 吸收性表面, 当所述吸收性表面被定位成与所述皮可孔阵列板的所述平坦的上表面接触时, 所述吸收性表面能够吸收由所述多个皮可孔中的一个或多个皮可孔包括的任何代谢物、生物化学品或蛋白质,

(b) 粘性表面, 所述粘性表面能够保持与所述皮可孔阵列板的所述平坦的顶表面的可逆粘附。

25. 一种用于鉴定一种或多种感兴趣的化合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 提供多个珠粒, 其中每个珠粒包括连接到所述珠粒的彼此相关的多个化合物以及多个寡核苷酸, 其中连接到每个珠粒的所述多个寡核苷酸标识连接到同一珠粒的所述多个化合物;

(b) 执行涉及连接到所述珠粒上的所述多个化合物的所述测定；

(c) 确定反映所述化合物在步骤b的所述测定中的性能的至少一个信号；

(d) 在不从所述珠粒去除所述寡核苷酸的情况下，对连接到所述珠粒的所述多个寡核苷酸进行测序，由此确定每个珠粒的测序读数；以及

(e) 通过步骤d的所述测序读数鉴定连接到所述珠粒的所述化合物，并将所述化合物与步骤c的所确定信号中含有的所述测定性能相关，其中具有来自所述测定的信号和所述测序读数的珠粒标识所述感兴趣的化合物。

26. 根据权利要求25所述的方法，其中所述多个化合物通过串联连接多个化合物构建块连接到所述珠粒表面，其中所有所述化合物构建块共同构成所述化合物。

27. 根据权利要求26所述的方法，其中每个DNA模块和每个化合物构建块顺序且交替组装。

28. 一种用于筛选化合物文库中具有期望特性的化合物的方法，所述方法包括：

(a) 提供多个珠粒，其中每个珠粒包括连接到珠粒表面的多个寡核苷酸和连接到所述珠粒表面的多个相关的化合物，并且其中连接到所述珠粒的所述寡核苷酸的序列编码连接到所述珠粒表面的所述多个相关的化合物的身份；

(b) 将所述多个珠粒结合在针对所述化合物文库中的化合物的期望特性的测定中；

(c) 捕获来自至少一个珠粒的信号，其中所述信号反映所述珠粒上的所述化合物在所述测定中的性能；

(d) 在不从所述珠粒去除所述寡核苷酸的情况下，对连接到测定信号也被捕获的所述至少一个珠粒的所述多个寡核苷酸进行测序；以及 (e) 由步骤 (d) 的测序读数鉴定至少一种化合物，并将所述化合物与步骤 (c) 的所述信号中捕获到的其对应测定性能相关。

29. 根据权利要求28所述的方法，其中每个珠粒包括不同的多个寡核苷酸和不同的多个相关的化合物。

30. 根据权利要求28所述的方法，其中所述多个寡核苷酸是多个DNA寡核苷酸。

31. 根据权利要求28所述的方法，其中所述多个相关的化合物中的每个化合物通过可切割连接子连接到所述珠粒表面。

32. 根据权利要求31所述的方法，其中所述可切割连接子是光可切割连接子、蛋白酶可切割连接子或酸可切割连接子。

33. 根据权利要求28到32中任一项所述的方法，其中所述化合物在步骤 (a) 之后并且在步骤 (d) 之前从所述珠粒表面切割。

34. 根据权利要求28到32中任一项所述的方法，其中反映所述化合物的所述期望特性的所述信号是荧光信号。

35. 根据权利要求28到32中任一项所述的方法，其中每个珠粒的尺寸介于 $1\mu\text{m}$ 与 $100\mu\text{m}$ 之间。

36. 根据权利要求35所述的方法，其中每个珠粒的尺寸介于 $1\mu\text{m}$ 与 $10\mu\text{m}$ 之间。

37. 根据权利要求36所述的方法，其中每个珠粒的尺寸为约 $3\mu\text{m}$ 。

38. 根据权利要求28到32中任一项所述的方法，其中所述方法进一步包括在多个潜在靶标中标识靶标候选物，并且其中具有所述期望特性的所述化合物与所述靶标候选物结合。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中步骤(b) 包括在所述多个潜在靶标中温育所述多个珠粒。

40. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述潜在靶标为蛋白质或核酸。

41. 根据权利要求28到32中任一项所述的方法, 其中所述测序通过以下执行: 单分子实时测序、离子半导体测序、焦磷酸测序、合成法测序、桥式扩增法测序、连接法测序、纳米孔测序、链终止测序、大规模平行标签测序、聚合酶克隆测序、heliscope单分子测序、鸟枪法测序、SOLiD测序、Illumina测序、隧穿电流DNA测序、杂交法测序、质谱测序、微流体桑格测序和寡核苷酸延伸测序。

42. 一种用于筛选化合物文库中具有期望特性的化合物的方法, 所述方法包括:

(a) 提供多个珠粒, 其中每个珠粒包括连接到珠粒表面的多个寡核苷酸和连接到所述珠粒表面的多个相关的化合物, 并且其中连接到所述珠粒的所述寡核苷酸的序列编码连接到所述珠粒表面的所述多个相关的化合物的合成历史;

(b) 将所述多个珠粒结合在针对所述化合物文库中的化合物的期望特性的测定中;

(c) 捕获来自至少一个珠粒的信号, 其中所述信号反映所述珠粒上的所述化合物在所述测定中的性能;

(d) 在不从所述珠粒去除所述寡核苷酸的情况下, 对连接到测定信号也被捕获的所述至少一个珠粒的所述多个寡核苷酸进行测序;

以及(e) 由步骤(d) 的测序读数鉴定至少一种化合物, 并将所述化合物与步骤(c) 的所述信号中捕获到的其对应测定性能相关。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述测定包括结合测定。

44. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述测定包括活性测定。

45. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述测定包括竞争性结合测定或竞争性抑制测定。

46. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述测定包括未拴系的化合物与其它测定试剂的相互作用, 其中所述未拴系的化合物是从所述珠粒表面释放的化合物。

47. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述化合物是通过切割将所述化合物与所述珠粒连接的可切割连接子来释放的。

48. 根据权利要求42到47中任一项所述的方法, 其中所述测定在多个有限体积中发生, 其中标称地, 每个有限体积分散一个珠粒。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述有限体积包括水性液滴。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述水性液滴悬浮在油介质或疏水性液体介质中。

51. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述有限体积包括皮可孔。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述皮可孔以规则阵列组织。

53. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述多个有限体积以规则阵列组织。

54. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述有限体积包括围绕所述珠粒的粘附性水性介质层, 其中所述珠粒悬浮在疏水性介质中。

55. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述测定试剂在对所述寡核苷酸进行测序之前洗去。

56. 根据权利要求42所述的方法,其中所述测序步骤(d)在所述测定步骤(b)之前执行。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述珠粒上的所述寡核苷酸在所述测序步骤之后但在所述测定步骤之前去除。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述寡核苷酸的所述去除包括酶消化、化学切割、热降解或物理剪切。

59. 根据权利要求43所述的方法,其中所述结合测定包括RNA分子与所述珠粒的结合。

60. 根据权利要求43所述的方法,其中来自所述珠粒的所述信号包括对所结合RNA分子进行的测序。

61. 根据权利要求43所述的方法,其中所述结合测定包括荧光标记的结合测定,其中与所述珠粒上的所述化合物结合的分子包括荧光团。

62. 根据权利要求43所述的方法,其中所述结合测定包括核酸标记的结合测定,其中与所述珠粒上的所述化合物结合的分子包括核酸标签,其中进一步地,来自所述测定的所述信号包括对连接到与所述珠粒上的所述化合物结合的所述分子的所述核酸标签进行的测序。

63. 根据权利要求42所述的方法,其中所述期望特性包含以下中的一项或多项:

(i) 抑制或刺激酶的催化活性,

(ii) 刺激Th1型免疫应答,其通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量,

(iii) 刺激Th2型免疫应答,其通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量,

(iv) 抑制Th1型免疫应答,其通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量,

(v) 抑制Th2型免疫应答,其通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量,

(vi) 刺激或抑制泛素介导的蛋白质降解,其通过经过纯化的蛋白质、通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量。

64. 一种用于筛选化合物文库中具有期望活性的化合物的系统,所述系统包括:

(a) 用于容纳多个化合物连接的寡核苷酸编码的珠粒的样品室;

(b) 所述样品室内的多个包封室,每个包封室标称地包括分散在测定介质中的单个珠粒,其中进一步地,所述测定介质包括试剂,所述试剂与所述珠粒上的所述化合物的相互作用被测定,从而产生可测量信号;

(c) 用于测量信号的检测器;

(d) 测序平台;以及

(e) 用于从用户接收一个或多个命令的用户接口。

65. 根据权利要求64所述的系统,其中所述包封室包括液滴。

66. 根据权利要求64所述的系统,其中所述包封室包括皮可孔。

67. 根据权利要求64所述的系统,其中进一步地,所述包封室包括测定试剂。

68. 根据权利要求64所述的系统,其中所述检测器包括光学检测器。

69. 根据权利要求64所述的系统,其中测序仪包括光学检测器。

70. 一种用于通过扰动来扰动细胞并用所述扰动的身份编码所述细胞的方法,所述方法包括:

(a) 提供珠粒结合的DNA编码的文库;

(b) 用所述珠粒结合的DNA编码的文库限制细胞,其中所述珠粒结合的DNA编码的文库

包括组合合成的化合物的一个或多个拷贝和编码核酸标签的一个或多个拷贝,其中所述化合物和编码核酸与珠粒连接,其中所述编码核酸编码所述化合物的身份,并且其中所述珠粒结合的DNA编码的文库和所述细胞限制在有限体积中;

(c) 使所述化合物从所述珠粒释放并将所述化合物在所述有限体积内与所述细胞一起温育;

(d) 任选地使所述编码核酸标签从所述珠粒释放;以及

(e) 使所述编码核酸标签与所述细胞连接,由此通过与所述细胞连接的所述编码核酸标签保留所述化合物的所述身份。

71. 一种用于扰动细胞、用扰动的身份编码所述细胞并测量所述细胞对所述扰动的应答的方法,所述方法包括:

(a) 使细胞与珠粒结合的DNA编码的文库在第一有限体积中接触,其中所述珠粒结合的DNA编码的文库包括组合合成的化合物的一个或多个拷贝和编码核酸标签的一个或多个拷贝,其中所述化合物和编码核酸与珠粒连接,并且其中所述编码核酸编码所述化合物的身份;

(b) 使所述文库中的所述化合物从珠粒释放并将所述文库中的所述化合物在所述第一有限体积内与所述细胞一起温育;

(c) 任选地使所述编码核酸标签在所述第一有限体积内从所述珠粒释放;

(d) 将所述编码核酸标签捕获到所述细胞的细胞表面,借此使所述细胞暴露于所述文库中的所述化合物,并且所暴露的所述化合物的所述身份捕获到所述细胞表面上;

(e) 使所述细胞从所述第一有限体积释放,其中所述编码核酸标签与所述细胞连接,并且所述编码核酸标签编码所述细胞所暴露的所述化合物的所述身份;

(f) 在第二有限体积中用应答检测珠粒捕获之前受扰动并且经过核酸标记的细胞,其中所述细胞暴露于裂解条件,所述裂解条件使所述细胞的细胞内容物暴露于应答捕获珠粒,其中所述应答捕获珠粒包括捕获探针,所述捕获探针捕获所述细胞内容物和编码所述之前受扰动并且经过核酸标记的细胞中的扰动的核酸标签;

(g) 在所述第二有限体积中将所述应答捕获珠粒与经过裂解的细胞一起温育,由此将细胞内容物和编码所述扰动的所述核酸标签两者捕获到所述应答捕获珠粒上;

(h) 任选地将所述细胞对所述扰动的应答转变为核酸信号,其中所述细胞对所述扰动的应答不是核酸信号;以及

(i) 对与所述应答捕获珠粒连接的所述核酸标签进行测序,由此使所述扰动的身份与所述细胞对所述扰动的应答相关。

72. 一种用于扰动细胞并捕获所述细胞对扰动的应答的方法,所述方法包括:

(a) 提供皮可孔阵列和功能化扰动珠粒文库,其中所述皮可孔能够容纳单个细胞和单个功能化扰动珠粒,其中每个功能化扰动珠粒包括不同的多个相同的可释放化合物和编码所述化合物的多个核苷酸条形码,其中所述核苷酸条形码是能够捕获所述细胞的细胞内容物的功能化条形码,其中细胞的所述细胞内容物包括对所述功能化扰动珠粒中含有的扰动的细胞应答;

(b) 将单个细胞捕获到所述皮可孔阵列的每个皮可孔中;

(c) 将单个功能化扰动珠粒捕获到含有单个细胞的所述皮可孔中;

(d) 使所述化合物从所述功能化扰动珠粒释放并将所述细胞与所释放化合物一起温育,其中皮可孔之间的所述化合物具有最小扩散;

(e) 裂解所述细胞以释放所述细胞内容物;

(f) 将所述细胞内容物的一种或多种组分捕获到所述功能化扰动珠粒上的功能化寡核苷酸上,其中所述捕获包括杂交和酶促延伸以将核苷酸条形码与所述细胞内容物的核酸元件组合,由此形成所述核苷酸条形码与所述细胞内容物的所述核酸元件的杂交体;以及

(g) 释放所述杂交体,从所述功能化扰动珠粒文库中收集所述杂交体,并对所述杂交体进行测序,由此将所述扰动与对所述扰动的细胞应答相关。

73. 一种用于筛选化合物的调节细胞或细胞组分的生物活性的能力的系统,所述系统包括:

a) 阵列,其包括多个有限体积,其中每个有限体积与其他有限体积分开;

b) 多个珠粒,其中每个珠粒适合于安置在每个有限体积中,其中每个珠粒包括多个相同的珠粒结合的化合物,其中所述珠粒结合的化合物通过可切割连接子与所述珠粒共价连接,使得所述化合物作为测定的一部分以可测量的剂量依赖性方式从所述珠粒释放;

c) 所述珠粒进一步包括多个相同的珠粒结合的DNA条形码,其 (i) 通过可切割连接子或 (ii) 通过不可切割连接子连接至所述珠粒,其中如果所述DNA条形码通过可切割连接子连接至所述珠粒,则所述可切割连接子与用于将所述珠粒结合的化合物连接到所述珠粒的可切割连接子正交,并且其中DNA条形码标识所述化合物。

寡核苷酸编码的化学文库

技术领域

[0001] 本公开涉及使用化合物文库的高通量筛选,其中化合物与珠粒结合或包含在珠粒中,每个珠粒含有一种化合物的多个拷贝,其中进一步地珠粒还含有编码包含在珠粒内或上的化合物的身份或合成历史的DNA标签。本公开还涉及在皮可孔中进行的高通量测定,其中皮可孔含有负载化合物的珠粒和测定材料。本公开进一步涉及释放珠粒结合的化合物并对其进行生物学活性进行筛选。广义地说,本公开设想了将珠粒用作化合物的递送媒介的测定,以及用于产生这种负载化合物的珠粒的方法。

[0002] 本公开涉及珠粒结合的化合物,其中每种化合物由一个或多个属于化学文库的单体制成。本公开还涉及珠粒结合的DNA条形码,即涉及核酸,其中每个核酸的序列是密码(与遗传密码无关),所述密码是指一种特定的化学文库单体。本公开进一步涉及释放珠粒结合的化合物,然后筛选释放的化合物的生物活性。

[0003] 本公开总体上还涉及用于用剂量控制的化合物扰动细胞或几个细胞,并且通过RNA和/或蛋白质分析来分析细胞状态变化的方法。出于高通量筛选、靶标发现或诊断以及其它类似应用的目的,本文公开的方法可以在单细胞水平或多个细胞上应用。

[0004] 相关申请的交叉引用

[0005] 本申请要求于2017年9月25日提交的美国临时专利申请序号62/562,905和同样于2017年9月25日提交的美国临时专利申请序号62/562,912的权益和优先权,所述美国临时专利申请的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0006] 例如,涉及拆分和合并化学的组合化学可以用于合成大量化合物。以这种方式制得的化合物用于药物化学领域,其中可针对各种生化活性筛选所述化合物。这些活性包含与一种或多种蛋白质的结合,其中在进行筛选测试时蛋白质是已知的。可替代地,仅在检测到结合事件后才标识由被测试的化合物结合的蛋白质。还可以筛选化合物抑制或激活已知蛋白质的活性(这不仅是筛选“结合”活性)。可替代地,可以筛选化合物抑制或激活细胞功能的活性,并且其中在筛选时分子靶标对研究人员来说是未知的。

[0007] 通过用成千上万的微孔、纳米孔或皮可孔进行阵列筛选,可以促进化合物的筛选,如属于通过拆分和合并方法制得的庞大化学文库的化合物。此外,可以通过以珠粒的形式向每个皮可孔提供不同的化合物来促进筛选,并且其中每个珠粒含有同一化合物的数百个拷贝,并且其中同一珠粒还含有“DNA条形码”的数百个拷贝,所述DNA条形码可以用于标识连接到同一珠粒的化合物。此外,使用可切割的连接子进一步促进化合物的筛选,其中可切割连接子允许化合物从珠粒中受控释放,并且其中然后将释放的化合物用于同一皮可孔中的生化测定或基于细胞的测定。

[0008] 例如,由于所需的测定试剂量少,因此在非常小的限定体积(如液滴、皮可孔或微流体环境)中测定化合物具有广泛的优势,因此不必限于组合产生的化合物。可以将化合物加载到珠粒上,也允许化合物在稍后的时间从珠粒上洗脱下来的任何方法,可以用于将珠

粒结合的化合物以较小的受限体积递送到测定中。将核酸条形码添加到珠粒使得能够将存在于珠粒中的化合物的身份携带到测定体积中。以这种方式,无需机器人或微量滴定板内化合物的空间索引即可执行非常高的通量测定。数百万到数十亿种化合物可以保存在一个小瓶中,所述化合物的身份标记在含有每种单独化合物的同一珠粒上(带有DNA)。

[0009] 药物发现的常用方法涉及选择感兴趣的靶标并且监测靶蛋白质或酶与大型化合物文库的相互作用。在许多情况下,发现大量初始命中物对身体有毒或与体内其它蛋白质发生交叉反应,这使得基于靶点的选择成为药物筛选的低效方法。对预选靶的需要也是固有的局限性,因为其要求疾病的生物性基础为人所知和理解。针对整个生物体筛选化合物是一项困难、昂贵且通量极低的任务。

[0010] 对细胞的常规表型筛选涉及建立患病状态细胞的模型,使细胞与各种药物文库接触,以及监测疾病表型是否通过可测量的测定得到纠正。此类筛选方法被称为表型筛选,因为一开始不一定了解潜在的生物学机制,但是指示治疗反应的可测量的表型变化被视为相关指标。如今,已经有大量反映各种基线和患病细胞状态的细胞系和疾病模型。也可以使用大量的化合物文库和候选生物药物。将不同的细胞模型与不同的候选药物相结合以寻找表型应答的明显筛选活动充满了技术局限性,因为测定仅限于微量滴定板格式和成像方式,这两种方法在通量上均受到严格限制。

[0011] 克服通量限制的一种方法是采用高通量单细胞筛选方法进行药物发现(参见例如Heath等人,《自然综述药物发现(Nat Rev Drug Discov.)》15:204-216,2016)。在这些方法中,将单个细胞分离并分离到可以对每个细胞进行单独测定的隔室中。通过单个细胞的mRNA测序进行基因组分析,例如使用液滴封装,是一种流行的方法,所述方法揭示了集成测量中隐藏的复杂细节(参见,例如Macosko等人,《细胞(Cell)》161:1202-1214,2015和Ziegenhain等人,《分子细胞(Mol Cell)》65:631-643,2017,其公开内容通过引用整体并入本文)。当前最先进的单细胞分析平台已使具有单细胞分辨率的mRNA转录物得以定量,从而基于其转录状态表征细胞和对细胞进行指纹采集。这种方法允许比较从受试者提取的或在实验中制备的组织样品之间的差异,并且检查单细胞转录,从而检查蛋白质的表达状态。通过转录组测序和剖析测量单细胞mRNA是重要的方法,不仅是研究疾病进展过程中细胞谱系表型的分子机制,而且是研究药物功效、耐药性和发现治疗靶点的分子机制(参见,例如Chu等人,《细胞生物学与毒理学(Cell Biol and Toxicol)》33:83-97,2017,Wang,《细胞生物学与毒理学》32:359-361,2016以及Wang等人,《细胞生物学与毒理学》33:423-427,2017)。单细胞RNA测序的应用已被用于限定细胞间异质性,由转录组细胞间变异证明,这与药物功效和特异性、转录随机性、转录组可塑性和基因组进化极为相关。还已经证明了皮可孔中的封装(参见例如Gierahn等人,《自然方法(Nat Methods)》14:395-398,2017)。使用类似的分离方法(Butnik等人,《生物预印本期刊(BioRxiv)》,2017年1月,Su等人,《蛋白质组学(Proteomics)》17:3-4,2017)也可以进行单细胞蛋白质测量。

[0012] 尽管高通量单细胞RNA测序(RNA-seq)方法(包含如Fluidigm C1、10X Genomics或1CellBio系统等自动化平台的商业化版本)迅速崛起,但是可以有效地将不同药物分配到不同细胞的方法的缺乏限制了单细胞RNA剖析在靶向不可知高通量药物筛选和靶标发现中的应用。在孔板内以不同扰动温育细胞或组织,然后进行单细胞分析和转录谱图之间的比较时,可以检测的药物数量受到板容量的限制。进一步地,从每个孤立的样品中制备条形码

化的mRNA,然后对每个样品进行全面的RNA谱剖析的需求也造成了主要瓶颈。

发明内容

[0013] 简而言之,本公开提供了一种用于筛选化合物的系统,所述系统包括:(a)皮可孔(picowell)阵列板,所述皮可孔阵列板包括多个皮可孔,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板由壁间隔开,并且其中所述壁位于所述顶部孔口与所述底板之间;(b)珠粒,所述珠粒安置在皮可孔中,其中所述珠粒包括多个基本上相同的珠粒结合的DNA条形码和多个基本上相同的珠粒结合的化合物;(c)其中所述珠粒包括采取级联DNA条形码或正交DNA条形码的形式的珠粒结合的DNA条形码,并且其中如果所述DNA条形码采取级联DNA条形码的形式,则所述级联DNA条形码通过使用以下中的一项或两项的方法制备:(i)使用点击化学,或(ii)使用重复步骤循环,其中所述重复步骤循环包括使用夹板寡核苷酸(splint oligonucleotide或splint oligo),所述夹板寡核苷酸能够与部分制成的珠粒结合的DNA条形码杂交,并且其中所述杂交通过所述夹板寡核苷酸上的退火位点以及所述部分制成的珠粒结合的DNA条形码中的对应的互补退火位点介导,其中退火的夹板寡核苷酸作为模板用于使用DNA聚合酶延伸所述部分制成的DNA条形码,并且其中所述夹板寡核苷酸含有与要和所述部分制成的DNA条形码聚合的DNA条形码模块互补的碱基,(d)其中所述多个基本上相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物包括一个或多个化学文库单体,并且其中每个珠粒结合的DNA条形码模块标识对应的化学文库单体,其中术语“化合物”用于指代包括一个或多个化学文库成员的完整的产物,并且其中完整的DNA条形码标识所述化合物。

[0014] 微孔、纳米孔或皮可孔的底板不必平坦。底板可以像玻璃试管或金属离心管的底部那样弯曲。另外,底板可以是锥形的,就像锥形离心管一样。底板可以是平坦的,但是具有凹口,例如,有利于位于皮可孔中的任何珠粒的底部附近的测定溶液或细胞培养液的运动凹口。在平坦底板的实施例中,本系统和方法可以需要平坦的底板。级联DNA条形码可以完全通过有机化学方法,例如通过点击化学来制成。另外,正交DNA条形码可以完全通过有机化学方法,例如包括点击化学来制成。

[0015] 还提供了上述系统,所述系统进一步包括多个盖,每个盖能够装配到不同的皮可孔的开口中,并且每个盖能够最小化或防止皮可孔内部的流体蒸发,并且每个都能够最小化或防止皮可孔内部流体泄漏。

[0016] 此外,所包含的是上述系统,其中所述级联DNA条形码由使用以下各项的方法制成:(i)点击化学和使用所述夹板寡核苷酸的所述重复步骤循环两者;(ii)点击化学和不是点击化学方法的化学方法两者;(iii)仅点击化学;或(iv)仅使用所述夹板寡核苷酸的所述重复步骤循环。对于该特定实施,所讨论的“级联DNA条形码”不包含用于将核酸直接偶联到珠粒的任何化学偶联剂。

[0017] 在球形盖的实施例中,提供了上述系统,所述系统进一步包括多个球形盖,其中每个盖能够装配到皮可孔的所述孔口中,其中所述孔口是圆形的,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的蒸发,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的泄漏。

[0018] 在应答元件的实施例中,提供了上述系统,其中安置在至少一个皮可孔中的至少

一个珠粒包括与所述至少一个珠粒偶联的至少一个应答捕获元件。另外,考虑了上述系统,其中安置在至少一个皮可孔中的所述至少一个珠粒包括与所述至少一个珠粒偶联的至少一个应答捕获元件,其中所述至少一个应答捕获元件包括:(a) poly (dT) 或 (b) 外显子靶向性RNA探针。

[0019] 还考虑了上述系统,其中所述DNA条形码是级联DNA条形码或正交DNA条形码,并且其中所述DNA条形码包括一个或多个DNA条形码模块,其中所述一个或多个DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块编码标识化学文库单体的信息,并且其中所述级联DNA条形码或所述正交DNA条形码进一步包括以下中的一项或两项:(a) 一个或多个功能性核酸;(b) 编码除化学文库单体的身份以外的类型的信息的一个或多个核酸。

[0020] 下面公开了“仅由...组成”实施例和“包括”实施例,因为其应用于构成DNA条形码的珠粒结合的DNA条形码模块的数量。提供了这样的实施例,其中DNA条形码仅由一个DNA条形码模块或仅两个DNA条形码模块组成,或仅含有三个DNA条形码模块或仅四个DNA条形码模块,依此类推,或者其中DNA条形码包括至少一个DNA条形码模块,或包括至少两个DNA条形码模块,或包括至少三个DNA条形码模块,或包括至少四个DNA条形码模块,依此类推,

[0021] 所包含的是一种系统,其中所述珠粒结合的级联DNA条形码包括:(i) 第一DNA条形码模块;或 (i) 第一DNA条形码模块、第一退火位点和第二DNA条形码模块;或 (ii) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点和第三DNA条形码模块;或 (iii) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点和第四DNA条形码模块;或 (iv) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点、第四DNA条形码模块、第四退火位点和第五DNA条形码模块;或 (v) 第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点、第四DNA条形码模块、第四退火位点、第五DNA条形码模块、第五退火位点和第六DNA条形码模块。

[0022] 此外,所考虑的是上述系统,所述系统进一步包括一个引物结合能够结合DNA测序引物的引物结合位点,其中所述引物结合位点是能够指导对第一DNA条形码模块、第二DNA条形码模块、第三DNA条形码模块、第四DNA条形码模块、第五DNA条形码模块或第六DNA条形码模块中的一个或多个进行的测序,并且其中所述引物结合位点位于第一DNA条形码模块的3'、第二DNA条形码模块的3'、第三DNA条形码模块的3'、第四DNA条形码模块的3'、第五DNA条形码模块的3'、或第六DNA条形码模块的3',或其中所述引物结合位点位于第一DNA条形码模块和第二DNA条形码模块之间,或位于第二DNA条形码模块和第三DNA条形码模块之间,或位于第三DNA条形码模块和第四DNA条形码模块之间,或位于第四DNA条形码模块和第五DNA条形码模块之间,或位于第五DNA条形码模块和第六DNA条形码模块之间。

[0023] 另外,提供了上述系统,其中所述引物结合位点位于第一DNA条形码模块和第二DNA条形码模块之间,或位于第二DNA条形码模块和第三DNA条形码模块之间,或位于第三DNA条形码模块和第四DNA条形码模块之间,或位于第四DNA条形码模块和第五DNA条形码模块之间,或位于第五DNA条形码模块和第六DNA条形码模块之间。在关于引物结合位点相对于上游DNA条形码模块和相对于下游DNA条形码模块的位置的实施例中,提供了上述系统,其中引物结合位点位于每个和每对连续的DNA条形码模块之间。

[0024] 此外,提供了上述系统,其中所述珠粒包括本身为正交DNA条形码的DNA条形码,其

中所述珠粒包括外表面,并且其中所述正交DNA条形码包括:(a)第一核酸,所述第一核酸包括第一DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第一核酸在第一位置处与所述珠粒偶联,(b)第二核酸,所述第二核酸包括第二DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第二核酸在第二位置处与所述珠粒偶联,以及(c)第三核酸,所述第三核酸包括第三DNA条形码模块和测序引物的退火位点,其中所述第二核酸在第三位置处与所述珠粒偶联,并且其中所述珠粒上的所述第一位置、所述第二位置和所述第三位置各自定位于所述珠粒的外表面上的不同位置处。

[0025] 在编码实施例中,提供了上述系统,其中DNA条形码包括一种或多种核酸,其不标识任何化学文库单体,而是标识:(a)与所述珠粒可切割连接的化合物的类别;(b)多步骤有机合成途径中的步骤;(c)所述珠粒结合的化合物合成的日期;(d)所述珠粒结合的化合物旨在治疗的疾病;(e)所述珠粒结合的化合物旨在刺激或抑制的细胞事件;或(f)用于使给定化学文库单体与所述珠粒偶联的反应条件。

[0026] 在连接子实施例中,提供了上述系统,其中多个基本上相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物通过可切割连接子偶联到珠粒。还提供了上述系统,其中多个基本上相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物通过光可切割连接子偶联到珠粒。还提供了上述系统,其中多个基本上相同的珠粒结合的化合物中的每个化合物通过非可切割连接子偶联到珠粒。

[0027] 在TentaGel®实施例中,提供了上述系统,其中至少一个珠粒包括由接枝有聚乙二醇(PEG)的低交联聚苯乙烯基质组成的接枝共聚物。

[0028] 在释放监测器实施例中,本公开提供了上述系统,其中至少一个皮可孔含有释放监测器珠粒,并且不含任何其它类型的珠粒,

[0029] 其中释放监测器珠粒包括珠粒结合的淬灭剂和珠粒结合的荧光团,其中将珠粒结合的淬灭剂淬灭地定位在珠粒结合的荧光团附近,并且能够淬灭至少50%(或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%,或至少95%,或至少99%,或至少99.5%,或至少99.9%)的珠粒结合的荧光团的荧光,并且其中珠粒结合的荧光团通过第一光可切割连接子结合,其中包含释放监测器珠粒的皮可孔是第一皮可孔,其中第一皮可孔含有第一溶液,其中暴露达到切割条件的第一皮可孔能够切断光可切割连接子,并将荧光团释放到第一皮可孔的第一溶液中,其中暴露导致荧光团扩散到第一皮可孔中的整个第一溶液中,并且其中通过在第一皮可孔(含有包括分散的荧光团的第一溶液)上照射光而获得的荧光信号允许用户使用荧光信号来计算珠粒结合的荧光团从释放监测器珠粒上的释放百分比,从而得到所计算的释放百分比的值,并且其中第二个皮可孔含有与第一个光可切割连接子类型相同的光可切割连接子偶联的珠粒结合的化合物,其中第二个皮可孔含有第二溶液,

[0030] 并且其中所计算的从第一皮可孔中的释放监测器珠粒的释放百分比的值允许计算第二皮可孔的第二溶液中的所释放的化合物的浓度。

[0031] 在与结合到给定珠粒的所有化合物的身份有关或与与给定珠粒结合的所有DNA条形码的身份有关的实施例中,提供了上述系统,其中至少一个珠粒包括多个基本上相同的珠粒结合的DNA条形码,其中所述多个是基本上相同的珠粒结合的DNA条形码的1000万到1亿个拷贝。还提供了上述系统,其中所述至少一个珠粒包括多个基本上相同的珠粒结合的化合物,其中所述多个是所述基本上相同的珠粒结合的化合物的1000万到1亿个拷贝。

[0032] 在与细胞(例如,哺乳动物细胞、癌细胞、细菌细胞)有关的实施例,提供了上述系统,其中至少一个皮可孔包括至少一个细胞,其中所述多个基本上相同的珠粒结合的化合物通过可切割连接子结合到所述至少一个珠粒,并且其中切割所述可切割连接子从所述珠粒释放珠粒结合的化合物以产生所释放的化合物,并且其中所释放的化合物能够与所述至少一个细胞接触。在其它细胞实施例中,提供了上述系统,其中至少一个皮可孔包括至少一个细胞,其中所述多个基本上相同的珠粒结合的化合物通过可切割连接子结合到所述至少一个珠粒,并且其中切割所述可切割连接子从所述珠粒释放珠粒结合的化合物以产生所释放的化合物,并且其中所释放的化合物能够与所述至少一个细胞接触,并且其中所述至少一个细胞为:(i)不是癌细胞的哺乳动物细胞,(ii)哺乳动物癌细胞,(iii)死亡的哺乳动物细胞,(iv)凋亡的哺乳动物细胞,(v)坏死的哺乳动物细胞,(vi)细菌细胞,(vii)疟原虫细胞,(viii)具有代谢活性但具有交联的基因组且无法进行细胞分裂的细胞,或(ix)被病毒感染的哺乳动物细胞。

[0033] 在装置实施例中,提供了上述系统,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板间隔开,并且其中在所述顶部孔口与所述底板之间存在壁,并且其中所述孔口是圆形的,其中所述底板是圆形的,并且其中所述壁采取截锥体的形式,并且所述孔口具有第一直径,所述底板具有第二直径,并且其中所述第一直径大于所述第二直径。

[0034] 在其它与装置有关的实施例中,提供了上述系统,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口、由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板间隔开,并且其中在所述顶部孔口与所述底板之间存在壁,并且其中所述孔口是圆形的,其中所述底板是圆形的,并且其中所述壁采取截锥体的形式,并且所述孔口具有第一直径,所述底板具有第二直径,并且其中所述第一直径大于所述第二直径,进一步包括进一步包括紧密装配到所述孔口中的盖,其中所述孔口由硬度计较大(较硬)的聚合物构成,并且其中所述盖由硬度计较小(较软)的聚合物制成,并且其中所述盖和所述孔口的相对硬度计允许所述盖可逆且紧密地装配到所述孔口中,并且其中所述盖为:(i)仅旨在塞住所述皮可孔并防止泄漏的盖,(ii)在所述皮可孔中培养细胞培养基中的细胞的情况下,本身为无源盖并且能够吸收细胞释放的代谢物的盖,(iii)本身为有源盖并且采取包括多个基本上相同的化合物的珠粒的形式的盖,并且其中所述多个基本上相同的化合物中的每个化合物通过可切割连接子与所述珠粒偶联;(iv)本身为有源盖并且采取包括多个相同试剂的珠粒的形式的盖,并且其中所述多个基本上相同的试剂中的每个试剂通过可切割连接子与所述珠粒偶联。还提供了上述系统,其中盖是球形的,或者其中盖是非球形的。

[0035] 在垫子实施例中,上述系统包括皮可孔阵列板,所述皮可孔阵列板包括大致平坦的上表面、多个皮可孔,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口,由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板由壁间隔开,并且其中所述壁位于所述顶部孔口与所述底板之间,并且任选地,安置在所述多个皮可孔中的至少一个皮可孔中的珠粒,其中所述珠粒包括多个基本上相同的与珠粒结合的DNA条形码和多个基本上相同的珠粒结合的化合物,其中所述皮可孔阵列板进一步包括垫子,所述垫能够牢固地覆盖处于所述多个皮可孔中至少一个皮可孔或全部的皮可孔的顶部处的所述开口,或者实际上覆盖处于所述多个皮可孔中至少一个皮可孔或全部皮可孔的顶部处的所述开口,其中所述

牢固地覆盖是可逆的,其中所述垫子任选地包括以下中的一项或全部:(a)吸收性表面,当所述吸收性表面被定位成与所述皮可孔阵列板的所述总体上平坦的上表面接触时,所述吸收性表面能够吸收可能由所述多个皮可孔中的一个或多个皮可孔所包括的任何代谢物、生物化学品或蛋白质,(b)粘性表面,所述粘性表面能够保持与所述皮可孔阵列板的所述总体上平坦的顶表面的可逆粘附。

[0036] 在生化测定实施例中,所包含的是上述系统,所述系统包含至少一个皮可孔,其中所述至少一个皮可孔包括包括多个基本上相同的化合物和多个基本上相同的条形码的珠粒,其中所述至少一个皮可孔包括测定培养基,培养基包含cereblon E3泛素连接酶、cereblon E3泛素连接酶的底物(如Ikaros或Aiolos),并且其中所述系统能够筛选激活cereblon E3泛素连接酶活性的化合物,从而能够降低细胞内Ikaros或Aiolos的浓度。

[0037] 在另一个生化测定实施例中,所考虑的是上述系统,所述系统包含至少一个皮可孔,其中所述至少一个皮可孔包括包括多个基本上相同的化合物和多个基本上相同的条形码的珠粒,其中所述至少一个皮可孔包括测定培养基,培养基包含MDM2 E3泛素连接酶、MDM2 E3泛素连接酶的底物(如p53),并且其中所述系统能够筛选激活MDM2 E3泛素连接酶活性的化合物,从而能够增加细胞内p53的浓度。

[0038] 在更多条形码实施例中,提供了上述系统,其中DNA条形码包括一种或多种核酸,其不编码任何化学文库单体,而是标识以下中的一项或多项:(a)与所述珠粒可切割连接的化合物的类别;(b)多步骤有机合成途径中的步骤,其中珠粒结合的核酸对应于用于制备珠粒结合的化合物的给定化学单体,并且其中对应于给定化学单体的所述珠粒结合的核酸标识所述化学单体;(c)所述珠粒结合的化合物合成的日期;(d)所述珠粒结合的化合物旨在治疗的疾病;(e)所述珠粒结合的化合物旨在刺激或抑制的细胞事件。

[0039] 在缺乏任何头片的实施例中,提供了上述系统,其中所述至少一个珠粒包括多个基本上相同的珠粒结合的化合物,并且还包括多个基本上相同的珠粒结合的DNA条形码,并且其中不存在将所述珠粒结合的化合物中的任何化合物与所述珠粒结合的DNA条形码中的任何DNA条形码连接的任何头片。

[0040] 此外,所考虑的是上述系统,其中至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%的基本上相同的珠粒结合的DNA条形码具有相同的结构。另外,所考虑的是上述系统,其中至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%的基本上相同的珠粒结合的化合物具有相同的结构。

[0041] 此外,所供应的是上述系统,其中级联DNA条形码包括至少一个本身为DNA条形码模块的核酸,或者上述系统,其中,级联DNA条形码仅包括了一个本身为DNA条形码模块的核酸。

[0042] 在测序引物退火位点的实施例中,提供了上述系统,其中所述级联DNA条形码包括本身为DNA条形码模块的至少一个核酸以及至少一个功能性核酸,所述至少一个功能性核酸:(a)能够用作测序引物的退火位点,(b)能够形成发夹结构,并且其中所述发夹结构包括测序引物、所述测序引物的退火位点和所述发夹结构中的弯曲,其中所述弯曲在所述测序引物的5'并且在所述测序引物的所述退火位点的3',或(c)为间隔区核酸。

[0043] 在其它测序引物实施例中,提供了上述系统,其中所述正交DNA条形码含有多个DNA条形码模块,其中所述DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块与所述珠粒上的不同位

点直接偶联或通过连接子与所述珠粒上的不同位点偶联,并且其中所述多个DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块含有至少一个功能性核酸,所述至少一个功能性核酸:(a)能够用作测序引物的退火位点,(b)能够形成发夹结构,并且其中所述发夹结构包括测序引物、所述测序引物的退火位点和所述发夹结构中的弯曲,其中所述弯曲在所述测序引物的5'并且在所述测序引物的所述退火位点的3',或(c)为间隔区核酸。

[0044] 在列举关于夹板寡核苷酸的功能化语言的实施例中,提供了包括级联DNA条形码的珠粒,其中所述级联DNA条形码包括:(a)第一DNA条形码模块和第一夹板寡核苷酸的第一退火位点,其中夹板寡核苷酸包括三种核酸,其中所述三种核酸为:本身为第一退火位点的杂交补体的核酸、本身为第二DNA条形码模块的杂交补体的核酸以及本身为第二退火位点的核酸,以及(b)第二DNA条形码模块和第二夹板寡核苷酸的第二退火位点,其中第二夹板寡核苷酸包括三种核酸,其中所述三种核酸为:本身为第二退火位点的杂交补体的核酸,本身为第三DNA条形码模块的核酸和本身为第三退火位点的核酸。

[0045] 在含有与夹板寡核苷酸有关的功能化语言的另一个实施例中,提供了上述珠粒,其进一步包括:第三DNA条形码模块和第三夹板寡核苷酸的第三退火位点,其中第三夹板寡核苷酸包括三种核酸,其中所述三种核酸为:本身为第三退火位点的杂交补体的核酸,本身为第四DNA条形码模块的核酸和本身为第四退火位点的核酸。

[0046] 此外,在含有与夹板寡核苷酸有关的功能化语言的又一个实施例中,提供了上述珠粒,其进一步包括以下中的一项或多项:(i)第四DNA条形码模块和第四夹板寡核苷酸的第四退火位点,其中第四夹板寡核苷酸包括三种核酸,其中所述三种核酸为:本身为第四退火位点的杂交补体的核酸,本身为第五DNA条形码模块的核酸和本身为第五退火位点的核酸,(ii)应答捕获元件,(iii)释放监测器。

[0047] 在连接子实施例中,所包含的是上述珠粒,其中级联DNA条形码与珠粒偶联,但是:(i)未通过任何光可切割连接子与珠粒偶联,(ii)未通过任何酶可切割连接子与珠粒偶联;或(iii)未通过任何类型的可切割连接子与珠粒偶联。

[0048] 在涉及不同偶联位置的实施例中,提供了上述珠粒,其中级联DNA条形码偶联到珠粒上的第一位置,其中珠粒还包括偶联到珠粒上第二位置的化合物,并且其中第一位置与第二位置不同。

[0049] 在表面实施例(内表面和外表面)中,提供了上述珠粒,其中珠粒包括外表面和内表面,其中珠粒包括至少10,000个基本上相同的级联DNA条形码,所述条形码与珠粒偶联,并且其中所述至少10,000个基本上相同的级联DNA条形码中的至少90%偶联到外表面。

[0050] 在可以使本公开与其它实施例区别的排他性实施例中,提供了上述珠粒,其不包括任何聚丙烯酰胺,并且其中级联DNA条形码:(i)不包含任何本身为启动子的核酸;(ii)不包含任何本身为polyA的核酸;或(iii)不包含任何本身为启动子的核酸并且不包含任何本身为polyA的核酸。

[0051] 在释放监测器珠粒实施例中,本公开供应了能够在水性介质中起作用的释放监测器珠粒,其中释放监测器珠粒包括珠粒结合的淬灭剂和珠粒结合的荧光团,其中将珠粒结合的淬灭剂淬灭地定位在珠粒结合的荧光团附近,并且能够淬灭至少50%的珠粒结合的荧光团的荧光,并且其中珠粒结合的荧光团通过第一光可切割连接子结合,其中包含释放监测器珠粒的皮可孔是第一皮可孔,其中第一皮可孔含有第一溶液,其中暴露达到切割条件

的第一皮可孔能够切断光可切割连接子,并将荧光团释放到第一皮可孔的第一溶液中,其中暴露导致荧光团扩散到第一皮可孔中的整个第一溶液中,并且其中通过在第一皮可孔(含有包括分散的荧光团的第一溶液)上照射光而获得的荧光信号允许用户使用荧光信号来计算珠粒结合的荧光团从释放监测器珠粒上的释放百分比,从而得到所计算的释放百分比的值,并且其中第二个皮可孔含有与第一个光可切割连接子类型相同的光可切割连接子偶联的珠粒结合的化合物,并且其中第二个皮可孔含有第二溶液,并且其中所计算的从第一皮可孔中的释放监测器珠粒的释放百分比的值允许计算第二皮可孔的第二溶液中的所释放的化合物的浓度。在其它释放监测器的实施例中,提供了释放监测器珠粒(其中荧光团是TAMRA并且淬灭剂是QSY7)、具有图9所示结构的释放监测器珠粒、有图10所示结构的释放监测器珠粒和释放监测器珠粒,其中淬灭能力为至少90%、至少98%、至少99%或至少99.9%。

[0052] 在制造方法的实施例中,所包含的是用于合成释放监测器珠粒的方法,其中释放监测器珠粒包括珠粒、淬灭剂、荧光团和将所述荧光团偶联到珠粒的光可切割连接子,所述方法包括按此顺序的以下各项:(i)提供树脂,(ii)将赖氨酸连接子偶联到树脂上,其中含有赖氨酸连接子的试剂是L-Fmoc-Lys(4-甲基三苯甲基)-OH,(iii)去除Fmoc保护基团,(iv)使用本身为淬灭剂-N-羟基琥珀酰亚胺(淬灭剂-NHS)的试剂作为淬灭剂的来源来偶联淬灭剂,(v)使用包括三氟乙酸的试剂去除4-甲基三苯甲基保护基,(vi)将光可切割连接子偶联到赖氨酸的 ϵ 氨基上,其中所述光可切割连接子由试剂(即Fmoc-光可切割连接子-OH)提供,(vii)偶联荧光团。还提供了上述实施例,但是与步骤的顺序无关。在其它方法实施例中,提供了上述方法,其中荧光团是TAMRA,并且其中淬灭剂是QSY7。

[0053] 在与释放监测器珠粒的用途有关的方法中,提供了用于控制存在于皮可孔中的溶液中的化合物的浓度的方法,其中所述方法应用于皮可孔中的珠粒结合的化合物,其中所述皮可孔含有溶液,并且其中所述珠粒结合的化合物通过可切割连接子与所述珠粒偶联,所述方法包括:(a)将所述珠粒结合的化合物暴露于实现所述可切割连接子的切割的条件,并且使所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以生成所释放化合物,其中在释放之后,所述所释放化合物扩散或分散在所述溶液中,从而产生在所述溶液中的所述化合物的基本上均匀浓度,(b)其中条件包括能够切割可切割连接子的光,(c)调节条件以产生基本上均匀的浓度的所确定的浓度,以及(d)其中所确定的浓度是关于由珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度而确定的。还提供了上述方法,其中所述条件是通过调节光的波长、光的强度和曝光的持续时间中的一个或多个来调节的,以及上述方法,其中从珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度是在实现所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以产生所释放化合物的同时确定的,以及上述方法,其中从珠粒结合的释放监测器释放的所释放荧光团的浓度是在实现所述珠粒结合的化合物从所述珠粒释放以产生所释放化合物之前很久的时间点确定的。

[0054] 术语“确定的”可以意指在将珠粒暴露于光之前被预定并决定为期望浓度的浓度。另外,术语“确定的”可以意指“实时”决定的浓度,即,与使珠粒暴露于光的同时决定的浓度。

[0055] 在盖实施例中,所包含的是与皮可孔板(包括多个皮可孔)组合的盖,其中盖能够与包括多个皮可孔的皮可孔板一起使用,其中多个皮可孔中的每个皮可孔是可由孔口、底

板和壁限定的,其中壁由顶部上的所述孔口和底部上的底限定,并且其中所述孔口是圆形的,其中底板是圆形的,并且其中壁采取截锥体形表面的形式,并且其中所述孔口具有第一直径,底板具有第二直径,并且其中第一直径大于第二直径,

[0056] 其中所述盖是能够紧密装配到所述孔口中的球形盖,其中所述孔口由硬度计较大(较硬)的聚合物构成,并且所述盖由硬度计较小(较软)的聚合物制成,并且其中所述盖和所述孔口的相对硬度计允许所述球形盖可逆且紧密地装配到所述孔口中,并且其中所述盖:(i)能够塞住所述皮可孔并防止泄漏,(ii)作为无源盖并且在所述皮可孔中培养细胞培养基中的细胞的情况下能够吸收细胞释放的代谢物,(iii)作为采取包括多个基本上相同的化合物的珠粒形式的有源盖,并且其中所述多个基本上相同的化合物中的每个化合物通过可切割连接子偶联到所述珠粒,并且其中所述可切割连接子的切割从所述珠粒中释放出所述多个化合物中的至少一些,(iv)采取包括多个基本上相同的试剂的珠粒的形式是有源盖,并且其中所述多个基本上相同的试剂中的每个试剂通过可切割连接子偶联到珠粒,并且其中可切割连接子的切割从珠粒中释放所述多个试剂中的至少一些。

[0057] 在多孔盖实施例中,提供了与皮可孔板和固体聚合物涂层结合的多个多孔盖,其中所述多个多孔盖中的每个包括上表面和下表面,其中皮可孔板包括多个皮可孔,其中至少一个多孔盖与皮可孔接触并且可逆地紧密贴合在皮可孔中,其中皮可孔板和多个多孔盖的每个上表面覆盖有固体聚合物涂层,其中固体聚合物涂层接触每个盖的至少一些上表面并连接到所述至少一些上表面,并且其中,(i)所述多个皮可孔中的每个皮可孔能够容纳水溶液,其中反应的产物在溶液中产生,并且其中至少一些产物被所述多个多孔盖中的每个的下表面吸收,(ii)其中将能够聚合的可聚合试剂的溶液与皮可孔板一起倒在所述多个多孔盖上,并且其中使可聚合试剂聚合以形成基本上平坦的表面,所述表面基本上覆盖皮可孔板的所有顶表面,从而将聚合试剂固定到所述多个多孔盖中的每个多孔盖上,以及(iii)所述多个多孔盖中的所有可通过从多个皮可孔中剥离的动作而移除,其中保持了所述多个多孔盖和聚合试剂之间的粘附力,从而导致一系列粘附盖,部分地,每个盖的上表面部分嵌入聚合试剂中,并且每个盖的下表面可用于分析任何吸收的反应产物。

[0058] 这提供了用于使用夹板寡核苷酸来指导DNA条形码的酶促合成的制造方法实施例。提供了用于制备珠粒结合的级联DNA条形码的方法,其中珠粒结合的级联DNA条形码包括多个DNA条形码模块,以及任选地一个或多个功能性核酸,以及任选地一个或多个身份编码核酸,所述核酸对化学文库单体的身份以外的身份进行编码,所述方法包括:(a)向珠粒提供包括第一DNA条形码模块和第一退火位点的偶联多核苷酸的步骤,其中第一退火位点能够与第一夹板寡核苷酸杂交,第一夹板寡核苷酸能够用作DNA聚合酶的模板以催化到偶联的多核苷酸的聚合,与杂交的第一夹板寡核苷酸互补的核苷酸,其中聚合后的聚合的核苷酸(与杂交的第一夹板寡核苷酸互补)包括珠粒结合的第二DNA条形码模块和第二退火位点;(b)向珠粒提供具有所述第一寡核苷酸的偶联的多核苷酸,并且使允许所述第一夹板寡核苷酸与所述偶联的多核苷酸杂交的步骤;(c)添加DNA聚合酶和三磷酸脱氧核苷酸(dNTP),并且允许DNA聚合酶催化dNTP到偶联的多核苷酸的聚合的步骤,其中偶联的多核苷酸具有游离的3'端,并且其中聚合是在游离的3'端,(d)洗去第一夹板寡核苷酸的步骤。还考虑的是上述方法,其中第一夹板寡核苷酸包括第一退火位点、第二DNA条形码模块和第二退火位点。

[0059] 在进一步的制造方法实施例中,提供了上述方法,其中第一夹板寡包括第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点和对第一测序引物退火位点进行编码的核酸,其中第一个测序引物退火位点能够与测序引物杂交,产生杂交的测序引物,并且其中杂交的测序引物能够指导对第二DNA条形码模块和第一DNA条形码模块进行的测序。

[0060] 此外,所考虑的是上述方法,其中第一夹板寡核苷酸、DNA聚合酶和dNTP全部同时添加,或者其中第一夹板寡核苷酸、DNA聚合酶和dNTP各自分别添加。

[0061] 关于珠粒上的内部位置与外部位置,提供了上述方法,其中珠粒包括外部位置和内部位置,并且其中珠粒结合的级联DNA条形码在基本上位于珠粒外部的的位置处偶联到珠粒并且很少在珠粒内部位置处偶联到珠粒,并且其中珠粒还包括多个偶联的化合物,其中当彼此比较时,所有多个偶联的化合物均具有基本上相同的结构,并且其中珠粒基本上由疏水性聚合物组成。

[0062] 在进一步的方法实施例中,提供了上述方法,所述方法进一步包括:(a)向珠粒提供包括第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码和第二退火位点的偶联的第一较长多核苷酸的步骤,其中第二退火位点能够与第二夹板寡核苷酸杂交,第二夹板寡核苷酸能够用作DNA聚合酶的模板以催化到偶联的第一较长多核苷酸的聚合,与杂交的第二夹板寡核苷酸互补的核苷酸,其中聚合后的聚合的核苷酸(与杂交的第二夹板寡核苷酸互补)包括珠粒结合的第三DNA条形码模块和第三退火位点;(b)向珠粒提供具有所述第二寡核苷酸的偶联多核苷酸,并且允许所述第二寡核苷酸与所述偶联的第一较长多核苷酸杂交的步骤;(c)添加DNA聚合酶和三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)并且允许DNA聚合酶催化所述dNTP到偶联的较长多核苷酸的聚合的步骤,其中偶联的较长多核苷酸具有游离的3'端,并且其中聚合是在游离的3'端,(d)洗去第二夹板寡核苷酸的步骤。

[0063] 这涉及用于制造整个DNA条形码的连续编号的第一DNA条形码模块、第二DNA条形码模块、第三DNA条形码模块等。这也涉及在整个DNA条形码的制造中一遍又一遍地重复方法步骤的循环。提供了上述方法,其中所述多个DNA条形码模块中的每个由数字标识或命名,所述方法进一步包括重复列举的步骤,其中对于第一重复,通过在现有名称上添加一个数字来增加DNA条形码模块的名称,通过在现有名称上添加一个数字来增加退火位点的名称,通过在现有远端DNA条形码模块的名称上增加一个数字来增加夹板寡核苷酸的名称,并且通过在现有名称上添加一个数字来更改“第一较长多核苷酸”的名称,其中所述包括重复列举的步骤是一次重复,或两次重复,或三次重复,或四次重复,或五次重复,或五次以上的重复,或十次以上的重复。

[0064] 还考虑了的是上述方法,其包括多个夹板寡核苷酸,其中每个夹板寡核苷酸包括测序引物退火位点,其中测序引物退火位点能够与测序引物杂交,从而产生杂交的测序引物,并且其中杂交的测序引物能够指导对至少一个珠粒结合的DNA条形码模块和至少一个珠粒结合的DNA条形码模块进行的测序。

[0065] 这涉及与夹板寡核苷酸有关的实施例,其指导DNA聚合酶合成功能性核酸和各种类型的信息性核酸。提供了上述方法,其中至少一个夹板寡核苷酸包括功能性核酸,或者其中至少一个夹板寡核苷酸对除化学文库单体上的信息以外的信息进行编码。提供了上述方法,其进一步包括通过点击化学法偶联至少一个DNA条形码模块的步骤,其中所述步骤不使用任何夹板寡核苷酸。

[0066] 简而言之,本公开提供了一种用于筛选化合物的系统,所述系统包括:(a)皮可孔阵列板,所述皮可孔阵列板包括多个皮可孔,其中每个皮可孔具有限定处于所述皮可孔的顶部处的开口的顶部孔口,由底板限定的底部,其中所述顶部孔口与所述底板间隔开,并且其中壁位于所述顶部孔口与所述底板之间;(b)至少一个珠粒,所述珠粒安置在至少一个皮可孔中,其中所述至少一个珠粒包括多个基本上相同的珠粒结合的DNA条形码和多个基本上相同的珠粒结合的化合物;(c)其中所述至少一个珠粒包括DNA条形码,所述DNA条形码采取级联DNA条形码或正交DNA条形码的形式,并且其中,如果所述DNA条形码采取级联DNA条形码的形式,所述级联DNA条形码是由使用以下中的一项或两项的方法制成:(i)使用点击化学,或(ii)使用重复步骤循环,其中重复循环中的步骤包括使用夹板寡核苷酸退火到部分制备的DNA条形码,其中退火的夹板寡核苷酸用作模板,以使用DNA聚合酶扩展部分制作的DNA条形码,并且其中夹板寡核苷酸含有与DNA条形码模块互补的碱基,所述DNA条形码模块要聚合到部分制备的DNA条形码。

[0067] 在另一方面,提供了是上述系统,其中DNA条形码包括:(a)一个或多个DNA条形码模块,其中所述一个或多个DNA条形码模块中的每个DNA条形码模块编码模块对有关化学文库单体身份的信息,以及(b)任选地一种或多种功能性核酸,以及(c)任选地对除化学文库单体的所述身份以外的类型的信息进行编码的一种或多种核酸。

[0068] 此外,所提供的是上述系统,所述系统进一步包括多个盖,每个盖能够装配到不同的皮可孔的开口中,并且每个盖能够最小化或防止皮可孔内部的流体蒸发,并且每个都能够最小化或防止皮可孔内部流体泄漏。

[0069] 还包含的是上述系统,所述系统进一步包括多个球形盖,其中每个盖能够装配到皮可孔的所述孔口中,其中所述孔口是圆形的,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的蒸发,并且每个盖能够最小化或防止所述皮可孔内部的流体的泄漏。

[0070] 还考虑的是上述系统,其中如果至少一个珠粒包括采取级联DNA条形码形式的DNA条形码,则级联DNA条形码包括:(i)测序引物结合位点,(ii)第一DNA条形码模块,(iii)能够与第一寡核苷酸夹板杂交的第一退火位点,其中第一寡核苷酸夹板能够用于指导第二DNA条形码模块的酶促合成,(iv)第二DNA条形码模块,(v)第二退火位点,所述第二退火位点能够与第二寡核苷酸夹板杂交,其中所述第二寡核苷酸夹板能够用于指导第三DNA条形码的合成,(vi)第三DNA条形码模块,(vii)第三退火位点,所述第三退火位点能够与第三寡核苷酸夹板杂交,其中所述第三寡核苷酸夹板能够用于合成第四DNA条形码。

[0071] 在方法实施例中,提供了一种用于筛选化合物文库中具有期望特性的化合物的方法,所述方法包括:(a)提供多个珠粒,其中每个珠粒包括连接到珠粒表面的多个寡核苷酸和连接到所述珠粒表面的多个基本上相关的化合物,并且其中连接到所述珠粒的所述寡核苷酸的序列编码连接到所述珠粒表面的所述多个基本上相关的化合物的合成历史;(b)将所述多个珠粒结合在针对所述化合物文库中的化合物的期望特性的测定中;(c)捕获来自至少一个珠粒的信号,其中所述信号反映所述珠粒上的所述化合物在所述测定中的性能;(d)在不从所述珠粒去除所述寡核苷酸的情况下,对连接到测定信号也被捕获的所述至少一个珠粒的所述多个寡核苷酸进行测序;以及(e)由步骤(d)的测序读数鉴定至少一种化合物,并将所述化合物与步骤(c)的所述信号中捕获到的其对应测定性能相关。

[0072] 更详细地,所包含的是上述方法,其中所述测定包括结合测定,或者其中所述测定

包括活性测定,或者其中所述测定包括竞争性结合测定或竞争抑制测定,或者其中所述测定包括未栓系的化合物与其它测定试剂的相互作用,其中所述未栓系的化合物是从所述珠粒表面释放的化合物,或者其中所述化合物是通过切割将所述化合物与所述珠粒连接的可切割连接子来释放的,或者其中所述测定在多个有限体积中发生,其中标称地,每个有限体积分散一个珠粒。

[0073] 在另一方面,进一步考虑的是上述方法,其中有限体积包括水性液滴,或者

[0074] 其中所述水性液滴悬浮在油介质或疏水性液体介质中,或其中所述有限体积包括皮可孔,或其中所述皮可孔以规则阵列组织,或其中所述多个有限体积以规则阵列组织。

[0075] 此外,进一步包含的是上述方法,其中所述密闭体积包括围绕所述珠粒的粘附性水性介质层,其中所述珠粒悬浮在疏水性介质中,以及上述方法,其中所述测定试剂在对所述寡核苷酸进行测序之前洗去。以及上述方法,其中所述测序步骤(d)在所述测定步骤(b)之前进行。还提供了上述方法,其中所述珠粒上的所述寡核苷酸在所述测序步骤之后但在所述测定步骤之前去除。此外,进一步考虑的是上述方法,其中所述寡核苷酸的去除包括酶消化、化学切割、热降解或物理剪切,以及上述方法,其中所述结合测定包括将RNA分子与所述珠粒的结合,以及上述方法,其中来自所述珠粒的所述信号包括对所述所结合的RNA分子进行的测序。

[0076] 在又另一个方面,提供了上述方法,其中所述结合测定包括荧光标记的结合测定,其中与所述珠粒上的所述化合物结合的分子包括荧光团,或者上述方法,其中所述结合测定包括核酸标记的结合测定,其中与所述珠粒上的所述化合物结合的分子包括核酸标签,其中进一步地,来自所述测定的所述信号包括对连接到与所述珠粒上的所述化合物结合的所述分子的所述核酸标签进行的测序。

[0077] 在与特性有关的又一方法实施例中,提供了上述方法,其中期望特性包含以下中的一项或多项:(i)抑制或刺激酶的催化活性,(ii)刺激Th1型免疫应答,如能够基于细胞的测定或通过体内测定来测量的,(iii)刺激Th2型免疫应答,如能够基于细胞的测定或通过体内测定来测量的,(iv)抑制Th1型免疫应答,如能够基于细胞的测定或通过体内测定来测量的,(v)抑制Th2型免疫应答,如能够基于细胞的测定或通过体内测定来测量的,(vi)刺激或抑制泛素介导的蛋白质降解,如能够通过经过纯化的蛋白质、通过基于细胞的测定或通过体内测定来测量的。

[0078] 在系统实施例中,提供了用于筛选化合物文库中具有期望活性的化合物的系统,所述系统包括:(a)用于容纳多个化合物连接的寡核苷酸编码的珠粒的样品室;(b)所述样品室内的多个包封室,每个包封室标称地包括分散在测定介质中的单个珠粒,其中进一步地,所述测定介质包括试剂,所述试剂与所述珠粒上的化合物的相互作用被测定,从而产生可测量信号;(c)用于测量信号的检测器;(d)测序平台;以及(e)用于从用户接收一个或多个命令的用户接口。还提供了上述系统,其中所述包封室包括液滴。在另一方面,提供了上述系统,其中所述包封室包括皮可孔,或者其中进一步地,所述包封室包括测定试剂,或者其中所述检测器包括光学检测器,或者其中所述测序仪包括光学检测器。

[0079] 在一方面,本公开的特征在于一种用于通过以下方式扰动细胞的方法:(a)提供核酸编码的扰动并用所述核酸编码的扰动限制细胞;(b)使所述细胞在有限体积中与所述核酸编码的扰动接触,其中扰动起始和剂量是受控的;(c)将所述细胞与所述核酸编码的扰动

一起温育,持续指定时间段;(d)将编码所述核酸编码的扰动的核酸转移到所述细胞。

[0080] 在该方面的一些实施例中,所述核酸编码的扰动是核酸编码的化合物或药物分子。在一些实施例中,所述核酸编码的扰动是DNA编码的文库。

[0081] 在一些实施例中,所述扰动和编码所述扰动的所述核酸是未连接的并且在溶液中游离。在一些实施例中,所述扰动和编码所述扰动的所述核酸彼此连接。在一些实施例中,所述扰动和编码所述扰动的所述核酸连接到同一基底但不彼此连接。在一些实施例中,所述扰动与所述基底的连接以及所述核酸与所述基底的连接是可切割的连接。在特定实施例中,所述可切割的连接选自由以下组成的组:光可切割连接、温度可切割连接、pH敏感连接、酸可切割连接、碱可切割连接、声音可切割连接、盐可切割连接、氧化还原敏感连接或物理上可切割连接。

[0082] 在本公开的该方面的一些实施例中,限制所述细胞和所述扰动包括液滴包封、乳剂包封、皮可孔包封、宏孔包封、物理连接、气泡包封或微流体制限制。

[0083] 在一些实施例中,对所述扰动的控制包括控制光暴露、控制温度暴露、控制pH暴露、控制时间暴露、控制声音暴露、控制盐暴露、控制化学或物理氧化还原电势或控制机械搅拌暴露。

[0084] 在特定实施例中,所述温育包括在从所述基底切割所述扰动之后或在从所述基底切割所述核酸之后将所述细胞暴露于所述扰动。在一些实施例中,所述温育包括在不从所述基底切割所述扰动或不从所述扰动切割所述核酸的情况下将所述细胞暴露于所述扰动。

[0085] 在一些实施例中,将编码所述核酸编码的扰动的所述核酸转移到所述细胞包括使所述核酸与所述细胞的细胞表面连接。在特定实施例中,使所述核酸与所述细胞的所述细胞表面连接包括将所述核酸插入到细胞膜中。在特定实施例中,使所述核酸与所述细胞的所述细胞表面连接包括使所述核酸与所述细胞表面上的生物分子连接。在特定实施例中,所述生物分子是蛋白质或碳水化合物。在其它实施例中,使所述核酸与所述细胞的所述细胞表面连接包括通过所述核酸上的任选标签进行连接。

[0086] 在另一方面,一种用于通过扰动来扰动细胞并用所述扰动的身份编码所述细胞的方法。所述方法包含:(a)提供珠粒结合的DNA编码的文库;(b)用所述珠粒结合的DNA编码的文库限制细胞,其中所述珠粒结合的DNA编码的文库包括组合合成的化合物的一个或多个拷贝和编码核酸标签的一个或多个拷贝,其中所述化合物和编码核酸与珠粒连接,其中所述编码核酸编码所述化合物的身份,并且其中所述珠粒结合的DNA编码的文库和所述细胞限制在有限体积中;(c)使所述化合物从所述珠粒释放并将所述化合物在所述有限体积内与所述细胞一起温育;(d)任选地使所述编码核酸标签从所述珠粒释放;以及(e)使所述编码核酸标签与所述细胞连接,由此通过与所述细胞连接的所述编码核酸标签保留所述化合物的所述身份。

[0087] 在又另一方面,本公开的特征在于一种用于扰动细胞、用扰动的身份编码所述细胞并测量所述细胞对所述扰动的应答的方法。所述方法包含:(a)使细胞与珠粒结合的DNA编码的文库在第一有限体积中接触,其中所述珠粒结合的DNA编码的文库包括组合合成的化合物的一个或多个拷贝和编码核酸标签的一个或多个拷贝,其中所述化合物和编码核酸与珠粒连接,并且其中所述编码核酸编码所述化合物的身份;(b)使所述文库中的所述化合物从珠粒释放并将所述文库中的所述化合物在所述第一有限体积内与所述细胞一起温育;

(c) 任选地使所述编码核酸标签在所述第一有限体积内从所述珠粒释放；(d) 将所述编码核酸标签捕获到所述细胞的细胞表面，借此使所述细胞暴露于所述文库中的所述化合物，并且所暴露的所述化合物的所述身份捕获到所述细胞表面上；(e) 使所述细胞从所述第一有限体积释放，其中所述编码核酸标签与所述细胞连接，并且所述编码核酸标签编码所述细胞所暴露的所述化合物的所述身份；(f) 在第二有限体积中用应答检测珠粒捕获之前受扰动并且经过核酸标记的细胞，其中所述细胞暴露于裂解条件，所述裂解条件使所述细胞的细胞内容物暴露于应答捕获珠粒，其中所述应答捕获珠粒包括捕获探针，所述捕获探针捕获所述细胞内容物和编码所述之前受扰动并且经过核酸标记的细胞中的扰动的核酸标签；(g) 在所述第二有限体积中将所述应答捕获珠粒与经过裂解的细胞一起温育，由此将细胞内容物和编码所述扰动的所述核酸标签两者捕获到所述应答捕获珠粒上；(h) 任选地将所述细胞对所述扰动的应答转变为核酸信号，其中所述细胞对所述扰动的应答不是核酸信号；以及(i) 对与所述应答捕获珠粒连接的所述核酸标签进行测序，由此使所述扰动的身份与所述细胞对所述扰动的应答相关。

[0088] 在仍另一方面，一种用于通过以下扰动细胞并捕获所述细胞对扰动的应答的方法：(a) 提供皮可孔阵列和功能化扰动珠粒文库，其中皮可孔能够容纳单个细胞和单个功能化扰动珠粒，其中每个功能化扰动珠粒包括不同的多个基本上相同的可释放化合物和编码所述化合物的多个核苷酸条形码，其中所述核苷酸条形码是能够捕获所述细胞的细胞内容物的功能化条形码，其中细胞的所述细胞内容物包括对所述功能化扰动珠粒中含有的扰动的细胞应答；(b) 将单个细胞捕获到所述皮可孔阵列的每个皮可孔中；(c) 将单个功能化扰动珠粒捕获到含有单个细胞的所述皮可孔中；(d) 使所述化合物从所述功能化扰动珠粒释放并将所述细胞与所释放化合物一起温育，其中皮可孔之间的所述化合物具有最小扩散；(e) 裂解所述细胞以释放所述细胞内容物；(f) 将所述细胞内容物的一种或多种组分捕获到所述功能化扰动珠粒上的功能化寡核苷酸上，其中所述捕获包括杂交和酶促延伸以将核苷酸条形码与所述细胞内容物的核酸元件组合，由此形成所述核苷酸条形码与所述细胞内容物的所述核酸元件的杂交体；以及(g) 释放所述杂交体，从所述功能化扰动珠粒文库中收集所述杂交体，并对所述杂交体进行测序，由此将所述扰动与对所述扰动的细胞应答相关。

附图说明

[0089] 图1. 级联式珠粒。在级联式珠粒中，DNA条形码采取所有DNA条形码模块的形式，这些模块在单链中相互连接，并与任何其它具有功能的核酸(如引物退火位点)用作间隔子或有关生产日期的信息。此图上的数字不是结构编号。这些数字是指DNA条形码中“DNA条形码模块”的顺序。

[0090] 图2. 正交式珠粒。在正交式的珠粒中，DNA条形码采取所有DNA条形码模块的形式，其中DNA条形码模块不是一起出现在单链中，而是单独出现在珠粒上的不同位置。此图上的数字不是结构编号。这些数字是指DNA条形码中“DNA条形码模块”的顺序。

[0091] 图3. 可切割连接子、切割条件(UV光或化学物质)和切割产物。信息来自于Yinliang Yang (2014)《可切割连接子的设计及在化学蛋白质组学中的应用(Design of Cleavable Linkers and Applications in Chemical Proteomics)》。慕尼黑工业大学生物化学专业。每个连接子左侧的字母来自此参考。

[0092] 图4.用于本公开的组合物和方法的示例性氨基酸衍生物。

[0093] 图5.这张照片公开了,随着添加的来那度胺的浓度增加,HeLa细胞内部融合蛋白的降解增加。上图:IKZF1/GFP融合蛋白的表达。下图:mScarlett®对照物的表达。以零、0.1、1.0或10微摩尔添加来那度胺。

[0094] 图6.这张照片公开了,随着添加的来那度胺的浓度增加,HeLa细胞内部融合蛋白的降解增加。上图:IKZF3/GFP融合蛋白的表达。下图:mScarlett对照物的表达。以零、0.1、1.0或10微摩尔添加来那度胺。

[0095] 图7.用于创建珠粒结合的DNA条形码的方法和试剂。“DNA条形码”的最准确描述是所有DNA条形码模块的总和中包含的所有信息的总和。但为方便起见,术语“DNA条形码”在本文中用于指所有DNA条形码模块的所有信息的总和加上提供如步骤号或化学单体(组成珠粒结合的化合物)的一般类型等信息的任何另外的核酸以及加上提供功能的任何另外的核酸,如连接子、测序引物结合位点、具有测序引物结合位点的发夹或间隔子。在至少部分地通过点击化学的方式制备DNA条形码的情况下,DNA条形码可以包含来自点击化学反应的残留化学基团。

[0096] 图8.Alexa Fluor®488的结构。此图的目标是无需使用商标名即可标识化合物。

[0097] 图9.珠粒结合的释放监测器的简化图。在UV诱导的化合物从珠粒中释放出来之后,释放监测器向用户提供了可溶化合物的浓度的度量。在优选的实施例中,一种类型的珠粒专门用作释放监测器,即,该珠粒也不含珠粒结合的化合物并且也不含珠粒结合的DNA文库。“PCL”是光可切割连接子。

[0098] 图10.珠粒释放监测器的详细图。

[0099] 图11.珠粒释放监测器的化学合成。

[0100] 图12.具有双功能连接子的胺功能化珠粒,其中连接子包含赖氨酸残基。

[0101] 图13.用第一类羧基修饰的来那度胺的化学合成的步骤。

[0102] 图14.用第二类羧基修饰的来那度胺的化学合成的步骤。

[0103] 图15.用第三类羧基修饰的来那度胺的化学合成的步骤。

[0104] 图16A、图16B、图16C.来那度胺类似物。

[0105] 图17.适合于DNA条形码点击化学合成的脱氧胞苷类似物的化学合成的步骤。

[0106] 图18A、18B、18C.用于放置在皮可孔顶部和密封皮可孔的盖。图18A示出了有源盖,其中化合物可通过可切割连接子释放。图18B示出了另一种类型的有源盖,其中结合了如抗体的试剂。结合的试剂可以永久连接,其可以通过可切割连接子连接,或其可以通过氢键结合并且能够仅通过暴露在皮可孔中的溶液中释放,然后从有源盖扩散到该溶液中。图18C示出了无源盖,其可以用于从皮可孔中的溶液吸收、吸附、收集或捕获代谢物。随后可以分析吸收的代谢物。

[0107] 图19A、19B、19C.图19A示出了皮可孔上无盖的皮可孔板。图19B.每个皮可孔上有盖的皮可孔板。图19C.将聚丙烯酰胺溶液倒在皮可孔板上,皮可孔板上有一个牢固固定在每个皮可孔上的盖。聚丙烯酰胺然后渗入多孔盖中,固化并与每个盖形成稳定的粘合力。图19D.然后将固化的聚丙烯酰胺“顶盖”从皮可孔板上剥离,并带上每个盖。然后可以分析从皮可孔溶液转移并吸收到每个盖中的代谢物。优选地,倾倒在皮可孔板上方和珠粒上方的溶液变成水凝胶,并且优选地,珠粒由水凝胶制成。

[0108] 在排他性实施例中,本公开可以排除系统、微量滴定板、具有微孔、纳米孔或皮可孔的微量滴定板以及相关方法,其中至少一个孔被盖住,并且液态聚合物溶液倾倒在所述板上方和被盖的孔上方。另外,可以排除的是上述情况,其中液体聚合物已经聚合形成粘附在每个盖上的固体聚合物。另外,可以排除的是方法和所得组合物,其中固体聚合物被撕裂,并去除粘附的盖。

[0109] 图20.用于将IKZF1基因整合到细胞基因组中的环状质粒的图谱。质粒为:IKZF1 mNEON-p2a-mScarlet-w3-2FB (9081个碱基对)。IKZF1对Ikarus蛋白进行解码。

[0110] 图21.用于将IKZF3基因整合到细胞基因组中的环状质粒的图谱。质粒为:IKZF3 mNeon-p2a-mScarlet-w3-2FB (9051个碱基对)。IKZF3对Aiolos蛋白进行解码。

[0111] 图22.化学单体(化合物1-6)及其DNA条形码。

[0112] 图23.化学单体(化合物7-10)及其DNA条形码。

[0113] 图24.化学单体(化合物11-16)及其DNA条形码。

[0114] 图25.化学单体(化合物17-21)及其DNA条形码。

[0115] 图26.化学单体(化合物22-26)及其DNA条形码。

[0116] 图27示出了化学单体(化合物27-30)及其DNA条形码。

[0117] 图28.测序珠粒结合的DNA条形码。所述图公开了五个连续碱基中每个碱基的荧光信号强度,其中五个连续碱基是珠粒结合的DNA条形码的一部分。

[0118] 图29.阶梯式皮可孔。

[0119] 图30.荧光团从珠粒中释放的时间过程。这示出了珠粒结合的释放监测器的操作,在 $t=0$ 秒, $t=1$ 秒, $t=11$ 秒以及 $t=71$ 秒时获取荧光数据。

[0120] 图31A和B.图31A示出天冬氨酰蛋白酶在淬灭剂荧光团底物上的催化作用的照片。图31B示出天冬氨酰蛋白酶在淬灭剂荧光团底物上的催化作用后产生的发射数据。

[0121] 图32.皮可孔的横截面图,说明了各个步骤。

[0122] 图33.滴定数据,其示出了UV剂量的增加如何导致荧光团从珠粒上更大的切割。用外行的话来说,这示出了更强力的斧头挥动如何影响从珠粒上切下荧光团(UV剂量的功率以焦耳/平方厘米为单位进行测量)。符号“暴露”仅指拍照时的参数。拍摄照片时其仅是暴露时间(不是指进行切割的光线或进行激发的光线的暴露时间)。

[0123] 图34.TAMRA浓度与光通量的关系。示出了在暴露于365nm的UV光后释放的游离TAMRA的浓度。

[0124] 图35提供了淬灭剂荧光团底物以及该底物被酶切割的,从而抑制了酶的手绘图。还示出了珠粒结合的胃抑素-A和珠粒结合的Fmoc-缬氨酸的分子结构(阴性对照)。

[0125] 图36.制备珠粒的步骤,这些珠粒最终用于从切割的细胞中捕获mRNA,并随后制造cDNA文库。该图也出现在临时申请(用于在单细胞上筛选化合物文库的组合物和方法(Compositions and Method for Screening Compound Libraries on Single Cells))中的一个临时申请中,从中要求本申请的优先权。

[0126] 图37.用DNA条形码标记细胞,其中标记是通过嵌入细胞膜中的脂质进行的。该图也出现在临时申请(用于在单细胞上筛选化合物文库的组合物和方法(Compositions and Method for Screening Compound Libraries on Single Cells))中的一个临时申请中,从中要求本申请的优先权。

具体实施方式

[0127] 如本文所使用的,包含所附权利要求书在内,单词的单数形式如“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包含其复数指代物,除非上下文中清楚地另有指明。本文所引用的所有参考文献均通过引用结合,其程度如同每个单独的专利、出版的专利申请以及图、附图、序列表、光盘等被确切并单独地指明通过引用并入。

[0128] 缩略词

[0129] 表1提供了缩写和非限制性定义。

[0130]

表 1.缩写和非限制性定义	
ACN	乙腈
AMPSO	3-[(1,1-二甲基-2-羟乙基)氨基]-2-羟丙烷磺酸。 AMPSO 是“良好的缓冲液”之一 ((1966)。“用于生物研究的氢离子缓冲液 (Hydrogen Ion Buffers for Biological Research)”,《生物化学 (Biochemistry)》5:467-477)。
孔口	如本文所用,本文所用的术语孔口是指限定开口的物理物质,更具体地,是指能够限定开口的最小量的物理物质。在没有任何限制的情况下,该最小量的物理物质优选地采取壁的环形截面的形式。无限制地,孔口可以被认为是壁的环形截面,其中该截面的厚度为大约 0.2 nm、大约 0.5 nm、大约 10 nm、大约 20 nm、大约 50 nm、大约 100 nm、大约 200 nm、大约 500 nm、大约 1 微米 (um)、大约 2 um、大约 5 um 等,其中此厚度测量是沿远离轴的径向方向进行的,并且所述轴由开口限定。
1-AP	1-叠氮基苊
ATB	活动性肺结核

[0131]

条形码	术语“DNA 条形码”可以指整体上标识化合物的多核苷酸，相反，“DNA 条形码模块”可以仅指构成化合物的单体中的一个。“DNA 条形码模块”的简短定义是它标识化学文库单体。但是，“DNA 条形码模块”可以用于标识制造该特定单体的历史。“DNA 条形码模块”的更长的定义如下。以下化学文库单体中的每个需要通过不同的“DNA 条形码模块”进行标识。即使第一反应和第二反应具有相同的反应物（A 和 B），也使用了不同的 DNA 条形码模块，因为产物不同（产物为 C 或 D）。另外，即使第一反应和第三反应得到相同的产物（产物为“C”），由于反应物不同（反应物为 A + B 或 X + Y），使用了不同的 DNA 条形码模块。
	反应条件
	A + B → C
	反应条件 A，例如与甲烷溶剂反应
BiNAP	A + B → D
	反应条件 A，例如与二氯甲烷溶剂反应
	X + Y → C
BTPBB	Bis-Tris 丙烷破碎缓冲液
BTPLB	Bis-Tris 丙烷连接缓冲液
BTPWB	Bis-Tris 丙烷洗涤缓冲液
盖	盖是可以用作塞（plug）、塞子（stopper）、密封件等的物体，用于与微孔、纳米孔或皮可孔稳定接触。所述盖可以是球形、卵形、立方体、具有圆形边缘的立方体、金字塔形、具有圆形边缘的锥体等。除非另有说明，否则所述形状是在部分插入皮可孔之前或完全插入皮可孔之前的形状。优选地，在使用中，盖被部分地插入皮可孔中以形成密封。在一些实施例中，盖可以松散地设置在皮可孔的顶部，而没有任何部分插入。
化合物	本文使用的术语“化合物”，无任何限制，是指通过在珠粒上的固相合成，将多种化学单体彼此连接而合成的完整的化学物质。通常，术语“化合物”是指要通过测定要测试活性的完整的化学物质。术语“化合物”不旨在包含任何介导所述完整的化学物质与珠粒结合的连接子，并且不旨在包含任何要切割的保护基团，尽管可以理解的是，具有保护基团的“化合物”可以具有药物活性。术语“化合物”不用于指其中并非所有化学单体都已连接的珠粒结合的化学物质。如果在本文的其它某个上下文中使用术语“化合物”，则本领域技术人员将能够确定该描述是否相关。
COMU	(1-氰基-2-乙氧基-2-氧亚乙基氨基氧基)二甲基氨基-吗啉代-碳六氟磷酸酯（CAS 号 1075198-30-9）

[0132]

级联核酸条形码	“级联的” DNA 条形码采取以下形式：所有 DNA 条形码模块均是同一聚合物的一部分。当珠粒含有呈级联形式的 DNA 条形码时，来自所有组成 DNA 条形码模块的所有信息都存在于与珠粒上的单个连接位点连接的聚合物上。 级联的 DNA 是指“端对端连接”或“端对端衔接”（Farzaneh (1988) 《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》 16:11319-11326; Boyer (1999) 《病毒学 (Virology)》 263:307-312)。相反，词“链状的”指的是 DNA 的两个圆，这两个圆如在链子中一样彼此链接（Baird (1999) 《美国国家科学院院刊 (Proc. Nat'l.Acad. Sci.)》 96:13685-13690)。
CuAAC	铜催化的叠氮化物-炔烃环加成
CRB	点击反应缓冲液
DAF	重氮芴
DBCO	二苯并环辛炔
DBU	1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯
DCE	1,2-二氯乙烷
DCM	二氯甲烷
DESPS	DNA 编码的固相合成
DIC	二异丙基碳二亚胺
DIEA	N,N'-二异丙基乙胺
DMA	二甲基乙酰胺
DMAP	4-二甲基氨基吡啶
DMF	二甲基甲酰胺
DI	去离子
DTT	二硫苏糖醇
EDC	乙基-二甲基氨基丙基-碳二亚胺
ELISA	酶联免疫吸附测定
FMOC	9-氟烯基甲氧羰基
FMOC-PCL-OH	4-[4-[1-(9-芴基甲氧基羰基氨基)乙基]-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酸 (CAS 号 162827-98-7)
功能性核酸	在珠粒结合的 DNA 条形码的上下文中，以及在制造珠粒结合的 DNA 条形码的上下文中，术语“功能性核酸”是指具有活跃的生化功能（利用氢键、疏水相互作用、亲水相互作用、与酶的相互作用等的功能）的核酸。所示功能可以是在疏水珠和引物结合位点之间建立距离的 间隔子 。引物结合位点优选地在亲水环境中发生以支持 DNA 聚合酶的活性。另外，所述功能可以是 引物结合位点、发夹弯曲或“夹板寡核苷酸”的退火位点 。这与“信息性核酸”相反，后者存储有关相应化学单体身份的信息（“编码”）信息。
HDNA	头片 DNA
HTS	高通量筛选
INA	5-碘萘-1-叠氮化物
LC	液相色谱
LTB	潜伏性结核
MDM2	鼠双微粒体 2
Mtt	4-甲基三苯甲基

[0133]

NCL 击中; NCL 合并	NCL 是指来自潜伏性结核患者的血清（这代表字母“L”）与来自阴性对照健受体的血清（这代表字母“NC”）的混合物。
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺。NHS 化学可以用于将四嗪连接到例如抗体的游离氨基上（van Buggenum, Gerlach, Mulder (2016) 《科学报告 (Scientific Reports)》6:22675。
核酸	术语“核酸”可以指单个核酸分子，或指经过修饰的核酸，如带有荧光标签的核酸。另外，术语“核酸”可以用于指更长的多核苷酸内的核苷酸的各个连续片段。本文中，术语“核酸”使得在更长的多核苷酸中指称这些单独的片段更为方便，例如，当多核苷酸包括本身为引物结合位点的第一核酸，本身为 DNA 条形码模块的第三核酸以及标识多步合成途径中的步骤编号的第三核酸时。
OP	寡核苷酸对。寡核苷酸对可以指采取滑动异源双链形式的试剂，例如滑动异源双链的水溶液。
正交核酸条形码	“正交”DNA 条形码采取一种形式，其中每个 DNA 条形码模块在珠粒上占据不同的连接位点。当珠粒含有正交形式的 DNA 条形码时，化合物的 DNA 条形码的所有信息的获取需要分别对每个连接的 DNA 条形码模块进行测序。换句话说，通过“正交”核酸条形码，构成 DNA 条形码的每一个 DNA 条形码模块分散在同一珠粒的不同连接位点上。
OSu (OSu 与 NHS 相同)	N-羟基琥珀酰亚胺
OXYMA	2-氰基-2-(羟氨基)乙酸乙酯
平行	术语“平行”是指以下情况：化学单体逐一地共价连接到珠粒上，创建珠粒结合的化合物，并且核酸条形码模块也逐一地共价连接到同一珠粒上，创建珠粒结合的核酸条形码。连接每个化学单体的化学反应与连接每个核酸条形码模块的反应（化学或酶促反应）不完全同时进行。相反，这两个反应是错开的，因此平行合成涉及首先连接化学单体，然后连接对应的核酸条形码模块。可替代地，交错反应可以涉及首先连接核酸，然后连接对应的化学单体。在这种情况下，对应的是每个核酸条形码模块用于标识在同一轮平行合成中连接的化学单体。
PCL	光可切割连接子
PEG	聚乙二醇
扰动	如本文所用，术语“扰动”被广泛地用于涵盖小分子化合物、肽、抗体、大环化合物或任何分子文库（正在询问其对细胞或在测定中的作用）。如本文所用，术语“扰动珠粒”和“化合物珠粒”可互换使用，以表示含有扰动的珠粒，以及对扰动的合成历史和/或扰动的化合物身份进行编码的寡核苷酸条形码。如本文所用，术语“化合物条形码”和“扰动条形码”可互换使用，以表示对合成历史和/或连接到扰动珠的化合物的身份进行编码的寡核苷酸标签。
PDMS	聚二甲基硅氧烷
qPCR	聚合酶链反应

[0134]

皮可孔	在不暗示对本公开有任何限制的情况下，术语“皮可孔”可以用于指含有皮可孔阵列的板中的孔或腔，例如，超过 50,000 个皮可孔、超过 100,000 个皮可孔、超过 200,000 个皮可孔、超过 500,000 个皮可孔等。通常，皮可孔的体积（不包含可能在皮可孔中的任何珠粒的体积）约为 0.2 皮升 (pL)、约 0.5 pL、约 1.0 pL、约 2.0 pL、约 5.0 pL、约 10 pL、大约 20 pL、大约 30 pL、大约 40 pL、大约 50 pL、约 75 pL、约 100 pL、约 200 pL、大约 300 pL、大约 400 pL、大约 500 pL、约 600 pL、约 700 pL、约 800 pL、约 1000 pL、约 10,000 pL、约 100,000 pL、约 1,000,000 pL，或在由上述两个值中的任何一个限定的体积范围内，例如约 0.5 pL 到 2.0 pL。可以按上述设置任何“纳米孔”和“微孔”的体积（用纳米或微米代替术语“皮可”除外）。除非另外明确地或通过上下文指明，否则本公开是指皮可孔（而不是纳米孔或微孔）。
RAM	Rink 酰胺
RCA	滚环扩增
RT	室温
SPS	固相合成
滑动异源双链结构	滑动异源双链结构采取 ssDNA 的第一链和 ssDNA 的第二链的形式，其中 ssDNA 的第一链的 5'端的十二个核苷酸与 ssDNA 的第二链的 5'端的十二个核苷酸互补，并且其中 ssDNA 的第一链通过涉及各自 5'端的十二个互补碱基配对与 ssDNA 的第二链结合。数字“十二”纯粹是示例性的，而不是限制性的。可替代地，通过在 ssDNA 的第一链的 3'端和 ssDNA 的第二链的 3'端进行互补碱基配对，可以将滑动异源双链结构保持为杂交双链体。术语“滑动异源双链结构”可以可替代地被称为“交错异源双链结构”。术语“滑动”并不意味着异源双链是滑的（当 oligo[C]杂交到 oligo[G]或 oligo[A]杂交到 oligo[T]时，在形成双链的情况下异源双链可以移位位置 0。
TB	结核
TBE	三硼酸 EDTA
TBAI	四丁基碘化铵。
TBTA	三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺
TCEP	三(2-羧基乙基)膦。可以切割二硫键的还原剂。
TCO	反式环辛烯
TEAA	醋酸三乙铵
TEV 蛋白酶	烟草蚀刻病毒蛋白酶
TFA	三氟乙酸
TID	3-(三氟甲基)-3-(m-碘苯基)双吡丙啶
TIPS	三异丙基硅烷
TM	熔化温度
TMP	2,4,6-三甲基吡啶
QSY7	咕吨鎓, 9-[2-[[4-[[2,5-二氧-1-吡咯烷基]氧基]羰基]-1-哌啶基]磺酰]苯基]-3,6-双(甲基苯基氨基)-, 氯化物 (CAS 号 304014-12-8)
TAMRA	5(6)羧四甲基若丹明

[0135] 可以获取试剂、试剂盒、酶、缓冲液、活细胞、仪器等。参见例如，密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)；南卡罗来纳州埃斯蒂尔的奥克伍德化学品公司 (Oakwood Chemical)；威斯康星州麦迪逊市的Epicentre公司；加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen)；威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司 (ProMega)；加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司 (Life Technologies)；加利福尼亚州南旧金山的默飞世尔科技公司 (ThermoFisher Scientific)；马萨诸塞州伊普斯维奇的新英格兰生物实验室 (New

England BioLabs);弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC);新泽西州富兰克林湖的贝迪医疗公司(Becton Dickinson);加利福尼亚州亚圣地亚哥的亿明达公司(Illumina);加利福尼亚州普莱森顿的10X Genomics公司。

[0136] 条形码凝胶珠粒、非条形码凝胶珠粒和微流控芯片可从马萨诸塞州剑桥市的1CellBio公司获得。可获得用于流式细胞术的指导和仪器(参见,例如,加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司(BD Biosciences)的FACSCalibur®,BD FACSAriaII®用户指南,部件号643245,修订版A,2007年12月,344页)。

[0137] 通过光谱、光化学、荧光、生化、免疫化学、同位素或化学方法以及涉及等离子体纳米颗粒的方法,可直接或间接检测“标记”的组合物。例如,有用的标记包含³²P、³³P、³⁵S、¹⁴C、³H、¹²⁵I、稳定同位素、表位标签、荧光染料、拉曼标签、电子致密试剂、底物或酶,例如,用于酶联免疫测定,或fluorettes (Rozinov和Nolan (1998)《化学生物(Chem.Biol.)》5:713-728)。

[0138] 详细说明目录

[0139] (I) 珠粒

[0140] (II) 一珠粒一化合物(OBOC)

[0141] (III) 将核酸偶联到珠粒

[0142] (IV) DNA条形码

[0143] (V) 将化合物偶联到珠粒

[0144] (VI) 将化学单体彼此偶联以制成化合物

[0145] (VII) 拆分和合并合成以及平行合成

[0146] (VIII) 制造皮可孔

[0147] (IX) 将珠粒放入皮可孔

[0148] (X) 对皮可孔中的珠粒结合的核酸进行测序

[0149] (XI) 从珠粒释放珠粒结合的化合物

[0150] (XII) 化合物的生化测定

[0151] (XIII) 化合物的基于细胞的测定

[0152] (XIV) 细胞的扰动应答分析

[0153] (I) 珠粒

[0154] 本公开的方法和组合物使用珠粒,如单一尺寸的TentaGel® M NH₂珠粒(直径为10、20、30等微米)、标准TentaGel®氨基树脂(直径为90、130等微米)、TentaGel Macrobeads®(直径为280-320微米)(上述全部来自德国蒂宾根的邮编为72072的拉普聚合物公司(Rapp Polymere))。这些珠粒具有通过聚乙二醇衍生的聚苯乙烯核(Paulick等人(2006)《组合化学杂志(J.Comb.Chem.)》8:417-426)。TentaGel®树脂是接枝共聚物,所述接枝共聚物由接枝有聚乙二醇(PEG)的低交联聚苯乙烯基质组成。因此,本公开提供了被修饰为包含DNA条形码和化合物中的一个或两个的珠粒或树脂,其中未被修饰的珠粒采取由接枝有聚乙二醇(PEG)的低交联聚苯乙烯基质组成的接枝共聚物的形式。

[0155] TentaGel®的特征为“分子量高达20千道尔顿的PEG链以被固定在功能化的交联

聚苯乙烯。在动力学速率、迁移率、溶胀和树脂容量方面,具有约2000-3000道尔顿的PEG链的接枝共聚物被证明是最佳的”。(德国拉普聚合物公司)。因此,本公开提供了珠粒或树脂,其采取具有约2000-3000道尔顿的PEG链的接枝共聚物形式。关于溶胀,Comellas等人提供了测量珠粒溶胀能力的指南,例如当浸入DCM、DMF、甲醇、水或酶测定中使用的缓冲液时(Comellas等人(2009)《公共科学图书馆:综合(PLoS ONE)》4:e6222(12页))。溶胀的单位是珠粒的毫升/克。

[0156] 在一个替代珠粒实施例中,本公开使用具有PEG间隔子(通过烷基键连接到聚苯乙烯主链)的树脂,并且其中所述树脂是微球形的和单一尺寸的(**TentaGel®M**树脂)。

[0157] 在又一替代珠粒实施例中,本公开使用具有PEG间隔子(通过烷基键连接到聚苯乙烯主链)的树脂,其中所述树脂型存在于两种双功能种类:第一种,表面修饰的树脂:正交地保护珠粒的外表面上的反应位点与珠粒的内部体积中的反应位点以及第二种,混合树脂:可切割和不可切割的配体存在于该支持物种——针对顺序切割开发(**TentaGel®B**树脂)。

[0158] 此外,在另一个实施例中,本公开使用其中PEG间隔子通过烷基键连接到聚苯乙烯主链的树脂,并且其中所述大珠粒树脂示出了非常大的颗粒直径和高容量(**TentaGel®MB**树脂)。另外,本公开使用其中PEG间隔子通过苄基醚键连接到聚苯乙烯主链的树脂。这种树脂可以用于免疫流程或用于合成PEG修饰的衍生物(PEG连接的PEG修饰的化合物)(**TentaGel®PAP**树脂)。

[0159] 此外,珠粒可以是**HypoGel®200**树脂。这些树脂是接枝到低交联聚苯乙烯基质(瑞士布克斯的邮编为CH-9471的弗卢卡化工股份公司(Fluka Chemie GmbH))上的低聚乙二醇(MW 200)的复合物。

[0160] 在一些实施例中,可以使用氨基功能化的聚苯乙烯珠粒(不具有PEG连接子),例如,单一尺寸的聚苯乙烯 M-NH_2 珠粒(直径为5、10、20等微米,也来自德国蒂宾根的邮编为72072的拉普聚合物公司)。

[0161] 在一些实施例中,化合物可被包封在珠粒内的孔或室或通道内,而没有共价连接于珠粒。可以通过各种方式将化合物扩散到或压入珠粒的这种孔中。在一些实施例中,可以通过扩散将化合物装载在珠粒内。在一些实施例中,高温可用于溶胀珠粒并在珠粒内装载化合物。在一些实施例中,可以使用高压迫使化合物进入珠粒。在一些实施例中,溶胀珠粒的溶剂可用于将化合物装载在珠粒内。在一些实施例中,真空或低压可用于将化合物划分为珠粒。在一些实施例中,可以使用温和的或剧烈的物理搅拌来将化合物装载到珠粒中。

[0162] 在此类实施例中,其中化合物没有共价连接地装载在珠粒上,化合物可以通过扩散从珠粒上卸载。在一些实施例中,以非限制性方式,温度、压力、溶剂、pH、盐、缓冲液或去污剂或此类条件的组合可用于从此类珠粒中卸载化合物。在一些实施例中,例如通过未交联聚合的珠粒,珠粒的物理完整性可用于释放此类珠粒中包含的化合物。

[0163] 在排他性实施例中,本公开可以排除涉及上述珠粒中的一个的任何珠粒和珠粒-化合物复合体或任何方法。

[0164] 本公开的珠粒还包含以下。Merrifield树脂(氯甲基聚苯乙烯);PAM树脂(4-羟甲基苯基乙酰氨基甲基聚苯乙烯);MBHA树脂(4-甲基苯甲胺);Brominated Wang树脂(α -溴对苯乙酮);4-硝基二苯甲酮脞(Kaiser)树脂;Wang树脂(4-羟甲基苯氧甲基聚苯乙烯);PHB树

脂(对-羟基苯甲醇);HMPA树脂(4-羟甲基苯氧基乙酸);HMPB树脂(4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸);2-氯三甲苯基树脂;4-羧基三苯甲基树脂;Rink酸树脂(4-[(2,4-二甲氧基苯基)羟甲基]苯氧基甲基);Rink酰胺(RAM)树脂“Knorr”树脂(4-[(2,4-二甲基苯基)(Fmoc-氨基)甲基]苯氧基烷基);PAL树脂(5-[4-(Fmoc-氨基)甲基-3,5-二甲氧基苯氧基]戊酰氨基甲基聚苯乙烯);Sieber酰胺树脂(9-Fmoc-氨基-黄原-3-基-氧甲基);HMBA树脂(羟甲基苯甲酸);4-氨磺酰基苯甲酰基树脂“Kenner的安全捕获”树脂(N-(4-氨磺酰基苯甲酰基)氨基甲基-聚苯乙烯);FMP-树脂(4-(4-甲酰基-3-甲氧基苯氧基)-乙基)(参见,固相肽合成的ChemFiles树脂,第3卷,(32页)(瑞士布克斯的邮编为CH-9471的弗卢卡化工股份公司)。

[0165] 本公开的珠粒进一步包含用作化合物的被动包封剂的上述珠粒(被动地保持化合物而没有与化合物共价连接),并且进一步包括以下:未功能化的聚苯乙烯珠粒;二氧化硅珠粒;氧化铝珠粒;多孔玻璃珠;聚丙烯酰胺珠粒;氧化钛珠粒;海藻酸盐珠粒;陶瓷珠粒;PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)珠粒;三聚氰胺珠粒;沸石床;聚乳酸珠粒;解嵌段共聚物胶束;葡聚糖珠等。本段中列出的许多珠粒可以从供应商处购买,如美国纽约邮编为10516的冷泉镇的Microspheres-Nanospheres公司。

[0166] 除了珠粒以外,对于本公开的一些实施例,囊泡或小滴也可用作递送化合物的媒介。脂质、解嵌段共聚物、三嵌段共聚物或其它成膜材料可用于形成内部体积,化合物可装载其中。可以通过添加去污剂、机械搅拌、温度、盐、pH或其它方式从这些包封的体积中释放化合物。油包水液滴乳剂或水包油液滴乳剂是被动包封可递送到测定体积的化合物的其它方式。

[0167] 在使用被动包封来递送化合物的所有实施例中,DNA标签也可以被动加载,或者可替代地,DNA标签可以共价连接于珠粒、囊泡或液滴。

[0168] 在排他性实施例中,本公开可以排除由上述任何一种化学物质制成的或由上述任何一种化学物质的衍生物制成的任何珠粒或树脂。

[0169] 在实施例中,珠粒可以是球形的,并且直径为约0.1-1微米、约1-5微米、约1-10、约5-10、约5-20、约5-30、约10-20、约10-30、约10-40、约10-50、约20-30、约20-40、约20-50、约20-60、约50-100、约50-200、约50-300、约50-400、约100-200、约100-400、约100-600、约100-800、约200-400、约200-600、约200-800微米等。

[0170] 还提供了根据上述值和范围可限定的非-球形珠粒。例如,所述轴中的一个、主尺寸(例如,侧面)中的一个或次尺寸(例如,对角线)中的一个可以包括上述范围内的值。在排他性实施例中,本公开可以排除任何试剂、组合物、系统或方法,其涵盖落入上述值或范围中的一个或多个中的球状珠粒(或非球状珠粒)。

[0171] 珠链。在一个实施例中,提供了多个珠粒二聚体,其中珠粒-二聚体采取彼此连接的两个珠粒的形式,并且其中一个珠粒含有多个连接的核酸条形码(正交核酸模块或级联核酸模块),另一个珠粒含有多个连接的化合物,其中所有化合物基本上彼此相关(或所有化合物的化学结构彼此基本是哪个相同)。可以通过制备具有连接的化合物的第一珠粒,单独制备具有连接的核酸条形码的第二珠粒,然后将两个珠粒连接在一起来合成珠粒二聚体。在一方面,珠粒通过可逆连接子彼此连接,并且在另一方面,珠粒通过不可逆连接子彼此连接。

[0172] 珠粒渗透率。在实施例中,本公开提供具有各种范围或渗透率的珠粒。渗透率可以

用溶剂可接触的珠粒体积的百分比来测量,其中测量单位是珠粒表面的百分比,其采取孔的形式,或者测量单位是珠粒内部的百分比,其采取与珠粒表面(和外部介质)流体连通的通道、网络或室的形式。本公开可以涵盖多孔珠粒,或者可替代地,可以排除多孔珠粒。

[0173] Rothberg的美国专利第9,062,304号公开了一种具有外部和内部区域的珠粒。所示出的是“内表面(孔表面)”,并且“合适的孔将...排除较大的分子”和“利用内外表面的不同功能化”的选项和各种孔径以及聚合物(如聚(苯乙烯磺酸)和聚苯乙烯)。Rothberg的图1提供了珠粒表面和珠粒的孔的图片。Bedre的美国专利第9,745,438号提供了多孔珠粒的透射电子显微镜图像。Smith的美国专利第5,888,930号提供了多孔珠粒的横截面的扫描电子显微照片。所示出的是在表面上具有小孔而在内部具有大孔的球形珠粒,其中珠粒由例如聚苯乙烯、聚丙烯腈、聚碳酸酯、纤维素或聚氨酯制成。Cooke的美国专利第5,047,437号公开了具有无皮表面(图1)的球形聚(丙烯腈)共聚物的孔结构和在表面具有外皮的珠粒(图5)。Tsao的美国专利第4,090,022号公开了纤维素珠粒的多孔开口和内部空隙空间。

[0174] 上述经鉴定的专利(包含所有附图)中的每个以其整体并入本文,好像每个专利均通过引用整体并入本文。

[0175] 在不暗示任何限制的情况下,可以通过用弹性膜紧紧包裹整个珠粒或微粒来确定珠粒或微粒的外表面。可以通过思维实验将珠粒或微粒包裹起来,或者可以通过图纸或照片描绘经过包裹的珠粒,或者可以实际上包裹珠粒。在不暗示任何限制的情况下,珠粒的外表面是与所述包裹物理接触的珠粒的部分。

[0176] 例如,本公开提供了具有孔的珠粒,所述孔口占表面积的至少1%、至少2%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%。另外,本公开提供了一种珠粒,其中内部通道或网络的体积占珠粒总体积的至少1%、至少2%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%,并且其中内部通道或网络与珠粒的外表面(和外部介质)流体连通。

[0177] 此外,本公开提供了一种具有孔的珠粒,所述孔口占表面积的小于1%、小于2%、小于5%、小于10%、小于15%、小于20%、小于30%、小于40%。另外,本公开提供了一种珠粒,其中内部通道或网络的体积占珠粒总体积的小于1%、小于2%、小于5%、小于10%、小于15%、小于20%、小于30%、小于40%、小于50%、小于60%、小于70%、小于80%,并且其中内部通道或网络与珠粒的外表面(和外部介质)流体连通。

[0178] 铁芯珠粒。本公开涵盖铁芯珠粒或磁珠粒。可以用磁铁操纵这些珠粒,以将它们从一个反应容器移动到另一个反应容器,或从一个容器移动到另一个容器。使用这些磁珠粒可以增强机器人的操作。可获得制造和使用磁珠粒的方法(Szymonifka和Chapman(1994)《四面体通讯(Tetrahedron Letters)》36:1597-1600;Liu、Qian、Xiao(2011)《美国化学学会组合科学杂志(ACS Comb.Sci.)》13:537-546;Alam、Maeda、Sasaki(2000)《生物有机化学与医药化学快报(Bioorg.Med.Chem.)》8:465-473)。

[0179] 在排他性实施例中,本公开可以排除任何珠粒或任何珠粒群体,其中珠粒或群体满足上述值或范围中的一个。

[0180] 装载到珠粒的化合物

[0181] 在许多实验中,将预合成的化合物装载到珠粒中是有利的,其中珠粒可用作将化合物递送到测定的载体。用于将药物递送到生物样本的许多标准技术都可能适用于将化合

物递送到测定中(参见Wilczewska等人(2012)“纳米颗粒作为药物递送系统(Nanoparticles as drug delivery systems)”《药理报告(Pharmacological Reports)》64:1020-1037,Kohane DS(2007)“用于药物递送的微粒和纳米颗粒(Microparticles and nanoparticles for drug delivery)”《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》96:203-209,Singh等人(2010)微包封:一种有前途的可控药物递送技术(Microencapsulation:A promising technique for controlled drug delivery)《药物科学研究(Res Pharm Sci.)》5:65-77)。

[0182] 在此类实施例中,其中将预合成的化合物装载到珠粒中,所述化合物可以保持在传统的96、385或1536孔的微量滴定板中。可以在这些板上添加珠粒,通过扩散或通过其它主动装载方法将化合物装载到其中。在优选的实施例中,选择用于浸渍的珠粒具有孔尺寸或渗透几何形状,当从母液中移出时,所述珠粒防止化合物立即排空。如果需要,可以通过加热、加压、添加剂或其它刺激剂来增强从珠粒中的扩散。在一些实施例中,可以以防止内部内容物泄漏直到被外部冲动触发的方式封盖负载有化合物的珠粒。封盖多孔珠粒的外部的一种方法涉及将脂质或两亲分子添加到珠粒-化合物溶液中,使得暴露于珠粒表面的腔被由两亲分子形成的双层密封。在一些实施例中,可以将预制的囊泡与载有药物的珠粒混合,使得在搅动时,囊泡破裂并且膜在载有药物的珠粒的表面上重新形成,从而密封它们。描述了执行这种珠粒密封的方法(参见,Tanuj Sapra等人(2012)《自然科学报告(Nature Scientific Reports)》第2卷,文章编号:848)。密封二氧化硅珠粒的进一步的实验方案可参见桑迪亚实验室(Sandia Laboratories)的Ryan Davis等人发布的报告:“纳米多孔珠粒支持的双层:稳定性、物理特性和功能跨膜蛋白的结合(Nanoporous Microbead Supported Bilayers:Stability,Physical Characterization,and Incorporation of Functional Transmembrane Proteins)”,SAND2007-1560以及由Hui Zheng等人描述的方法bSUM(bSUM:珠粒支持的单层膜系统,有助于将膜蛋白单向插入巨囊泡中),《生理学杂志(J.Gen.Physiol)》(2016)147:77-93。

[0183] 在利用预合成的化合物的一些实施例中,通过添加适当的试剂,例如通过添加脂质或二嵌段共聚物,然后搅拌,从化合物产生珠粒,由此形成在其内部或双层膜中含有化合物的囊泡。在一些实施例中,可将化合物推过微流体T结以在油相中产生水相液滴,其中化合物包含在水相内或在水相与油相之间的界面处。在一些实施例中,所形成的液滴可以进一步聚合,从而产生水凝胶,与未聚合的水相液滴相比,水凝胶更坚固并且对处理更稳定。Oliver等人(2013)公开了基于液滴的包封和测定,“基于液滴的微流体(Droplet Based Microfluidics)”,《SLAS发现(SLAS Discovery)》,第19卷,第4期,第483-496页。溶胶-凝胶包封方法也可用于将化合物包封在珠粒内。溶胶-凝胶珠粒的形成在“用于医学应用的生物分子和细胞的溶胶-凝胶包封(Sol-gel Encapsulation of Biomolecules and Cells for Medicinal Applications)”,Xiaolin Wang等人(2015),《医药化学当前论题(Current Topics in Medicinal Chemistry)》中进行了描述。15:223。

[0184] 一珠粒一化合物(OBOC)

[0185] 用于制造组合文库的方法涉及三个步骤:(1)制备文库;(2)筛选文库中的化合物,以及(3)确定化合物的结构,例如,所有化合物或仅通过筛选提供有趣结果的化合物的结构(参见Lam等人(1997年)“一珠粒一化合物组合文库方法(The One-Bead-One-Compound

Combinatorial Library Method) ”《化学评论 (Chem.Rev.) 》97:411-448)。通过珠粒结合合成的方式合成化合物的优点是可以通过“拆分和合并”方法快速制备化合物。

[0186] OBOC与编码策略结合在一起。OBOC的另一个特征是每个珠粒不仅可以包含化合物,还可以包含编码策略。当珠粒结合的核酸编码用于对化合物(与统一珠粒结合)进行编码时,术语“编码”不指遗传密码。相反,术语“编码”意指用户拥有图例、键或代码,所述图例、键或代码将成千上万的短核酸序列中的每个与单个珠粒结合的化合物相关联。

[0187] 以下是使用带有珠粒结合的化合物和珠粒结合的核酸的珠粒的巨大变化,其中核酸对相关联的化合物进行编码。戏剧性的变化是制造缀合物文库,其中所述文库的每个成员采取小分子加DNA部分的缀合物形式,其中DNA部分对小分子进行编码。该缀合物是可溶的,并且不是珠粒结合的。用细胞或纯化的蛋白筛选后,缀合物仍与细胞或纯化的蛋白结合,从而能够分离缀合物并最终通过对缀合物的核酸进行测序来鉴定化合物(参见Satz等人(2015)《生物缀合化学 (Bioconjugate Chemistry) 》26:1623-1632)。

[0188] 在本文中,如本专利文件中的大部分内容一样,术语“编码”不是指遗传密码,而是指研究人员使用特定的核酸序列来表示化合物(连接于其)的特定已知结构的事实。

[0189] 作为使用编码策略(如使用DNA条形码)的替代方案,可以对筛选呈阳性(从而指示筛选为阳性的化合物)的珠粒进行Edman降解或进行质谱分析,以鉴定珠粒结合的化合物(参见Shih等人(2017)《分子癌症疗法 (Mol.Cancer Ther.) 》16:1212-1223)。如果珠粒结合的化合物是肽,则可以使用MALDI质谱法直接确定阳性筛选肽化合物的序列。直接测序是可能的,因为在激光照射下会同时发生切割和电离作用(Song, Lam (2003)《美国化学会志 (J.Am.Chem.Soc.) 》125:6180-6188)。

[0190] 进行组合文库的拆分和合并合成的一个优点是,可以制造化合物,以便所有化合物都具有相同的基序。这种策略已被描述为“生成基序文库而不是化合物文库”(参见Sepetov等人(1995)《美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.) 》92:5426-5430;Lam等人,同上,在418页)。

[0191] 为了提供大珠粒的典型实例,珠粒的直径可以为0.1mm,并且可以容纳相同化合物的约 10^{13} 个拷贝(Lam等人,同上)。制备珠粒结合的化合物的文库后,可以将每个珠粒用于单独的测定中,其中所述测定测量生化活性或可替代地,结合活性。测定可以是“珠粒上”测定,或者可替代地,可以将化合物从珠粒上切下并用于溶液相测定中(Lam等人,同上)。

[0192] 任何类型的珠粒的参数包含其在给定的测定介质中溶胀的趋势,珠粒的聚合物是疏水的还是亲水的,珠粒上用于连接每种化合物的连接位点的身份,是否使用间隔子(如聚乙二醇(PEG))进行每种化合物与珠粒表面的某种分离的问题,以及珠粒内部体积。

[0193] 关于需要将化合物连接到珠粒上,但要远离珠粒的疏水表面的问题,Lam等人(同上)公开了聚氧乙烯接枝的苯乙烯(**TentaGel®**)具有以下优点:可功能化基团位于聚氧乙烯链的端,因此远离疏水性聚苯乙烯。具有水溶性连接子的珠粒包含TentaGel和聚二甲基丙烯酰胺珠粒(**PepSyn®**凝胶,英国诺威奇的剑桥研究生化药剂公司(Cambridge Research Biochemicals))。

[0194] 在需要防止珠粒结合的DNA条形码与珠粒结合的化合物的靶标之间发生相互作用的情况下,内部体积参数可以提供优势。为了利用这种优势,可以制造珠粒,使DNA条形码位于珠粒内部,与此相反,被筛选的化合物连接在珠粒的表面(Lam等人,同上,第438-439

页)。内部体积的这种优势可能无关紧要,其中珠粒结合的化合物通过可切割连接子连接,并且仅其中对切割和释放的化合物进行化合物的测定。

[0195] Appell等人提供了以下的非限制性实例:用于合成化学文库,然后进行筛选以检测活性化合物的拆分和合并方法(Appell等人(1996)《生物分子筛选期刊(J.Biomolecular Screening)》1:27-31)。在第一微孔板、纳米孔板或皮可孔板上的一系列孔中,每个孔放置一个文库珠粒。珠粒要暴露在光线下,以切割约50%的珠粒结合的化合物,然后将其释放到孔中。然后将所释放的化合物转移到第二微孔板中,并进行测定以检测含有活性化合物的孔,从而确定第一板中的哪些珠粒含有活性的珠粒结合的化合物。然后,“[一]旦由单个珠粒鉴定出活性[化合物],就对所述珠粒进行恢复和解码,从而得到合成历史和...活性化合物的结构”(Appell等,同上)。

[0196] 对于筛选珠粒结合的化合物的基于细胞的筛选测定,Shih等人提供了一种新型的珠粒(Shih等人(2017)《分子癌症疗法》16:1212-1223)。这种新型的珠粒含有珠粒结合的化合物,所述化合物是“针对卵巢癌的合成死亡配体”文库的成员。珠粒还用生物素装饰,在其中添加了超过两种的化学物质以形成夹层,并且其中所述夹层保持了细胞对珠粒的连接力。所述夹层包含链霉亲和素加生物素-LXY30复合体。所述夹层将珠粒与LXY30的受体连接,后者恰好是细胞表面上的一种众所周知的蛋白质,即整联蛋白。Shih等人(同上)的方法使得发现了可以杀死癌细胞的新分子(“LLS2”)。上述方法使用了珠粒结合的化合物,其中化合物与细胞结合(即使所述化合物仍是珠粒结合的)。Cho等人创建了类似的一珠粒一化合物文库,其中筛选出的化合物足以与细胞结合(无需上文描述的夹层)(Cho等人(2013)《美国化学学会组合科学杂志(ACS Combinatorial Science)》15:393-400)。Cho等人的报告的目的是发现与由癌细胞表达的整联蛋白结合的含RGD的肽。以上公开的试剂和方法可用于本公开。

[0197] 将核酸偶联到珠粒(正交式;级联式)

[0198] 一种针对级联条形码和正交条形码的主题的方法是注意一种相对于另一种所具有的优点。正交条形码相对于级联条形码的优点如下。随着正在生长的化合物的每个单体的连接,平行连接的是DNA条形码模块。对于级联条形码,如果任何给定模块的连接都不完美(意指并非所有连接位点都已成功与所需模块偶联),则完整的条形码的顺序将不正确。陈述“不正确”意指不完美的偶联意指一团可能缺失的大块被认为是完整的、正确的DNA条形码。在本文中,由于所有模块的连接失败,完整的条形码序列将含有错误。相反,通过正交条形码,每个单独的模块都共价结合到其自身在珠粒上的唯一连接位点。并且,一旦将模块连接到珠粒上的给定位点,就不会再有其它模块连接到已连接的模块。

[0199] 本公开提供了用于减少对珠粒结合的DNA条形码的损害,以及用于减少对部分合成的珠粒结合的DNA条形码的损害的试剂和方法。每个DNA条形码模块在连接到不断增长的珠粒结合的DNA条形码之前,可以采取双链DNA(dsDNA)的形式,其中用如丝裂霉素-C的DNA交联剂处理此dsDNA。在dsDNA形式的DNA条形码合成完成后,此dsDNA被转换为ssDNA。在其中一条DNA链具有尿嘧啶(U)残基并且其中尿嘧啶-N-糖苷酶催化DNA在尿嘧啶残基位置的切割的情况下,可以实现dsDNA到ssDNA的转化(参见2017年9月25日提交的序列号62/562,905的图5。序列号62/562,905通过引用整体并入本文)。上述是指用于制造珠粒结合的化合物的试剂对不断增长的DNA条形码造成的损害。

[0200] 减少对珠粒结合的DNA条形码的损害并减少对部分合成的DNA条形码的损害的另一种方法是通过合成双链DNA形式的DNA条形码,其中彼此连接的DNA条形码模块中的每个采取dsDNA的形式,并且其中两条链中的每条通过DNA头片进行稳定。为了对完整的DNA条形码进行最终测序,将其中一条链从DNA头片上切割并去除。上述是指用于制造珠粒结合的化合物的试剂对不断增长的DNA条形码造成的损害(其中该化合物是化学文库的成员)。

[0201] 减少对珠粒结合的DNA条形码造成损害的又另一种方法是,以自组装形成发夹的方式合成DNA条形码,并且其中此DNA条形码自组装使发夹的第一尖头退火到发夹的第二尖头。

[0202] 如果正在合成的DNA条形码采取双链DNA(dsDNA)的形式,则溶剂(如DCM、DMF和DMA)会使DNA条形码变性。上述方法和试剂可以防止变性。

[0203] 如上所述,术语“DNA条形码”可以指整体上标识化合物的多核苷酸,相反,“DNA条形码模块”可以仅指构成化合物的单体中的一个。

[0204] 减少对珠粒结合的DNA条形码的损害并减少对部分合成的DNA条形码的损害的另一种方法是使用双链DNA(dsDNA)并通过7-aza-dATP和dGTP密封此dsDNA的端。

[0205] 在替代实施例中,所述方法可以使用“级联DNA条形码”和“正交DNA条形码”之间的中间物,其中此中间物涉及DNA条形码的嵌段,即其中每个嵌段含有两个DNA模块,或含有三个DNA模块,或含有四个DNA模块,或含有五个DNA模块等(但不含标识全长化合物的所有DNA模块)。

[0206] 图1公开了级联结构化的珠粒的示例性且非限制性的图。珠粒含有多个DNA条形码(每个由DNA条形码模块制成)和多个化合物(每个由化学文库单体制成)。为了易于说起,术语“DNA条形码”可以用来指包含作为“DNA条形码模块”的所有核酸以及提供某些功能的所有核酸的聚合物。所述功能可以是测序引物的退火位点,或所述功能可以用于标识珠粒结合的化合物的化学合成步骤。图1还示出了珠粒结合的化合物,其中每个化合物由若干个化学文库成员组成,每个化学文库成员由正方形、圆形或三角形表示。图1示出了每个DNA条形码模块从1到8连续编号,其中这些编号分别对应于八个形状(正方形、圆形、三角形)。为了清楚起见,图中没有示出提供功能的核酸(不代表或对任何特定的化学单元进行“编码”)。

[0207] 图2公开了正交结构化的珠粒的示例性且非限制性的实施例。珠粒含有多个DNA条形码(每个都由DNA条形码模块制成),但是每个DNA条形码模块都连接到珠粒上单独的连接位点。整个DNA条形码由八个DNA条形码模块组成,在图中编号为1-8。当读取来自特定DNA条形码的信息,然后将其用于标识与同一珠粒结合的化合物时,必须对每个单独连接的DNA条形码模块执行DNA测序。在图2中,珠粒还含有多个连接的化合物,每个具有八个单元,如八个形状(圆形、正方形、三角形)所示。

[0208] 在图2中,为了清楚起见,未示出连接到每个DNA条形码模块的功能性核酸。当然,每个DNA条形码模块都需要具有核酸,所述核酸标识化学文库单体在完整的全长化合物中的位置。对于图2所示的实例,位置必须是第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八。

[0209] 在一个实施例中,首先连接化学单体,然后再连接对应的DNA条形码模块。在替代实施例中,首先连接DNA条形码模块,然后连接对应的化学单体。另外,可以遵循有时使用“一个实施例”并且有时使用“替代实施例”的有机合成的流程。在又一个替代实施例中,本方法提供了若干个化学单体的嵌段(连接到珠粒)的分段添加,与若干个DNA条形码模块

的嵌段的连接平行。

[0210] 在排他性实施例中,可以排除使用将化学单体、DNA条形码模块或化学单体和DNA条形码模块两者的分段添加的试剂、组合物和方法。

[0211] 这涉及珠粒结合的多核苷酸中可能存在的核酸,包含“编码”或用于标识珠粒结合的化合物单体的核酸。在排他性实施例中,本公开可以排除对“步骤特定的DNA测序引物位点”进行编码的核酸。在这种情况下,对于化合物中存在的每种化学单体,都有一个对应的DNA条形码模块,其中每个DNA条形码模块的侧面是至少一个对应的引物结合位点,即“步骤特定的DNA测序引物位点”。另外,可以排除的是对化合物化学合成中特定步骤进行编码或指定的核酸,如步骤1、步骤2、步骤3或步骤4。

[0212] 此外,本公开可以包含作为间隔子的核酸。例如,间隔子可以沿着多核苷酸链在本身为测序引物退火位点的第一位点和标识化学单体的第二位点之间创建距离。另外,本公开可以使用重复或证实另一种核酸提供的信息的核酸。另外,本公开可以使用对PCR引物结合位点进行编码的核酸。可以将PCR引物结合位点与测序引物区分开,因为具有PCR引物结合位点的多核苷酸具有两个PCR引物结合位点,并且因为这两个位点设计为具有相同的熔点(当PCR引物的熔点退火到PCR引物结合位点时的位点)。

[0213] 在排他性实施例中,本公开可以排除作为间隔子或仅作为间隔子的核酸。另外,本公开可以排除重复或证实另一种核酸提供的信息的核酸。此外,本公开可以排除用作PCR引物结合位点的核酸,并且可以排除用作非PCR引物的引物的结合位点的核酸。

[0214] 另外,本公开可以排除标识化学文库的制成日期或标识特定化合物的化学合成步骤或用作引物退火序列的核酸。

[0215] 特定DNA条形码模块的专用测序引物。本公开提供了一种DNA条形码,其含有DNA条形码模块和一个或多个测序引物退火位点。每个DNA条形码模块都可以具有自己的专用测序引物结合位点。可替代地,一个特定的测序引物结合位点可用于对两个、三个、四个、五个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个连续的DNA条形码模块进行测序,这可能存在于与珠粒结合的DNA条形码上。

[0216] 下面描述了每个DNA条形码模块都有自己的专用测序引物结合位点的情况。本发明提供一种珠粒结合的级联条形码,其包括能够结合DNA的测序引物的引物结合位点,其中所述引物结合位点能够指导对第一DNA条形码模块、第二DNA条形码模块、第三DNA条形码模块、第四DNA条形码模块、第五DNA条形码模块和第六DNA条形码模块中的一个或多个进行的测序,并且其中引物结合位点位于第一DNA条形码模块的3' (在第一DNA条形码模块和引物结合位点之间没有其它DNA条形码模块)、第二DNA条形码模块的3' (之间没有其它DNA条形码模块)、第三DNA条形码模块的3' (之间没有其它DNA条形码模块)、第四DNA条形码模块的3' (之间没有其它DNA条形码模块)、第五DNA条形码模块的3' (之间没有其它DNA条形码模块)或第六DNA条形码模块的3' (之间没有其它DNA条形码模块)。

[0217] 编码序列和与编码序列互补的序列。本公开可以涵盖上述或本文件其它地方公开的编码序列的任何一种、任何组合或全部。在排他性实施例中,可以排除的是上述或本文件其它地方公开的编码序列的任何一个、任何组合或全部。还可以包含或可以排除的是对上述或本文件其它地方的编码序列的任何一种、任何组合或全部进行编码的双链核酸。

[0218] 正交式DNA条形码(每个DNA条形码模块连接到珠粒上的单独位置)

[0219] 正交式的珠粒的合成。通过正交合成,每个DNA模块共价连接到珠粒上的单独位点,并且其中结果是整个DNA条形码由多个DNA模块贡献。在DNA条形码具有正交结构的情况下,没有一个DNA条形码模块相互连接,而不是每一个DNA条形码分子都有其自己的专用于所述特定DNA条形码模块的珠粒结合位点。

[0220] 核酸标识每个DNA条形码模块的合成步骤编号。在实施例1中,正交DNA条形码包含标识化合物合成的第一步的短核酸。对于该实施例,在第一化学单体和第一DNA条形码模块平行连接的情况下,第一DNA条形码模块实际上采取两种核酸的这种复合体的形式:连接到[第一DNA条形码模块]的[意指“步骤一”的短核酸]。该复合体的所有核苷酸都在框内,可以在测序分析中读取,但是第一短核酸可以任选地通过间隔子核酸连接到第一DNA条形码模块。

[0221] 下面继续对正交DNA条形码的上述描述。正交DNA条形码包含标识化合物合成的第二步的短核酸。对于该实施例,在第二化学单体和第二DNA条形码模块平行连接的情况下,第二DNA条形码模块实际上采取两种核酸的这种复合体的形式:连接到[第二DNA条形码模块]的[意指“步骤二”的短核酸]。该复合体的所有核苷酸都在框内,可以在测序分析中读取,但是第二短核酸可以任选地通过间隔子核酸连接到第二DNA条形码模块。

[0222] 对于任何给定的珠粒,对第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十和直到最后一个DNA条形码模块和最后一个化学单体进行重复的上述方法。当使用拆分和合并合成时,可以遵循上述方法来创建DNA条形码和珠粒结合的化合物。

[0223] 正交结构相对于级联结构具有以下优点。使用级联合成(一个连续的聚合物中,所有DNA条形码模块彼此连接)时,无法进行合成的任何中间体偶联步骤可以破坏最终完成的级联DNA条形码的含义。相反,通过正交合成(连接到珠粒上的专用位点的每一个DNA条形码模块),未连接任何DNA条形码模块将只会导致珠粒上的连接位点为空,而不会破坏任何其它连接的DNA条形码模块的含义。在优选的实施例中,每个连接的DNA条形码模块包含连接的第二核酸,其中该第二核酸标识所述步骤(DNA条形码和化合物的平行合成期间的步骤)。

[0224] 对于正交合成,用尽珠粒上的所有连接位点(用于连接不断增长的化学文库成员的位点)是可接受的。然而,对于正交合成,在连接许多DNA条形码模块中的第一个DNA条形码模块的情况下,需要设计化学反应,使得珠粒上的所有连接位点仅被部分用尽。以下提供了在正交条形码化学合成期间用尽位点的任选限制。对于未修饰的珠粒,可用于连接DNA条形码模块的位点总数为100%。

[0225] 通过正交配置的珠粒(关于第一DNA条形码)的合成,用尽给定珠粒上的连接位点的程度。以下涉及连接第一DNA条形码模块。在实施例1中,在连接第一DNA条形码模块的情况下,约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、或约50%的珠粒上的DNA条形码连接位点被用尽。在其它实施例中,小于约2%、小于约5%、小于约10%、小于约20%、小于约30%、小于约40%或小于约50%的珠粒上的DNA条形码连接位点被用尽。在仍其它实施例中,在连接第一DNA条形码模块的情况下,介于2%-4%、介于2%-6%、介于2%-8%、介于2%-10%、介于2%-12%、介于2%-14%、介于2%-16%、介于2%-18%、介于2%-20%、介于10%-20%、介于10%-25%、介于10%-30%、介于10%-35%、介于10%-40%之间的DNA条形码连接位点被用尽。

[0226] 关于限制,在连接构成特定DNA条形码的最后一个DNA条形码模块的情况下,小于

20%的位点被用尽,小于30%、小于40%、小于50%、小于60%、小于70%、小于80%、小于90%、小于95%或小于98%的位点被用尽。

[0227] 排他性实施例可以排除与任何上述值或范围匹配的珠粒或方法。另外,排他性实施例可以排除不能与任何上述值或范围匹配的珠粒或方法。

[0228] 以下涉及包括一个或多个核酸(每个为DNA条形码)的聚合物,以及包括两个或超过两个核酸的聚合物,其中一些核酸具有生化功能,如用作引物退火位点或用作间隔子,并且其中其它核酸具有信息性功能并且是DNA条形码。在排他性实施例中,本公开可以排除包含DNA交联剂如补骨脂素的DNA条形码。另外,可以排除的是具有引物结合区的DNA条形码,所述引物结合区具有比DNA条形码模块更高的解链温度(或更低的解链温度)。该温度可以只是“更高”或“更低”,或可以高至少2摄氏度、高至少4摄氏度、高至少6摄氏度、高至少8摄氏度、或低至少2摄氏度、低至少4摄氏度、低至少6摄氏度、低至少8摄氏度。

[0229] 也可以排除用于制备使用DNA连接酶的DNA条形码的方法。另外,可以排除的是包括发夹(弯曲成环的ssDNA,使ssDNA的一部分与同一ssDNA的另一部分杂交)的DNA条形码和其制备方法。另外,可以排除的是具有核酸发夹的组合物,其中核酸发夹例如通过化学连接子共价闭合。此外,可以排除的是(直接或间接地)与“头片”共价连接的DNA条形码(间接地通过共价结合到驻留在DNA条形码和头片之间的一种或多种化学物质的方式)。

[0230] 在其它排他性实施例中,可以排除的是珠粒结合的DNA条形码,其中完整的DNA条形码不包括任何双链DNA(dsDNA),而仅包括单链DNA(ssDNA)。

[0231] 通过正交配置的珠粒(关于第二DNA条形码)的合成,用尽给定珠粒上的连接位点的程度。以下涉及连接第二DNA条形码模块。在实施例中,在连接第二DNA条形码模块的情况下(用于创建正交配置的珠粒),约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、或约50%的珠粒上的剩余游离的DNA条形码连接位点被用尽。在其它实施例中,小于约5%、小于约10%、小于约20%、小于约30%、小于约40%或小于约50%的珠粒上的剩余游离的DNA条形码连接位点被用尽。在仍其它实施例中,在连接第一DNA条形码模块的情况下,介于2%-4%、介于2%-6%、介于2%-8%、介于2%-10%、介于2%-12%、介于2%-14%、介于2%-16%、介于2%-18%、介于2%-20%、介于10%-20%、介于10%-25%、介于10%-30%、介于10%-35%、介于10%-40%之间的剩余游离的DNA条形码连接位点被用尽。

[0232] 排他性实施例可以排除与任何上述值或范围匹配的珠粒或方法。另外,排他性实施例可以排除不能与任何上述值或范围匹配的珠粒或方法。

[0233] 上述实施例以及上述排他性实施例也可以应用于连接第三DNA模块条形码,或连接第四DNA模块条形码,或连接第五DNA条形码模块等的方法。

[0234] 级联式DNA条形码(所有DNA条形码模块驻留在一条链或一种聚合物中,其中整个链或聚合物连接到珠粒上的一个位置)。

[0235] 珠粒结合的级联式DNA条形码的合成。本公开提供了一种珠粒结合的级联式DNA条形码,其中珠粒含有多个级联式DNA条形码,并且其中大多数或几乎所有的多个级联式DNA条形码具有基本上相同的结构。级联式DNA条形码可以含有一个或多个DNA条形码模块,其中这些DNA条形码模块(从珠粒连接端到远端)沿着整个DNA条形码的顺序与合成珠粒结合的级联式DNA条形码时的顺序相同。另外,这些DNA条形码模块沿着整个DNA条形码上的顺序与对应的化学文库单偶联到不断增长的珠粒结合的化合物时的顺序相同。

[0236] 级联式DNA条形码可以包括按此顺序的连接子,所述连接子用于将整个级联式DNA条形码偶联到珠粒。另外,它可以包括按此顺序的第一DNA条形码模块、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点。

[0237] 珠粒结合的DNA条形码中测序引物杂交位点的一种顺序。在测序引物杂交位点的实施例中,级联式DNA条形码可以包括按此顺序的连接子、第一DNA条形码模块、第一退火位点、第一测序引物结合位点、第二DNA条形码模块、第二退火位点、第二测序引物结合位点、第三DNA条形码模块、第三退火位点和第三测序引物结合位点等。

[0238] 发生在珠粒结合的DNA条形码中时测序引物杂交位点的另一种顺序。在另一个测序引物杂交位点的实施例中,级联式DNA条形码可以包括按此顺序的连接子、第一DNA条形码模块、第一测序引物结合位点、第一退火位点、第二DNA条形码模块、第二测序引物结合位点、第二退火位点、第三DNA条形码模块、第三测序引物结合位点和第三退火位点等。

[0239] 术语“退火位点”。术语“退火位点”用于指作为夹板寡核苷酸一部分的退火位点,并且也指驻留在不断增长的与珠粒结合的DNA条形码上的对应的珠粒结合的退火位点。技术人员理解的是,夹板寡核苷酸上的“退火位点”不具有与不断增长的珠粒结合的DNA条形码上的对应“退火位点”相同的DNA序列。换句话说,技术人员理解的是一个序列与另一序列互补。因此,对于本文的描述,两个退火位点具有相同的名称没有关系。换句话说,以下是没有关系的:夹板寡核苷酸上的第二退火位点被公开为是与不断增长的结珠粒结合的DNA条形码上的第二退火位点杂交的退火位点。

[0240] 嵌段合成。在替代实施例中,不断增长的化合物和不断增长的DNA条形码模块的生长序列可以在嵌段中合成。例如,由2个化学文库单元组成的嵌段可以和由对应的2个DNA条形码模块组成的嵌段平行地连接到珠粒。类似地,由3个化学文库单元组成的嵌段可以和由对应的3个DNA条形码组成的嵌段平行地连接到珠粒。还提供了涉及四个嵌段、五个嵌段、六个嵌段、七个嵌段、八个嵌段、九个嵌段、十个嵌段等的嵌段合成。这些嵌段传输实施例中的每个也可以被本公开排除。DNA条形码单体的嵌段转移可以正交进行,具有独特的连接点,用于接收DNA条形码单体的每个连续嵌段。可替代地,可以进行DNA条形码单体的嵌段转移,以产生串联体结构(所有DNA条形码模块仅以一种连续的线性聚合物形式出现)。

[0241] 另外,在珠粒结合的DNA条形码与珠粒结合的化合物平行的拆分和合并合成期间,可以在嵌段中进行合成。所述嵌段可以采取两种或超过两种化学文库单体的形式,并且所述嵌段可以采取两种或超过两种DNA条形码模块的形式。

[0242] 拆分和合并合成的位置。拆分和合并合成可以用于珠粒结合的化合物和珠粒结合的级联DNA条形码的平行合成。另外,拆分和合并合成可以用于珠粒结合的化合物和珠粒结合的正交DNA条形码的平行合成。级联DNA条形码可以通过“夹板寡核苷酸”方法制成。可替代地,可以通过点击化学的方法制成级联DNA条形码。另外,可以使用“夹板寡核苷酸”方法和点击化学的组合。拆分和合并合成可以在96孔板中进行,其中每个孔的底板由0.25微米的过滤器制成。在正常重力条件下,水溶液不会流过该过滤器。然而,例如在需要用第二水溶液代替第一水溶液的情况下,可以施加抽吸以从所有96个孔中去除任何水溶液。当珠粒暴露于第一组试剂时,或者当第一组试剂需要冲洗时,或者当第一组试剂需要被第二组试剂替换时,使用这种抽吸方法。使用歧管固定96孔板(Resprep VM-96歧管),并且可以使用泵将流体从每个过滤器的底部抽出(BUCHI Vac V-500泵)。带有过滤器底部的96孔板是

AcroPrep Advance 96孔, 350uL, 0.45um, REF 8048 (颇尔公司 (Pall Corp.), 多孔板, 密歇根州安阿伯)。

[0243] 从引物退火位点到DNA条形码模块的距离。出于对珠粒结合的DNA条形码进行测序的目的, 即出于对形成DNA条形码的所有DNA条形码模块进行测序的目的, 多核苷酸包括第一核酸(所述核酸是测序引物的退火位点), 以及第二核酸(所述核酸是DNA条形码模块), 第一核酸可以直接在第二核酸的上游。可替代地, 第一核酸可以在第二核酸的上游, 其中第一核酸和第二核酸彼此被一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或更多核苷酸, 或约一个、约两个、约三个、约四个、约五个、约六个、约七个、约八个、约九个、约十个、约十一个、约十二个、约十三个、约十四个、约十五个核苷酸分离。可以使用仅作为间隔子的核酸进行分离, 或可替代地, 可以使用对信息进行编码的第三核酸进行分离, 如有机合成的多步途径中的步数或一类化合物的数目, 或可能被珠粒结合的化合物治疗的疾病, 或日期或批次等。

[0244] 通过点击化学合成珠粒结合的级联DNA条形码

[0245] 点击化学可以用于DNA条形码的一步一步合成。在本文中, 可以将第一个DNA条形码模块直接偶联到珠粒, 或者将第一个DNA条形码模块偶联到珠粒结合的连接子。

[0246] 另外, 可以偶联的是采取第一核酸(本身为第一DNA条形码模块) 连接到第二核酸(本身为第一测序引物结合位点) 形式的多核苷酸。此测序引物结合位点允许操作者确定第一DNA条形码模块的序列。

[0247] 提供另外一个实例, 可以将第二DNA条形码模块直接连接到珠粒结合的第一DNA条形码模块。可替代地, 可以偶联的是采取第一核酸(本身为第二DNA条形码模块) 连接到第二核酸(本身为第二测序引物结合位点) 形式的多核苷酸。此测序引物结合位点允许操作者确定第二DNA条形码模块的序列。如果通读第一DNA条形码模块, 则可以确定这两个DNA条形码模块的序列。

[0248] 提供又一个实例, 可以偶联的是包括第一核酸(本身为第一DNA条形码模块) 以及第二核酸(标识DNA条形码和化合物的多步平行合成中的步骤) 的多核苷酸。另外, 或者可替代地, 第二核酸可以标识通过拆分和合并合成制成的化合物的一般类别。另外, 或者可替代地, 第二核酸可以标识将由待筛选化合物治疗的疾病。另外, 第二核酸可以标识日期或化学家的姓名等。

[0249] 用于合成DNA条形码的一种优选方法如下所示, 其中使用相同的反应周期并逐步连接每个DNA条形码模块。

[0250] 步骤1. 向珠粒提供连接的TCO基团。在实际实践中, 珠粒将具有成百上千个相同连接的TCO基团, 其中每个TCO基团连接到珠粒上的不同位点。另外, 在实际实践中, 将采取点击拆分和合并方法和点击化学方法同时修饰大量的珠粒。

[0251] 步骤2. 将[四嗪]-[第一DNA条形码模块]-[叠氮化物]添加到珠粒, 并允许TCO基团与四嗪基团缩合。结果是以下结构: 珠粒-TCO-四嗪-第一DNA条形码模块-叠氮化物。在实际实践中, 此构造不包含任何TCO或四嗪, 而是具有TCO与四嗪缩合时产生的缩合产物。

[0252] 步骤3. 任选的洗涤。

[0253] 步骤4. 添加DBC0-TCO以覆盖叠氮化物并创建TCO端。结果是以下结构:

[0254] 珠粒-TCO-四嗪-第一DNA条形码模块-叠氮化物-DBC0-TCO。

[0255] 步骤5.任选的洗涤。

[0256] 步骤6.添加以下试剂,所述试剂连接第二DNA条形码模块。连接在不断增长的DNA条形码的远端。试剂为:

[0257] 到珠粒的[四嗪]-[第二DNA条形码模块]-[叠氮化物],并允许TCO基团与四嗪基团缩合。结果是以下结构:

[0258] 珠粒-TCO-四嗪-第一DNA条形码模块-叠氮化物-DBC0-TCO-[四嗪]-[第二DNA条形码模块]-[叠氮化物]

[0259] 上述方案包含用于逐步添加越来越多的DNA条形码模块的步骤循环,其中这些添加与越来越多的化学单体的添加平行。如其它地方所述,这种“平行”合成可以涉及连接化学单体,然后连接标识该单体的DNA条形码模块,或者可替代地,连接DNA条形码模块,然后连接由该特定化学单体标识的化学单体。

[0260] 用于DNA条形码的点击化学合成的化合物

[0261] 图17公开了在DNA条形码模块的合成以及最终整个DNA条形码的合成期间适于连接脱氧胞苷残基(dC)的化合物的化学合成。起始材料是N4-乙酰基-2'-脱氧-5'-O-DMT胞苷。缩写“DMT”代表4,4-二甲氧三苯甲基。这种有机合成的多步路径的最终产物带有胞嘧啶部分、三磷酸基团和与核糖基团的3'位置相连的炔丙基。炔丙基用于点击化学,其中其与叠氮基缩合产生共价键。缩合后,结果是残留的化学物质(从来没有天然存在于核酸中)从已执行的点击化学中作为“疤痕”出现。可用的DNA聚合酶可以用于通过点击化学制成的DNA条形码的合成测序,并且其中DNA聚合酶可以穿过疤痕,并且其中疤痕不会引起测序错误。TBAI是四丁基碘化铵。

[0262] 级联配置型DNA条形码的合成

[0263] 在下面的描述中,DNA条形码模块排成一排,以创建DNA条形码。然而,在下面示出的文本内图中,使用术语“DNA条形码”代替“DNA条形码模块”,以便使文本内图适合页面。图7展示了与此处所示相同的步骤,但是具有更多细节,如珠粒的图。重复的反应序列可以用于添加每个另外的DNA条形码模块。

[0264] 创建包含对DNA发夹进行编码的端核酸的DNA条形码的选项。这涉及DNA条形码,所述DNA条形码在3'端除的核酸,所述核酸具有测序引物的退火位点、采取约四个碱基对(未进行碱基配对)形式的弯曲和能够弯曲并且与测序引物退火位点形成碱基对的测序引物。为了重复进行,测序引物退火到测序引物退火位点,其中实际测序反应在退火测序引物的3'端处开始。

[0265] 当需要执行合成DNA条形码的最后步骤,并且要将最终DNA条形码模块与不断增加的珠粒结合的DNA条形码偶联时,“夹板寡核苷酸”可以包含涵盖DNA发夹的序列(DNA发夹包含按此顺序的测序引物的退火位点,若干个不与彼此或相邻的碱基序列进行碱基配对的核苷酸,以及测序引物)。将“夹板寡核苷酸”退火后,然后添加DNA聚合酶和dNTPs,其中聚合发生在不断增长的DNA条形码的3'端,其中使用夹板寡核苷酸作为模板进行聚合的顺序为:(1) 测序引物的退火位点;(2) 采取不与彼此进行碱基配对的四个或五个脱氧核糖核苷酸的形式发夹中的弯曲;(3) 测序引物。

[0266] 发夹测序引物3'端的可逆终止子基团。本公开提供了试剂、组合物和方法,用于将预先形成的核苷酸/可逆终止子基团的复合体连接到退火测序引物的3'端。可逆终止子基

团是发夹测序引物的任选组分,其为珠粒结合的DNA条形码的一部分。

[0267] 步骤1.在开始时,我们有一个位于皮可孔中的珠粒,其中珠粒带有偶联的多核苷酸,并且其中多核苷酸的5'端任选地通过连接子与所述珠粒偶联。图7示出珠粒结合的多核苷酸包括第一DNA条形码和第一退火位点。连接子可以由核酸制成,或者可以由其它某种化学物质制成。优选地,连接子是疏水的,并且优选地,连接子将珠粒结合的DNA条形码与疏水性聚苯乙烯珠粒(例如,TentaGel®珠粒)分开。

[0268] 为了方便写入,第一退火位点(珠粒结合的DNA的条形码的一部分)和第一退火位点(可溶的“夹板寡核苷酸”的一部分)均被称为“第一退火位点”,即使它们没有相同的碱基序列(相反,碱基序列彼此互补,结果是夹板寡核苷酸可以与珠粒结合的不断增长的DNA条形码上的第一退火位点杂交,从而作为模板使DNA聚合酶通过复制夹板寡核苷酸上的内容来扩展珠粒结合的DNA条形码。

[0269] 另外,为了方便写入,第二退火位点(珠粒结合的DNA的条形码的一部分)和第二退火位点(可溶的“夹板寡核苷酸”的一部分)均被称为“第二退火位点”,连尽管它们没有相同的序列(但是具有互补的碱基)。

[0270] 从5'端到3'端的与珠粒结合的不断增长的DNA条形码可能含有以下顺序的核酸:

[0271] 珠粒-/第一DNA条形码/第一退火位点/

[0272] 可替代地,从5'端到3'端的珠粒结合的不断增长的DNA条形码可以包含对步骤编号进行编码的核酸,其中珠粒结合的不断增长的DNA条形码具有以下顺序的核酸:

[0273] 珠粒-/第一DNA条形码/核酸编码步骤编号/第一退火位点/

[0274] 可替代地,珠粒结合的不断增长的DNA条形码可以含有本身为功能性核酸(测序引物退火位点)的核酸,如下所示:

[0275] 珠粒-/第一DNA条形码/测序引物退火位点/第一退火位点/

[0276] 这些文本内图中未示出的是任选的连接子,所述连接子介导DNA条形码与珠粒的偶联。连接子可以采取核酸的形式,或者可以由其它某种化学物质制成。

[0277] 步骤2.添加可溶的夹板寡核苷酸,其中此夹板寡核苷酸包括第一退火位点和第二DNA条形码模块,以及第二退火位点。

[0278] 图7还展示了使用杂交夹板寡核苷酸作为模板的步骤,其中DNA聚合酶催化第二DNA条形码模块和第二退火位点与珠粒结合的不断增长的DNA条形码的连接。图7示出了酶促产物,其中DNA聚合酶催化使用夹板寡核苷酸作为模板,从而导致珠粒结合的DNA条形码的增长时间更长(通过第二DNA条形码和第二退火位点的共价连接而增长)。文本下面立即示出的是夹板寡核苷酸的复合体,所述复合体与珠粒结合的不断增长的DNA条形码杂交:

[0279] 珠粒-/第一DNA条形码/第一退火位点/

[0280]第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0281] 为了重复图7所示的一些信息,下面立即示出的是夹板寡核苷酸:

[0282] “第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点”

[0283] 步骤3.添加了DNA聚合酶和dNTP,以扩展珠粒结合的DNA条形码。下面示出的是珠粒结合的不断增长的DNA条形码,夹板寡核苷酸仍与其杂交,并且其中所述珠粒结合的不断增长的条形码比以前长,因为现在连接到所述条形码的是本身为“第二DNA条形码模块”的核酸和本身为“第二退火位点”的核酸。图7也展示了此步骤。夹板寡核苷酸示出在与珠粒结

合的不断增长的条形码下方：

[0284] 珠粒-/第一DNA条形码/第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0285]第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0286] 步骤4.洗掉夹板寡核苷酸。可以通过加热,即通过将整个皮可孔板加热到例如约60摄氏度、约65摄氏度、约70摄氏度、约75摄氏度、约80摄氏度(约十分钟)来鼓励夹板寡核苷酸从珠粒结合的不断增长的条形码上解离,或可替代地,通过将稀NaOH添加到皮可孔阵列中,然后中和。

[0287] 步骤5.添加第二夹板寡核苷酸,所述第二夹板寡核苷酸与珠粒结合的不断增长的夹板寡后,可以作为用于介导第三DNA条形码的DNA聚合酶催化连接和第三退火位点的模板。下面(但未在图7中示出)示出了第二夹板寡核苷酸,其是可溶试剂:

[0288] 第二退火位点/第三DNA条形码/第三退火位点/

[0289] 步骤6.允许该寡核苷酸退火到与对应的珠粒结合的“第二退火位点”,并允许DNA聚合酶扩展珠粒结合的寡核苷酸,从而使其含有以下内容的补充:第三DNA条形码/第三退火位点/

[0290] 步骤7.洗掉第二夹板寡核苷酸。

[0291] 步骤4.添加以下夹板寡核苷酸(此特定添加未在图7中示出)。

[0292] 第三退火位点/第四DNA条形码/第四退火位点/

[0293] 这种可溶的寡核苷酸具有可以退火到珠粒结合的寡核苷酸的“第三退火位点”的核酸。退火后,将使用具有四个dNTP的DNA聚合酶,并将其用于扩展珠粒结合的寡核苷酸以对又一个DNA条形码模块(第四DNA条形码)进行编码。在整个拆分和合并过程期间,重复上述步骤循环,该过程平行创建化合物文库和相关联的DNA条形码,其中每个DNA条形码与给定化合物相关联(其中每个DNA条形码通知我们相关联化合物的化学合成历史)。当化合物文库的化学合成完成时,停止上述步骤循环。通过完整的珠粒结合的DNA条形码化学文库,然后将珠粒分配到皮可孔阵列的皮可孔中。

[0294] 每个珠粒的DNA条形码也构成了与每个皮可孔相关联的DNA条形码。DNA条形码允许标识珠粒结合的化合物。本公开的测序方法发生在皮可孔内部,而珠粒仍在皮可孔内部。在排他性实施例中,本公开可以排除任何测序方法并且可以排除任何用于测序的试剂,其中不对珠粒结合的DNA模板进行测序,或者不对位于皮可孔内部的珠粒结合的DNA模板进行测序。

[0295] 用于序列化引物的退火位点。在一个实施例中,完整的DNA条形码中的每个DNA条形码模块与其自身的测序引物退火位点可操作地连接并且在框内,从而使操作者能够对每个DNA条形码模块进行单独的测序流程(在该实施例中,优选的是,每个DNA条形码模块也可以与其自身的核酸可操作地连接,所述核酸标识(编码)整个DNA条形码的合成步骤。

[0296] 在另一个实施例中,每个DNA条形码仅具有一个测序引物退火位点,其中这可以位于珠粒结合的DNA条形码的3'端或附近,并且其中测序引物本身是可溶的,将其添加到皮可孔中,然后与测序引物退火位点杂交。可替代地,如果测序引物是DNA发夹的一部分,则在创建珠粒结合的DNA条形码的最后一步中,通过“夹板寡核苷酸”添加该DNA发夹。图7未示出任何测序引物的任何退火位点。

[0297] 通过3'端将核酸偶联到珠粒

[0298] 尽管本发明中公开的各个实施例涉及通过DNA的5'端将DNA偶联到珠粒,但在其它实施例中,可以将DNA(如DNA条形码或DNA标签)通过它们的3'端偶联到珠粒。DNA的3'-羟基在某些化学合成条件下(例如Mitsunobu转化)可能具有反应性,导致3'端受损并且无法参与延伸、连接或其它步骤。因此,DNA标签可以通过其3'端连接到珠粒,以防止有害的化学反应并防止损坏DNA条形码。

[0299] 关于本公开的珠粒结合的DNA条形码的排他性实施例。可以排除的是任何珠粒、微粒、微球、树脂或物质的聚合的物质组合物,其中级联DNA条形码通过光可切割连接子或可切割连接子与珠粒连接。

[0300] 可以排除的是不包含以下两项的任何珠粒、微粒、微球、树脂或聚合的物质组合物:(1)偶联到珠粒上第一位置的级联DNA条形码,(2)与珠粒上的第二位置偶联的化合物,并且其中第一位置与第二位置不同。在优选的实施例中,该“化合物”由多种化学文库单体制成。

[0301] 可以排除的是没有外表面(或多个外表面)并且也没有内表面(或多个内表面或内部区域)的任何珠粒、微粒、微球、树脂或聚合的物质组合物,并且其中所述珠粒不包括偶联到珠粒的至少10,000个基本上相同的级联DNA条形码,并且其中所述至少10,000个基本是哪个相同的级联DNA条形码的至少90%偶联到外表面。换句话说,可以排除的是任何珠粒,其中至少90%的偶联的级联DNA条形码未偶联到外表面。

[0302] 可以排除的是基本上由聚丙烯酰胺制成或包含任何聚丙烯酰胺的任何珠粒、微粒、微球、树脂或聚合的物质组合物。

[0303] 可以排除的是任何含有启动子(如T7启动子),或含有polyA区域,或含有启动子以及polyA区域的珠粒、微粒、微球、水凝胶、树脂或聚合的物质组合物。

[0304] 仅具有一个退火/聚合循环的方法,以产生具有两个DNA条形码模块的珠粒结合的DNA条形码。本公开涵盖系统、试剂和方法,其中珠粒结合的DNA条形码仅包含一个退火/聚合步骤。下图表示了该实施例,其中第一个图示出了夹板寡核苷酸的退火,并且第二个图示出了使用DNA聚合酶的填充。最终结果是珠粒结合的DNA条形码,其含有两个DNA条形码模块。在此特定过程中,珠粒结合的起始材料可以任选地包含连接子(但优选地不包含任何可切割连接子),任选地对除标识化合物以外的信息进行编码的核酸,以及任选地功能性核酸(如测序引物或DNA发夹)。文本中示出了两个图(参见下面):

[0305] 珠粒-/第一DNA条形码/第一退火位点/

[0306]第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0307] 珠粒-/第一DNA条形码/第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0308]第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点

[0309] 具有两个退火/聚合循环的方法,以产生具有三个DNA条形码模块的珠粒结合的DNA条形码。本公开涵盖珠粒结合的组合物、系统和方法,其中使用了两种不同的夹板寡核苷酸(第一夹板寡核苷酸;第二夹板寡核苷酸)。在这种情况下,第一夹板寡核苷酸包括以下结构:第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点,并且其中第二寡核苷酸包括以下结构:第二退火位点/第三DNA条形码/第三退火位点。

[0310] 具有三个退火/聚合循环的方法,以产生具有四个DNA条形码模块的珠粒结合的DNA条形码。本公开涵盖珠粒结合的组合物、系统和方法,其中使用了三种不同的夹板寡核

苷酸(第一夹板寡核苷酸;第二夹板寡核苷酸;第三夹板寡核苷酸)。在这种情况下,第一夹板寡核苷酸包括以下结构:第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点,并且其中第二寡核苷酸包括以下结构:第二退火位点/第三DNA条形码/第三退火位点,并且其中第三寡核苷酸包括以下结构:第三退火位点/第四DNA条形码/第四退火位点。

[0311] 具有四个退火/聚合循环的方法,以产生具有五个DNA条形码模块的珠粒结合的DNA条形码。本公开涵盖珠粒结合的组合物、系统和方法,其中使用了四种不同的夹板寡核苷酸(第一夹板寡核苷酸;第二夹板寡核苷酸;第三夹板寡核苷酸;第四夹板寡核苷酸)。在这种情况下,第一夹板寡核苷酸包括以下结构:第一退火位点/第二DNA条形码/第二退火位点,并且其中第二寡核苷酸包括以下结构:第二退火位点/第三DNA条形码/第三退火位点,并且其中第三寡核苷酸包括以下结构:第三退火位点/第四DNA条形码/第四退火位点,并且其中第四寡核苷酸包括以下结构:第四退火位点/第五DNA条形码/第五退火位点,

[0312] 具有多个退火/聚合步骤的实施例,以产生具有多个DNA条形码模块的珠粒结合的DNA条形码。本公开涵盖与级联条形码有关的珠粒结合的组合物、系统和方法,其仅使用一种夹板寡核苷酸(制备2模块DNA条形码),仅使用两种夹板寡核苷酸(制备3模块DNA条形码),仅使用三种夹板寡核苷酸(生成4模块的DNA条形码),仅使用四种夹板寡核苷酸(生成5模块的DNA条形码),仅使用五种夹板寡核苷酸(生成6模块的DNA条形码),仅使用六种夹板寡核苷酸(生成7模块的DNA条形码)等。

[0313] 涵盖的是珠粒结合的组合物、系统和方法,其使用至少一种夹板寡核苷酸、至少两种夹板寡核苷酸、至少三种夹板寡核苷酸、至少四种夹板寡核苷酸、至少五种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少20种夹板寡核苷酸或少于20种、少于15种、少于10种、少于8种、少于6种、少于4种、少于3种、少于2种夹板寡核苷酸。这些数字是指夹板寡核苷酸本身,以及添加夹板寡核苷酸的步骤的编号,并且也指添加到珠粒结合的不断增长的DNA条形码中的DNA模块的编号。

[0314] 减少DNA条形码的损坏

[0315] 通过使用正交DNA条形码(而不是级联DNA条形码)减少损坏。一种针对级联DNA条形码和正交DNA条形码的主题的方法是注意一种相对于另一种所具有的优点。正交条形码相对于级联条形码的优点如下。通过连接不断增长的化合物的每个单体,平行连接的是化学文库单体(用于创建化学文库)和DNA条形码模块(用于创建完整的全长DNA条形码)。

[0316] 对于级联条形码,如果任何给定模块的连接都不完美(意指并非所有连接位点都已成功与所需模块偶联),则完整的条形码的顺序将不正确。陈述“不正确”意指不完美的偶联会产生缺少的大块,在此情况下,用户认为完整的产物是完整并正确的DNA条形码。在本文中,由于所有DNA模块的连接失败,完整的DNA条形码序列将含有错误。相反,通过正交条形码,每个单独的DNA模块都共价结合到其自身在珠粒上的唯一连接位点。并且其中一旦DNA模块连接到珠粒上的给定位点,则无需再将其其它DNA模块偶联到已经与珠粒结合的DNA模块。

[0317] 通过使用交联剂减少损坏。本公开提供了用于减少对珠粒结合的DNA条形码的损害,以及用于减少对部分合成的珠粒结合的DNA条形码的损害的试剂和方法。每个DNA条形码模块在连接到不断增长的珠粒结合的DNA条形码之前,可以采取双链DNA(dsDNA)的形式,其中用如丝裂霉素-C的DNA交联剂处理此dsDNA。在dsDNA形式的DNA条形码合成完成后,此

dsDNA被转换为ssDNA。在其中一条DNA链具有尿嘧啶(U)残基并且其中尿嘧啶-N-糖苷酶催化DNA在尿嘧啶残基位置处的切割的情况下,可以实现dsDNA到ssDNA的转化(参见2017年9月25日提交的序列号62/562,905的图5。序列号62/562,905通过引用整体并入本文)。上述是指用于制造珠粒结合的化合物的试剂对不断增长的DNA条形码造成的损害。

[0318] 通过使用双链DNA(dsDNA)制作DNA条形码来减少损坏。减少对珠粒结合的DNA条形码的损害并减少对部分合成的DNA条形码的损害的另一种方法是通过合成双链DNA形式的DNA条形码,其中彼此连接的DNA条形码模块中的每个采取dsDNA的形式,并且其中两条链中的每条通过DNA头片进行稳定。为了对完整的DNA条形码进行最终测序,将其中一条链从DNA头片上切割并去除。上述是指用于制造珠粒结合的化合物的试剂对不断增长的DNA条形码造成的损害(其中该化合物是化学文库的成员)。

[0319] 通过包含发夹减少损坏。减少对珠粒结合的DNA条形码造成损害的又另一种方法是,以自组装形成发夹的方式合成DNA条形码,并且其中此DNA条形码自组装使发夹的第一尖头退火到发夹的第二尖头。

[0320] 如果正在合成的DNA条形码采取双链DNA(dsDNA)的形式,则溶剂(如DCM、DMF和DMA)会使DNA条形码变性。上述方法和试剂可以防止变性。

[0321] 通过使用dsDNA的密封端减少损坏。减少对珠粒结合的DNA条形码的损害并减少对部分合成的DNA条形码的损害的另一种方法是使用双链DNA(dsDNA)并通过7-aza-dATP和dGTP密封此dsDNA的端。

[0322] 通过避免使用蛋白质溶剂、避免使用强酸和强碱、避免使用强还原剂和氧化剂来减少损坏。与脱氧核糖核酸(DNA)的存在相容的化学类型,无论是珠粒结合的DNA还是未珠粒结合的DNA,都可能需要没有蛋白溶剂,避免强酸条件,避免强碱(如叔丁基锂),避免强还原剂(如氢化铝锂),避免与DNA碱反应的试剂(如某些烷基卤化物),并避免某些氧化剂(参见Luk和Satz(2014)“DNA相容化学(DNA-Compatible Chemistry)”(第4章)《DNA编码的化学手册(A Handbook for DNA-Encoded Chemistry)》第1版约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons, Inc.))。

[0323] 如其它地方所述,术语“DNA条形码”可以指整体上标识化合物的多核苷酸,相反,“DNA条形码模块”可以仅指构成化合物的单体中的一个。

[0324] 通过使用与DNA相容的化学物质,减少对核酸的损坏。Satz等人公开了与珠粒结合的核酸相容的各种化学方法(Satz等人(2015)《生物缀合化学》26:1623-1632;在Satz等人(2016)的《生物缀合化学》27:2580-2580中做了校正)。尽管上述Satz等人的描述涉及对DNA/化学文库成员缀合物进行的化学反应,但是所描述的与DNA相容的化学类型也是相关的,其中有机化学要在珠粒上进行,所述珠粒含有珠粒结合的化合物和珠粒结合的DNA。

[0325] 公开了与DNA相容的以用于形成苯并咪唑化合物、咪唑啉酮化合物、喹啉酮化合物、异吲哚啉酮化合物、噻唑化合物和咪唑并吡啶化合物的反应(参见Satz等人,表1,条目1-6)。

[0326] 此外,公开了与DNA相容的保护基,包含烯丙氧羰基脱保护、BOC脱保护、叔丁酯水解/甲基/乙基酯水解以及肼和阮内镍的硝基还原(参见Satz等人,表1,条目7-11)。

[0327] 此外,公开了将试剂偶联到DNA的方法,其中已经连接到DNA的功能团发生偶联。所述方法包含Suzuki偶联、炔烃和芳基卤化物之间的Sonogashira偶联的优化流程、使用二甲

基-1-重氮-2-氧丙基膦酸酯将醛转化为炔烃、直接从纯化的炔烃中添加三唑环的新方法、异氰酸酯结构单元与胺功能化DNA反应的一种改进方法,其中改进的反应是在pH 9.4缓冲液中用异氰酸酯试剂进行的(参见Satz等人,表1,条目12-15)。

[0328] 另外,公开了将试剂偶联到DNA的方法,其中已经连接到DNA的功能团发生偶联。这些包含将伯胺与DNA缀合的方法、形成DNA缀合的硫脲的优化流程、将仲胺烷基化和脂肪族伯胺的双烷基化方法、将伯胺DNA-缀合物单烷基化(使用杂芳基卤化物作为可以与胺功能化的DNA缀合物反应的结构单元),以及用于Wittig反应的方法(参见Satz等人,表1,条目16-20)。

[0329] 通过DNA修复酶减少受损的DNA。包含酶、DNA受损结合蛋白和解旋酶的各种蛋白质可用于修复DNA损坏。可商购获得的是DNA修复蛋白,其可以修复氧化性损坏、辐射引起的损坏、UV光引起的损坏、来自甲醛加合物的损坏以及烷基加合物形式的损坏。去除受损的碱基(但不切割ssDNA或dsDNA)的糖苷酶可用于修复5-甲酰基尿嘧啶、脱氧尿苷和5-羟甲基尿嘧啶。T4PDG可用于修复嘧啶二聚体。hNEIL1和Fpg可用于修复氧化的嘧啶、氧化的嘌呤、嘌呤位点和无嘧啶位点。EndoVIII可用于修复氧化的嘧啶和无嘧啶位点。EndoV可用于修复失配。HaaG是可用于修复烷基化嘌呤的糖基化酶。如果DNA修复酶留有空隙,双链DNA留有空隙,其中一条链中缺少一个或多个连续的脱氧核糖核苷酸,则可以使用各种DNA聚合酶填补空隙(参见目录(2018)马萨诸塞州伊普斯维奇的新英格兰生物实验室)。

[0330] 已经从哺乳动物、酵母和细菌中分离出各种DNA修复酶和DNA修复系统。这些包含介导核苷酸切除修复(NER)、直接修复、碱基切除修复、转录偶联DNA修复和重组修复的那些。链间DNA交联可以通过NER的使用和同源重组来修复。直接修复包含通过光切割酶修复环丁烷嘧啶二聚体和6-4产物。直接修复还包含通过DNA甲基转移酶(methyltransferase)从 O^6 -甲基鸟嘌呤中去除 O^6 -甲基。参见Sancar等人(2004)《生物化学年鉴(Ann.Rev.Biochem.)》73:39-85;Hu和Sancar(2017)《生物化学期刊(J.Biol.Chem.)》292:15588-15597。

[0331] 本公开提供了一种系统、试剂和方法,用于通过用DNA修复酶或DNA修复蛋白的复合体等处理来修复对珠粒结合的DNA条形码的损坏。

[0332] 通过将DNA通过3'端与珠粒偶联来减少损坏。某些化学转化可能会损坏暴露的核酸的3'-羟基。例如,Mitsunobu反应允许将伯醇和仲醇转化为酯、苯基醚、硫醚和各种其它化合物,这可能会使暴露的3'端与后续处理步骤失去反应,或使现在修饰的3'端参与进一步的化学反应。在一些实施例,中,DNA标签可以通过它们的3'端连接到珠粒,因此仅5'端暴露于溶液中。

[0333] 本公开的试剂、系统和方法涵盖珠粒结合的核酸,如珠粒结合的DNA或珠粒结合的DNA标签,其中与珠粒的偶联涉及DNA的3'端(或3'端)。如果包括DNA条形码的ssDNA通过ssDNA的3'端偶联,则可以通过仅杂交一个测序引物来启动测序,其中该测序引物在整个DNA条形码的上游进行杂交,并且这种杂交是在偶联的ssDNA的珠粒结合的端或附近。作为仅使用一种测序引物的替代,可以使用多种测序引物,其中每种测序引物在上游与特定DNA条形码模块杂交。例如,如果给定的DNA条形码含有五个DNA条形码模块,并且DNA通过其3'端与珠粒偶联,则DNA条形码可以包含五个不同的引物退火位点,每个引物退火位点都位于在给定的DNA条形码模块的上游或紧邻上游。

[0334] 双链DNA (dsDNA) 偶联实施例。在其它实施例中,偶联到珠粒的是dsDNA,其中dsDNA中仅一条链的3'端偶联到珠粒。在涉及dsDNA的5'端偶联实施例中,可以偶联的是dsDNA,其中dsDNA的仅一条链的5'端偶联到珠粒。

[0335] (V) 将化合物偶联到珠粒

[0336] 本公开提供了:(1) 将化学文库成员连接到如珠粒等基底的连接子;(2) 将核酸条形码连接到如珠粒等基底的连接子;(3) 可切割连接子,例如可被UV光切割,可被如蛋白酶等酶切割;(4) 不可切割连接子;(5) 双功能连接子;(6) 多功能连接子;(7) 用于连接的多个珠粒。例如,可用的是4-羟甲基苯甲酸(HMBA)连接子、4-羟甲基苯基乙酸连接子(参见Camperi、Marani、Cascone (2005)《四面体通讯》46:1561-1564)。

[0337] “不可切割连接子”可以表征为连接子,其在给定有机化学流程的步骤中使用的任何试剂、条件或环境均无法检测到。可替代地,“不可切割连接子”可以表征为连接子,其无法被切割,除非通过对给定有机化学流程的其它反应物、产物或试剂具有不可接受地破坏性的试剂、条件或环境。

[0338] 双功能连接子或其它多功能连接子可以采取叉子的形式(人类用于食用食物的叉子),其中叉子的手柄连接到珠粒上,并且叉子的每个齿都与各种化学物质中的一个化学物质相连。例如,一个齿可以连接到化学文库成员。另一个齿可以连接到DNA条形码。叉子的又一个齿可以连接到金属离子。

[0339] 关于多种珠粒的使用,本公开提供了多珠粒的实施例,如:(1) 第一珠粒,所述第一珠粒含有连接到第二珠粒的连接的核酸条形码,其中第二珠粒含有连接的化学文库成员;(2) 第一珠粒,所述第一珠粒含有连接到第二珠粒的连接的核酸条形码,其中第二珠粒含有连接的化学文库成员,并且其中第三珠粒是连接的(连接到第一珠粒和第二珠粒中的一个或两个),并且其中第三珠粒含有共价连接的试剂。连接的试剂可以是酶,其中所述酶用于测定连接的化学文库成员的活性。

[0340] (VI) 将单体偶联在一起以制成化合物

[0341] 示例性化学单体。图4示出了氨基酸衍生物,其适合用作本公开的组合物和方法的化学单体。该图指示了化学物质的来源,例如,加利福尼亚州弗里蒙特的AnaSpec EGT集团;密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司;阿克罗斯有机物公司(Acros Organics)(赛默飞世尔科技公司的一部分)或加利福尼亚州圣地亚哥的Combi-Blocks公司。

[0342] 另外的化学单体示于图22-27。图22-27中的每个提供了结构、化学名称和相关联的DNA模块条形码。如图中所公开的,针对化合物1-6(图22),相应的条形码为ACGT、ACTC、AGAC、AGCG、AGTA和ATAT。针对化合物7-10(图23),相应的条形码为ATGA、CACG、CAGC和CATA。针对化合物11-16(图24),相应的条形码为CGAG、CGCT、CGTC、CTAC、CTGT和GACT。针对化合物17-21(图25),相应的条形码为GAGA、GCAC、GCTG、GTAG和GTCA。针对化合物22-26(图26),相应的条形码为GTGC、TAGT、TATC、TCAG和TCGC。并且针对化合物27-30(图27),相应的条形码为TCTA、TGAT、TGCA和TGTG。这些方案条形码仅是示例性的。对于任何给定的化合物文库,可以使用不同的DNA条形码集合来标识用于在所述文库中用于构建化合物的每种化学单体。

[0343] 偶联反应。下文描述了将化学单体与珠粒彼此偶联,即,第一步是通过可切割连接子将第一化学单体直接与珠粒偶联,并且其中将随后的化学单体彼此逐一连接。下面公开的条件是DNA相容的。

[0344] 这描述了在 **Tentagel®** 珠粒上制备三种氨基酸化合物的方法。通过 Fmoc-Photo-Linker、4-[4-[1-(9-苄基甲氧羰基氨基)乙基]-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酸改性的 Fmoc 保护树脂 (1mg, 拉普聚合物公司, 10 μ m, TentaGel M-NH₂, 0.23mmol/g) 或另一个具有 Fmoc 保护的合适连接子被悬浮在 DMA (150 μ L) 中的反应器板 (默克密理博有限公司 (Merck Millipore Ltd), 0.45 μ m 疏水性 PTFE) 的每个孔内。通过使用 Resprep VM-96 真空歧管在所述板的底部施加真空来去除溶剂。通过将树脂悬浮在 150 μ L 的 5% 哌嗪和 DMF 中 2% DBU 的混合物来去除 Fmoc 保护基。用 Excel Scientific Alumna Seal 密封所述板, 并在 40°C 下摇动 15 分钟。通过施加真空去除溶剂, 并重复脱保护流程 5 分钟。过滤后, 每个孔分别用 150 μ L 的 2XDMA、3XDCM、1XDMA 洗涤, 在每次洗涤之间施加真空以去除溶剂。然后通过添加 150 μ L 的 60mM Fmoc-氨基酸、80mM Oxyma、200mM DIC 和 80mM 2,4,6-三甲基吡啶的预活化混合物 (在室温下静置 2 分钟), 用适当的氨基酸对树脂的每个孔进行酰化。再次密封所述板并在 40°C 下摇动 1 小时。过滤后, 每个孔分别用 150 μ L 的 2XDMA 和 3XDCM 洗涤。将每个孔中的珠粒重悬于 150 μ L 的 DCM 中, 通过移液将其合并到单个容器中。充分混合合并的珠粒, 然后通过适当的孔中 (1mg/孔) 吸取等量, 将其重新分配到所述板中。通过施加真空去除溶剂, 并且每个孔准备用于下一个适当的步骤。对于每个另外的氨基酸偶联, 首先重复 Fmoc 脱保护步骤, 然后是与期望的氨基酸的偶联步骤。如果需要拆分和合并, 则重复合并和重新分配方法。

[0345] 这描述了一种通过拆分-合并方法在珠粒上生成 3 聚体氨基酸的方法。通过 Fmoc-Photo-Linker、4-[4-[1-(9-苄基甲氧羰基氨基)乙基]-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酸改性的 Fmoc 保护树脂 (1mg, 拉普聚合物公司, 10 μ m, TentaGel M-NH₂, 0.23mmol/g) 或任何另外的合适连接子被悬浮在 DMA (150 μ L) 中的反应器板 (默克密理博有限公司, 0.45 μ m 疏水性 PTFE) 的每个孔内。通过使用 Resprep® VM-96 真空歧管在所述板的底部施加真空来去除溶剂。通过将树脂悬浮在 150 μ L 的 5% 哌嗪和 DMF 中 2% DBU 的混合物来去除 Fmoc 保护基。用 Excel Scientific Alumna Seal 密封所述板, 并在 40°C 下摇动 15 分钟。通过施加真空去除溶剂, 并重复脱保护流程 5 分钟。过滤后, 每个孔分别用 150 μ L 的 2XDMA、3XDCM、1XDMA 洗涤, 在每次洗涤之间施加真空以去除溶剂。然后通过添加 150 μ L 的 60mM Fmoc-氨基酸、80mM Oxyma、200mM DIC 和 80mM 2,4,6-三甲基吡啶的预活化混合物 (在室温下静置 2 分钟), 用适当的 AA 对树脂的每个孔进行酰化。再次密封所述板并在 40°C 下摇动 1 小时。过滤后, 每个孔分别用 150 μ L 的 2XDMA、3XDCM、1XDMA 洗涤。对于每个另外的 AA 偶联, 首先重复 Fmoc 脱保护步骤, 然后是与期望的 AA 的偶联步骤。为了分析每个连续的偶联, 将 1mg 的珠粒的一部分悬浮在 100 μ L 的 DMSO 中, 并在 365nm LED 的全功率下暴露两个小时。过滤出树脂并将滤液注入配备有 Agilent Poroshell SB-C-18, 3.0 \times 50mm, 2.7 μ m 色谱柱的 Agilent 1100 系列 LCMS 中。在 4 分钟内以 1.2mL/min 的流速运行在 0.1% 的 TFA 水溶液中 5% 的 CH₃CN 到 0.1% TFA 中的 100 CH₃CN 的梯度, 并在 220nm 处进行监测。

[0346] 制备具有来那度胺 (**Revlimid®**) 的非氨基酸侧基的实验。脱保护后, 这将连接到最后一个氨基酸。这也是在旋转中完成的。(在 Fmoc 脱保护后), 将每个孔的树脂用 DMA 中 150 μ L 的 40mM 氯乙酸、40mM Oxyma、80mM DIC 和 40mM TMP 的混合物 (进行 5 分钟预混合) 酰化。将所述板密封并在 40°C 下摇动 1 小时。每个孔分别用 150 μ L 的 3XDMA、3XDCM 和 2XDMA 洗涤。然后将树脂重新悬浮在 100mM K₂CO₃ 和 100mM Rev 的 DMA 悬浮液中。密封所述板并在室温下摇

动3小时。分别用150uL的2X50/50DMA/水、3XDMA、3XDCM和2XDMA洗涤所述树脂。

[0347] 定义连接到给定珠粒的化合物的合成保真度。这涉及所述完整的化合物,其中所述化合物是化学文库的成员。每种化合物可以部分或全部由化学单体制成。以下是连接在给定珠粒的化合物的特征。给定珠粒可以是基于拆分和合并的化合物文库合成的产物,其中每个珠粒具有唯一的化合物。

[0348] 化学文库的成员可以通过固相合成在固相支持物(如珠粒)上合成。具有肽键的化学物质的固相合成通过使用以下两个化学基团中的一个来表征。第一个化学基团是N- α -9-芴基-甲氧基羰基(Fmoc,碱不稳定)。第二个化学基团是叔丁氧羰基(tBoc,酸不稳定)(参见,Vagner、Barany、Lam (1996)《美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.)》93:8194-8199)。Fmoc和tBoc是可用于保护肽底物的保护基团,其中Fmoc基团或tBoc基团连接到所述 α -氨基(Sigler、Fuller、Verlander (1983)《生物聚合物 (Biopolymers)》22:2157-2162)。

[0349] 优选地,在完成合成之后,结合到给定珠粒的至少99.5%、至少99.0%、至少95%、至少90%、至少85%或至少80%的化学文库成员具有完全相同的化学结构。化学文库成员的多步合成中,一个或多个步骤中可能会发生不完全偶联。由于这个原因,本公开的组合物可以通过以下限制或范围中的一个来表征和限制。

[0350] 本公开还提供了方法和试剂,其中在完成合成之后,结合到给定珠粒的至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%、或至少99%的化学文库成员具有完全相同的化学结构(这些数字确实考虑并反映了固相合成期间可能发生的错误,例如,一种不断增长的化合物无法接受一种化学单体。另外,这些数字确实考虑并反映了固相合成期间可能发生的对任何单体的化学损坏)。

[0351] 在排他性实施例中,本公开可以排除任何不满足“完全相同的结构”的上述临界值中的一个的方法或试剂。

[0352] 在替代实施例中,在一组珠粒中的两个珠粒、3个珠粒、4个珠粒、5个珠粒、约5-10个珠粒、约10-20个珠粒、约20-40个珠粒、约40-80个珠粒含有相同的化合物(不考虑固相合成期间化学单体掺入的任何错误并且不考虑有机合成期间化学单体发生的任何化学损坏)。

[0353] 点击化学简介。根据Jewett等人,点击反应定义为..那些..有选择性的,高收率的和具有良好反应动力学的反应。其组分对周围的生物环境呈惰性的点击反应的子类被称为“生物正交”(Jewett和Bertozzi (2010)《化学学会评论 (Chem.Soc.Rev.)》39:1272-1279)。“点击化学”可以用于将小单元与杂原子连接(如碳-X-碳)联结在一起。点击化学可以单独使用,或与其它类型的化学反应结合使用,以合成药物或候选药物。点击化学与组合化学所用的流程配合得很好。点击化学中的反应的特征在于高收率、不可逆、对氧或水不敏感。“点击化学”中使用的化学反应类别包含:(1)环加成反应,尤其是来自1,3-偶极族和异质狄尔斯阿尔德反应的;(2)亲核性开环反应,如与应变性杂环分子(如环氧化物、氮丙啶和环状硫酸盐)的反应;(4)非羟醛型的羰基化学;(5)碳-碳多重键的加成,如氧化反应和一些迈克尔加成反应。点击化学反应的特征在于其高的热力学驱动力,通常大于20kcal/mol,而相比之下,非点击化学反应涉及仅具有适度的热力学驱动力的形成键(Kolb和Sharpless (2003)《今日药物发现 (Drug Discovery Today)》8:1128-1137,Kolb、Finn、Sharpless (2001)《应

用化学国际版 (Angew.Chem.Int.Ed.) 》40:2004-2021)。

[0354] 四嗪和反式环辛烯 (TCO)。1,2,4,5-四嗪等四嗪可以通过狄尔斯-阿尔德环加成反应与反式环辛烯 (TCO) 反应 (Devaraj、Haun、Weissleder (2009)《应用化学国际版 (Angew.Chem.Int.) 》48:7013-7016)。

[0355] Hartwig-Buchwald胺化。Hartwig-Buchwald胺化反应可用于药物的固相合成。此胺化反应用于合成碳-氮键,其中此反应涉及:由钯催化的芳基-卤化物与胺 (R_1-NH-R_2) 生成芳基产物,其中胺取代卤化物,并且其中氨基的氮直接连接到芳环。最终结果是涉及(芳基的)碳原子与(氨基的)氮原子的产物。换句话说,所述反应将芳基卤化物转化为对应的苯胺。Hartwig-Buchwald胺化与各种胺类相容,并且非常适合组合化学 (Zimmermann和Bräse (2007)《组合化学杂志》) 9:1114-1137)。

[0356] Huisgen环加成。Huisgen 1,3-偶极环加成反应涉及炔烃和有机叠氮化物。炔烃具有结构 $R-C\equiv CH$ 。叠氮化物具有结构 $R-N^+=N=N^-$ 。铜催化剂加快了Huisgen环加成反应的速度。Huisgen反应通过“点击化学”或“点击反应”进行操作。在铜的催化下,Huisgen反应可以产生适合制成小分子药物的1,2,3-三唑核。至少在处于保护形式时,Huisgen反应与氨基酸侧链的存在相容。用1,2,3-三唑制成的分子可能具有与多肽的酰胺键相似的键,因此这些分子可以是肽键的替代物 (Angell和Burgess (2007)《化学学会评论》36:1674-1689)。

[0357] 肽核酸 (PNA)。本公开提供了用于合成肽核酸的拆分和合并化学、组合化学或固相化学的方法。肽核酸是寡核苷酸的类似物。它们抵抗核酸酶的水解。它们可以与靶RNA序列牢固结合。肽核酸进入细胞的吸收可以通过“细胞穿透肽”来增强 (Turner、Ivanova、Gait (2005)《核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 》33:6837-6849;Koppelhus (2008)《生物缀合化学》19:1526-1534)。可以通过固相合成和组合合成来制备肽核酸 (参见, Quijano、Bahal、Glazer (2017)《耶鲁生物医药期刊 (Yale J.Biology Medicine) 》90:583-598;Domling (2006)《核苷与核苷酸 (Nucleosides Nucleotides) 》17:1667-1670)。

[0358] 本公开涵盖珠粒结合的化合物,其中所述化合物仅采取一种单体的形式。例如,这种珠粒结合的化合物可以采取来那度胺的形式,或可以采取具有连接的羧酸基团的来那度胺的形式,或来那度胺的形式,其中氨基已被带有羧基的小化学部分修饰,或者其中所述化合物是来那度胺类似物,所述来那度胺类似物是来那度胺的立体异构体或对映体。

[0359] (VII) 拆分和合并以及平行合成

[0360] 这涉及使用“拆分和合并”方法来合成化合物文库,以及以下方法:其中所述“拆分和合并”方法用于同时合成珠粒结合的化合物和珠粒结合的DNA条形码。这也描述了拆分和合并以形成混合的化合物集合。在稍后的一点上,下面公开的是非氨基酸的偶联以及被聚乙二醇 (PEG) 修饰的珠粒的制备。

[0361] 本公开提供了用于产生化学文库的拆分和合并合成。在一个实施例中,该方法涉及以下步骤: (a) 将珠粒划分到不同的容器; (b) 向每个容器添加一个不同的结构单元。例如,在使用三个容器的情况下,将物种A添加到第一个容器中并进行反应,将物种B添加到第二个容器中;并且将物种C添加到第三个容器,其中所述物种共价结合到容器中任何珠粒上的连接位点; (c) 将所有珠粒汇集在一个容器中; (d) 将珠粒划分到三个容器, (e) 在每个容器中添加一个不同的结构单元,其中将物种A添加到第一个容器中,将物种B添加到第二个容器中,并将物种C添加到第三个容器中,其中所述物种共价结合到先前已被连接的第一个

物种(参见,Stockwell (2000)《生物科技趋势(Trends Biotechnol.)》18:449-455)。

[0362] 在每个化学偶联步骤之前或之后(制备化学文库成员),本公开的拆分和合并合成包含DNA条形码偶联步骤,其中该DNA条形码标识在所述步骤中偶联的化学物质。

[0363] 在排他性实施例中,本公开可以排除其中针对给定的平行合成步骤,在连接化学物质之前连接条形码的方法和试剂。相反,本公开可以排除其中针对给定的平行合成步骤,在连接条形码之前连接化学物质的方法和试剂。

[0364] 通过拆分和合并方法制备的与珠粒结合的化学文库的一个特征是,每个珠粒将仅有一种连接于其的化合物。例如,在不完全偶联的情况下,如果对于给定的拆分和合并步骤,在5,000个连接位点中只有4,000个与期望的化学物种成功偶联,则将发生某些异质性。

[0365] 平行合成。在本公开的优选实施例中,平行合成可以用于化合物和相关联的DNA条形码的有机合成。在实际实践中,超过一种化学单体对珠粒的修饰以及超过一种DNA条形码模块对同一珠粒的修饰并非是严格地平行的。在实际实践中,珠粒会再接收一个化学单元(化学单体),然后接收对所述特定化学单元进行编码的DNA条形码模块。术语“平行”是指随着化学文库单体的聚合物的增长,DNA条形码模块的聚合物也增长的事实。当所有DNA条形码模块都已连接到珠粒上以形成级联结构或正交结构时,全长DNA条形码被称为“DNA条形码”(而不仅仅是DNA条形码模块)。

[0366] 外部连接的DNA条形码数量与连接的化学文库成员总数的比率。

[0367] 这涉及珠粒的外表面和内表面。对于具有外部连接的DNA条形码(不考虑内部连接的DNA条形码的数量)和连接的化学文库成员(既连接于外表面又连接于内表面)的给定珠粒,外部连接的DNA条形码数量与连接的化学文库成员总数的比例可以是,例如约0.1:100、约0.2:100、约0.5:100、约1.0:100、约2:100、约5:100、约10:100、约20:100、约30:100、约40:100、约50:100、约60:100、约70:100、约80:100、约90:100、约1:1、约100:150、约100:200、大约100:400、大约100:600等。在排他性实施例中,本公开可以排除满足上述值中的一个的任何珠粒或任何珠粒群体。

[0368] 典型条形码的DNA条形码的均质性;典型珠粒的化学文库成员的均质性

[0369] 对于任何给定的珠粒(或对于任何珠粒群体),本公开提供了至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99.5%等的“化学文库均质性”。

[0370] 在不太严格的实施例中,本公开对于任何给定的珠粒或可替代地对于任何给定的珠粒群体提供至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%的“化学文库均质性”。

[0371] 类似地,本公开提供了上述临界值,用于评估条形码(例如DNA条形码)的均质性。

[0372] DNA条形码的均质性和化学文库成员的均质性可以按照符合实验室手册或笔记本方法部分所计划和要求的确切序列的总种群百分比来定义。

[0373] 在排他性实施例中,本发明可以排除不符合上述一个或多个上述临界值的任何试剂、组合物或方法。

[0374] 在评估一组珠粒的均质性的情况下,对于期望在整个珠粒群体上保持均质性的情况,需要考虑珠粒#1、珠粒#2、珠粒#3、珠粒#4、珠粒#5、珠粒#6、珠粒#7等的总和的均质性。

[0375] 在排他性实施例中,本公开可以排除任何珠粒或任何珠粒群体,其中DNA条形码的均质性不小于至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少

96%、至少98%、至少99.5%等。另外,在排他性实施例,本公开可以排除任何珠粒或任何珠粒群体,其中化学文库成员的均质性不小于至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99.5%等。

[0376] 内部连接的DNA条形码与外部连接的DNA条形码的比率

[0377] 在本公开的一些实施例中,可能期望制造和使用DNA条形码主要连接在外表面上的珠粒。不制备和使用带有内部DNA条形码的珠粒的一个原因是,DNA寡聚体向内部空间的渗透率低,并且DNA连接酶向内部空间的渗透率低(用于将DNA模块彼此连接以生成最终DNA条形码的连接酶)。出于测序目的,不制备和使用内部DNA条形码的原因是,对扩增最终条形码测序所需的DNA所需的酶渗透率低。不制备和使用带有内部DNA条形码的珠粒的又一个原因是要增加用于连接化学文库成员的内部空间。

[0378] 本公开提供了带有DNA条形码的珠粒,其中内部连接的DNA条形码与外部连接的DNA条形码的比率为约0.1:100、约0.2:100、约0.4:100、约0.8:100、约1:100、约2:100、约4:100、约8:100、约10:100、约20:100、约40:100、约50:100、约60:100、约70:100、约80:100、约90:100、约1:1等。

[0379] 另外,本公开提供了带有DNA条形码的珠粒,其中内部连接的DNA条形码与外部连接的DNA条形码的比率为低于0.1:100、低于0.2:100、低于0.4:100、低于0.8:100、低于1:100、低于2:100、低于4:100、低于8:100、低于10:100、低于20:100、低于40:100、低于50:100、低于60:100、低于70:100、低于80:100、低于90:100、低于1:1等。

[0380] 可以将水性悬浮液中的一组珠粒与如皮可孔阵列的基底接触,导致珠粒进入并占据皮可孔。可以调节悬浮液中的珠粒数量与基底中的皮可孔数量的比率,以达到期望的占有率。例如,如果悬浮液仅含有一个珠粒,则每个包含珠粒的皮可孔将仅含有一个珠粒,其中其余的皮可孔将不含任何珠粒。如果悬浮液含有20,000个珠粒,并且如果基底含有200,000个皮可孔,则至少180,000个皮可孔将完全没有珠粒,并且其中大多数含有珠粒的皮可孔将仅含有一个珠粒。一小部分被占用的皮可孔将含有两个珠粒。

[0381] 在值的实施例中,悬浮液中的珠粒数与皮可孔数的比率可以为约0.2:100、约0.4:100、约0.6:100、约0.8:100、约1:100、约2:100、约4:100、约6:100、约8:100、约10:100、约20:100、约30:100、约40:100、约50:100、约60:100;80:100、约100:100(与1:1相同)、约2:1、约4:1、约6:1、约8:1、约10:1等。

[0382] 在排他性实施例中,本公开可以排除在上述值或范围中的一个的任何方法或系统。

[0383] 在范围实施例中,悬浮液中的珠粒数与皮可孔数的比率可以为约0.2:100到约0.4:100、约0.4:100到约0.6:100、约0.6:100到约0.8:100、约0.6:100到约1:100、约1:100到约2:100、约2:100到约4:100、约4:100到约6:100、约0.6:100到约8:100、约8:100到约10:100、约10:100到约20:100、约20:100到约30:100、约30:100到约40:100、约40:100到约50:100、约50:100到约60:100、约60:100到约80:100;约80:100到约100:100(与1:1相同)、约100:100(与1:1相同)到约2:1、约2:1到约4:1、约4:1到约6:1、约6:1到约8:1、约8:1到约10:1等。

[0384] 在排他性实施例中,本公开可以排除在上述值或范围中的一个的任何方法或系统。

[0385] (VIII) 制造皮可孔

[0386] 用于制造皮可孔阵列板的UV光、光掩模和光刻胶的组合。可以如下制造包含许多微孔或皮可孔的板以用于本公开。简而言之,组装了三层的夹层。顶层是光刻胶。中间层是玻璃晶片。底层是光掩模。皮可孔将通过UV光从光刻胶中雕刻出来。将皮可孔从光刻胶的平板上雕刻出来后,光刻胶类似于通常的金属锅,所述金属锅含有用于烘烤松饼的杯子,并且其中锅中用于盛放松饼面糊的杯子具有斜边。UV光充当“非交叉连接子”,因为其分解光刻胶的聚合物。经UV处理后,添加溶剂以洗去经UV处理过的光刻胶,留下干净的皮可孔。

[0387] 旋转角度以创建倾斜壁。具有倾斜壁的皮可孔如下创建。光掩模具有许多孔口,其中每个孔口对应于皮可孔的期望底部尺寸。底部尺寸可以包含圆周、直径和形状,即圆形。所述孔的顶部尺寸是通过在旋转光源或旋转固定夹层的平台(光掩膜/玻璃晶片/光刻胶夹层)的同时,将倾斜的UV光朝着光掩模上的孔口引导而产生的。旋转时,光源与光掩膜/晶片/光刻胶夹层不成90度角,而是稍微偏离90度点,以便在每个皮可孔中切出倾斜壁。含有许多皮可孔的所得皮可孔阵列板可以原样使用。可替代地,皮可孔阵列板可以作为模具用于廉价地制造许多皮可孔阵列板。

[0388] Han等人描述了用于制造微孔板的设备和试剂,其中微孔具有倾斜壁(参见,Han等人(2002)《半导体技术与科学期刊(J.Semiconductor Technology and Science)》2:268-272)。描述了UV源、接触台、倾斜台和SU-8光刻胶。制造始于单面抛光的硅晶片。SU-8光刻胶以约0.10mm到0.15mm的厚度涂覆在晶片上。然后,将光刻胶在65度的热板上软烘烤10分钟,然后在95度的热板上软烘烤30分钟。使用接触台使所得的光刻胶/晶片夹层与UV掩模接触。术语“倾斜并且旋转的UV光刻”是指用于制造微孔阵列板或皮可孔阵列板的方法,其中每个孔具有倾斜壁。在本文中,所述孔的底部直径较小,并且所述孔的顶部(孔的顶部边缘与平板的平面相接)的直径较大。为了用UV光进行暴露,使用转盘并且其中UV光是倾斜的(Han等人,同上)。掩模与光刻胶接触,其中掩模中的每个孔口是圆形的。同上的Han等人的图8提供了UV光的方向、UV掩模、光刻胶结构、晶片基底和转盘的图片。Han等人描述了如何制造截锥。可以将如PDMS(聚二甲基硅氧烷)等软材料倾倒在圆锥阵列上并固化,然后剥去PDMS层,形成锥形孔。

[0389] 创建用于大规模生产皮可孔阵列板的模具。如果已制造出皮可孔阵列板,则可以将环氧树脂倾倒在板上,从而填充所有皮可孔,并将所有已填充的皮可孔与环氧树脂平台相连。环氧树脂固化后,将去除带有皮可突起阵列的固体平台(皮可突起是期望皮可孔的反面)。具有皮可突起的固体平台是可重复使用的模制件,用于制造许多皮可孔阵列板。

[0390] 由环氧树脂模具(或由任何硬质材料制成的圆锥阵列模具)制作复制品的过程被称为“热压印”。简而言之,将基材加热到其玻璃化转变温度或软化温度,此时将皮可突起的模具均匀地压在加热软化的材料上。将皮可突起作为皮可凹入转移到基材中之后,可以将模具与基底分离。本发明优选地公开了分别作为模具和基底的图案的皮可锥和皮可孔。

[0391] 描述了热压印、环氧树脂母版和如SU-8光刻胶的等光刻胶(参见Bohl等人(2005)《微型机械学与微型工程杂志(J.Micromechanics and Microengineering)》15:1125-1130,Jeon等人(2011)《生物医学微装置(Biomed Microdevices)》13:325-333;Liu、Song、Zong(2014)《微型机械学与微型工程杂志》24:文章ID:035009;del Campo和Greiner(2007)《微型机械学与微型工程杂志》17:R81-R95)。

[0392] 其它微孔板实施例。可以通过使用硅模具的热成型来制造塑料微孔阵列,其中硅模具具有微孔阵列,例如,800,000个微孔阵列。通过使用非脉冲干法蚀刻工艺,可以实现高度控制,从而形成锥形的几何形状和光滑的侧壁,并实现亚微米公差。相反,使用脉冲干法蚀刻工艺(如Bosch工艺)的方法会导致侧壁粗糙,并且蚀刻过程中无法控制横向尺寸。

[0393] 使用非脉冲干法蚀刻工艺,塑料阵列通过硅母上的热成型塑料制成,所述硅母通过使用铬掩模的非脉冲的各向同性干法蚀刻工艺产生。该过程使用三种气体:Ar、SF₆和C₄F₈。所述过程在1200到2000瓦特之间的RF功率和150瓦的偏压下进行。可以通过改变三种气体之间的气体流量,利用光滑侧壁的产生来实现硅模具锥度的微调。变化的是SF₆与C₄F₈的比率,其中改变比率的结果是例如模具的锥形壁(硅柱)以18度(非常倾斜的壁)、9度(略微倾斜的壁)或2度(几乎垂直于基底的壁)存在(参见Perry、Henley和Ramsey(2014年10月26-30日)“用于提高复制保真度的塑料微孔阵列的发展(Development of Plastic Microwell Arrays for Improved Replication Fidelity)”,第18届化学和生命科学微型系统国际会议(18th Int.Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences),德克萨斯州圣安东尼奥市(第1700-1703页))。

[0394] 在实施例中,本公开提供了包含微孔阵列的基底、阵列、网格、微流体装置等。在一个实施例中,所有微孔具有基本上相同的体积。该体积可以是约1毫微微升、约2毫微微升、约4毫微微升、约6个、约8毫微微升、约10毫微微升、约20毫微微升、约40毫微微升、约60毫微微升、约80毫微微升、约100毫微微升、约200毫微微升、约400毫微微升、约600毫微微升、约800毫微微升或约1,000毫微微升。

[0395] 而且,所述体积可以采取上述任意两个相邻值之间的范围的形式,例如,约40毫微微升到约60毫微微升的范围。另外,所述体积可以采取上述任意两个值之间的范围形式,所述值在上面的列表中彼此不紧邻。

[0396] 此外,所述体积可以为约1微微升、约2微微升、约4微微升、约6微微升、约8微微升、约10微微升、约20微微升、约40微微升、约60微微升、约80微微升、约100微微升、约200微微升、约400微微升、约600微微升、约800微微升或约1,000微微升、约2,000微微升、约5,000微微升、约10,000微微升、约20,000微微升、约50,000微微升、约100,000微微升、约200,000微微升约500,000微微升或约1,000,000微微升。另外,所述体积可以采取上述任意两个值之间的范围形式,所述值在上面的列表中彼此不紧邻。

[0397] 在排他性实施例中,本公开可以排除任何包括微孔的基底,或任何包括微孔的阵列,其中每个微孔的体积可由上述值中的一个值定义,或可由上述任意两个彼此相邻的值的范围定义,或者可以通过列表中彼此不相邻的上述任意两个值的范围定义。

[0398] 皮可孔上的球形塞(也称为封盖珠粒)。本公开针对每一个孔或基本上皮可孔阵列的每个孔提供了一种球形塞,或可替代地,多孔球形塞。所述塞的目的是将药物、候选药物、细胞内容物和代谢物保留在孔中。所述塞还有助于将皮可孔的内容物彼此隔离。球形塞可以不必是完全球形的,只要可以满足覆盖皮可孔的顶部(或开口或口)的目的即可。所述孔可以具有顶部直径和底部直径。在盖好孔之前,球形塞的直径为约10微米、约30微米、约35微米、约40微米、约45微米、约50微米、约55微米、约70微米、约90微米、约120微米或约200微米。可以通过简单地使所述塞流过皮可孔阵列来添加所述塞以覆盖皮可孔。可以使用离心、压力、搅动或其它方法将珠粒堵塞在皮可孔的顶部(或开口或口),以确保紧密密封。在一些

实施例中,可以使用溶剂来改变封盖珠粒的溶胀和/或大小。在一些实施例中,可以将封盖珠粒加载到使珠粒收缩的溶剂中,并且一旦被测定缓冲液或不同的溶剂替代,封盖珠粒就恢复到其原始大小或溶胀,从而紧密密封皮可孔。在一些实施例中,可以使用温度来使封盖珠粒溶胀或粉碎,以在皮可孔的口处获得更好的密封。在需要的地方,可以通过阶梯式皮可孔阵列中的其中一个阶梯将封盖珠粒固定在位,并防止其进一步落入皮可孔。

[0399] 封盖珠粒可以是携带本公开的化合物的相同类型的珠粒,或者可以是不同类型的珠粒。在一些实施例中,封盖珠粒实际上可以是带有珠粒本身的化合物。封盖珠粒可以用作无源盖,防止或减慢分子从皮可孔向外扩散,或者珠粒可以是活性珠粒,其中连接于封盖珠粒的功能部分可以用于从皮可孔中捕获试剂。在一些实施例中,多孔封盖珠粒可以被动地捕获从在皮可孔内部进行的基于细胞的测定中释放的代谢物。在一些实施例中,封盖珠粒可以非特异性地捕获细胞物质,如脂质、蛋白质、碳水化合物和核酸。在一些实施例中,可以用抗体功能化封盖珠粒以特异性地捕获从健康的、患病的、切割的或固定的细胞释放的蛋白质。在一些实施例中,可以用特异性地捕获细胞核酸的DNA或RNA寡核苷酸对封盖珠粒进行功能化。在一些实施例中,DNA或RNA功能化的封盖珠粒可以用于捕获从封盖的皮可孔内的细胞释放的微RNA。在一些实施例中,皮可孔含有两个珠粒、含有皮可孔内部的珠粒的化合物以及覆盖皮可孔的口的封盖珠粒。在一些实施例中,封盖珠粒也可以是带有化合物的珠粒。在一些实施例中,封盖珠粒捕获从复合珠粒释放的材料。在一些实施例中,封盖珠粒捕获从复合珠粒释放的化合物的样品。在一些实施例中,封盖珠粒捕获从复合珠粒释放的DNA条形码。在一些实施例中,封盖珠粒捕获从它们封盖的皮可孔内释放的不同类型的分析物。

[0400] 盖和皮可孔的相对硬度。优选的设备是微量滴定板,其中每个微量滴定板在其底表面中包含成千上万的皮可孔。盖适当地安置或密封每个皮可孔的能力可以是构成皮可孔的孔和皮可孔内壁的塑料的硬度相对于所述盖硬度的函数。

[0401] 塑料的硬度可以用“硬度计”值来定义。硬度被定义和测试为材料的抗压痕性。球形塞的硬度和皮可孔壁的硬度可以通过其“硬度计”来定义。硬度可以是例如约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约95或约100。在将这些硬度值中的任何一个归因于塑性物质或其它物质时,还必须说明使用了哪种标度。例如,所述标度可以是ASTM D2240类型A的标度,这用于较软的材料,或ASTM D2240类型D的标度,这用于较硬的材料(参见,《硅设计手册(Silicon Design Manual)》,第6版,奥尔布赖特技术公司(Albright Technologies, Inc.),马萨诸塞州莱明斯特市)。

[0402] 皮可孔的形状。在一些实施例中,皮可孔可以是圆柱形皮可孔,其中圆柱的直径在皮可孔的顶部和底部处大致类似。在一些实施例中,皮可孔可以具有稍微的锥度,皮可孔的顶部略大于皮可孔的底部。在一些实施例中,皮可孔可以是圆锥形皮可孔,其偏离法线的角度在1度到30度之间的任何地方。在一些实施例中,皮可孔是阶梯式皮可孔,其中所述皮可孔从顶部直径到底部直径具有不连续的阶梯(与锥形皮可孔的直径从顶部到底部平滑地变化相反)。在一些实施例中,阶梯式皮可孔在皮可孔的开口附近具有宽的圆柱体,并且在皮可孔的底部附近具有较窄的圆柱体。在一些实施例中,阶梯式皮可孔可以具有从顶部到底部的多个不连续的阶梯。在多阶皮可孔的一些实施例中,每个梯级处的直径可以大于其下方的梯级的直径。在一些实施例中,可以在阶梯式皮可孔的底部沉积小珠粒,并且可以在阶

梯式皮可孔的最顶部开口处沉积封盖珠粒。在一些实施例中,皮可孔可含有多于2个的珠粒。

[0403] 制作阶梯形皮可孔的方法。图29公开了阶梯形皮可孔。所示的实施例具有三个隔室和两个阶梯。顶部隔室是最宽的,并且被配置成用于收纳盖,在所述盖中,顶部隔室的大部分在皮可孔被封盖的情况下被所述盖占据。中间隔室被配置成主要被试剂或仅被试剂占据。试剂可包含缓冲液、酶底物、一种或多种盐以及防腐剂或稳定剂,如二硫苏糖醇、RNase抑制剂、甘油或DMSO。最下面的隔室被配置成被珠粒占据,即与DNA文库和可释放化合物偶联的珠粒。除了带有DNA条形码和可释放化合物外,同一珠粒还可以带有“应答捕获元件”。可通过阶梯式皮可孔中的其中一个阶梯将封盖珠粒固定在位,并防止其进一步落入皮可孔中。在图29中,结构1是盖,结构2是珠粒,并且结构3是顶部区域,其位于第一阶梯的上方。结构4是中间区域,其可以用于放置测定试剂。中部区域在第二阶梯的上方。中间区域的检测试剂可以扩散到最下面的区域。结构5是最下面的区域,其可以用于放置珠粒和放置一个或多个单元格。

[0404] 关于被珠粒占据的最下面的隔室的空间(假设在皮可孔中仅存在一个珠粒),珠粒的直径可以为最下面的隔室的直径(假设皮可孔是圆形孔)的约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约98%。如果皮可孔不是圆形孔,则上述值可以参考所述孔的最宽尺寸。在排他性实施例中,本公开可以排除不满足任何以上参数的任何系统或珠粒。

[0405] 进一步地,关于被珠粒占据的空间(假设皮可孔中仅存在一个珠粒),约50%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约50%的同一珠粒位于中间隔室中,其中这些参数也可以是:约55%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约65%的同一珠粒位于中间隔室中;约60%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约40%的同一珠粒位于中间隔室中;约65%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约45%的同一珠粒位于中间隔室中;约70%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约30%的同一珠粒位于中间隔室中;约75%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约25%的同一珠粒位于中间隔室中;约80%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约20%的同一珠粒位于中间隔室中;约85%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约15%的同一珠粒位于中间隔室中;约90%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约10%的同一珠粒位于中间隔室中;约95%的珠粒位于最下面的隔室中,并且约5%的同一珠粒位于中间隔室中;并且约100%的珠粒位于最下面的隔室中。为了进行这些计算,珠粒占据的空间(假设地)假定珠粒不是多孔的。在排他性实施例中,本公开可以排除不满足任何以上参数的任何系统或珠粒。

[0406] 与圆锥形和圆柱体皮可孔一样,使用模制系统是产生阶梯形皮可孔的一个优选实施例。为此,期望一种含有多层支柱阵列的模具,随后将其冲压到热塑性或其它可固化的聚合物基材上,从而形成阶梯形皮可孔的印模。可以通过多层光刻工艺来形成具有多个阶梯的分层柱状阵列,每个阶梯具有不同的直径(随着直径的增加而减小)。简而言之,通过第一掩模暴露光刻胶的第一层以交联微柱阵列的第一层。光刻胶层的第二层可以直接沉积在(先前曝光的)第一层上,第二光掩模可以用于稍后在第二光刻胶中交联第二图案等。在多层图案化的最后,可以显影抗蚀剂的叠层以洗去未交联的区域,从而留下多层柱的阵列。可以在以下找到创建多层柱状阵列的详细协议,Francisco Perdigones等人,(2011年1月8日),“用于生物医学应用的微系统技术(Microsystem Technologies for Biomedical

Applications)”,《生物医学工程(Biomedical Engineering)》,《电子趋势(Trends in Electronics)》,Anthony N.Laskovski,IntechOpen出版社。一旦创建了多层支柱阵列的阵列,就可以使用模具使用标准工艺来压印阶梯形皮可孔阵列。

[0407] 去除封盖珠粒。在许多实施例中,对封盖珠粒进行采样以研究皮可孔内的反应、分析物或对化学扰动的细胞应答是有利的。在一些实施例中,可以通过倒置皮可孔阵列并使用机械搅拌将封盖珠粒从皮可孔的口中移出。在一些实施例中,可使用溶剂使皮可孔收缩,使它们更易于从皮可孔的口中移出。在一些实施例中,可以将比封盖珠粒更高密度的液体添加到皮可孔阵列的顶部,从而使封盖珠粒由于浮力而上升并漂浮在高密度介质上。

[0408] 在一些实施例中,封盖珠粒可以彼此交联,将封盖珠粒转换成可以从皮可孔阵列的顶部剥离的封盖片。在一些实施例中,可将交联凝胶倾倒在封盖的皮可孔上方,其中交联凝胶交联到封盖珠粒以及其自身,从而使封盖珠粒嵌入到可剥离的交联片中。

[0409] 以剥离层的形式保留皮可孔的相对位置。应了解,在此实施例中,如当封盖珠粒陷入可以剥离的凝胶层中时,封盖珠粒相对于彼此以及相对于皮可孔的相对位置被保留在剥离的层中。这允许在皮可孔、皮可孔中的测定、皮可孔中的珠粒以及封盖珠粒中捕获的任何材料之间的直接连接。

[0410] 在一些实施例中,可以使用基准标记来将皮可孔阵列的相对特征定向到剥离层中的封盖珠粒。

[0411] 实现皮可孔的配准和对齐的基准标记。将皮可孔布置成不规则阵列可以轻松鉴定皮可孔阵列成像期间的位移和漂移。在一些实施例中,皮可孔以不规则的顺序布置,以便于在成像期间检测光学和机械漂移。在一些实施例中,皮可孔阵列含有基准标记以帮助鉴定成像期间的位移和漂移。在一些实施例中,基准标记是易于鉴定的形状、图案或特征,其散布在皮可孔阵列的皮可孔之间。在一些实施例中,少量的皮可孔本身可以以易于鉴定的图案布置,以在成像期间发生光学或机械漂移的情况下实现容易的配准。在一些实施例中,外部标记物,如荧光珠粒,可以洒落在皮可孔阵列上,以提供基准图案。

[0412] 无盖垫的实施例。至少以某些形式或实例,无盖垫的实施例可以采取“无盖膜”的形式。代替密封皮可孔顶部处的开口,例如,为了防止任何可能存在于皮可孔中的细胞培养基或酶测定介质的蒸发,可以通过垫子来实现密封。优选地,垫子的尺寸设置成覆盖给定皮可孔阵列中的所有皮可孔。可替代地,垫子的尺寸可以设置成覆盖阵列中皮可孔的预定部分。垫子可以固定到皮可孔板的顶部,覆盖皮可孔,并且还覆盖位于皮可孔之间的皮可孔板的大致平坦的顶表面。可以通过以下中的一种或多种方式实现牢固的接触:(i) 保持恒定的压力,例如,通过放置在垫子的顶部并充当垫子的顶部的重物的硬橡胶压板;(ii) 使用与重物相连接的垫子,如硬橡胶压板;(iii) 可逆的化学粘合剂,其可以涂敷在整个垫子上(在垫子不是吸收性垫子的情况下)。当垫子是吸收性垫子时,垫子含有被可逆的化学粘合剂围绕的圆形吸收性垫子。在本文中,垫子与皮可孔阵列接触并对齐,以使圆形吸收性垫子仅覆盖每个皮可孔的开口,而不会“溢出”所述开口以接触皮可孔板的平面。

[0413] 可提供用作与皮可孔板的基本上平坦的表面接触的垫子,以及用于皮可孔的无盖密封的膜。平板膜,如Dow Film Tex、GE Osmonics、Microdyn Nadir、Toray、TriSep、Synder、Novamem、Evonik和Aquaporin平板膜,可从华盛顿州肯特市的Sterlitech公司获得。这些包含由聚酰胺-TFC、醋酸纤维素,聚酰胺-脲-TFC、醋酸纤维素混合物、聚哌嗪酰胺-

TFC、PES、复合聚酰胺-TFC、PES、PAN、PVDF、PSUH、RC、PESH、聚醚醚酮、聚酰亚胺等制成的膜。根据分子量截留的孔径包含150Da、200Da、300Da、500Da、900Da、600Da、1,000Da、2,000Da、3,000Da、5,000Da、10,000Da、50,000Da、20,000Da、30,000Da、70,000Da、100,000Da、200,000Da、300,000Da、400,000Da、500,000Da、800,000Da、3500Da、0.005微米、0.030微米、0.05微米、0.10微米、0.20微米等。关于本公开的系统、组合物、试剂和方法,这些临界值可以允许某些类别的化合物的选择性收集,而排除其它类别的化合物。例如,上述某些膜可以允许小分子代谢物穿过吸收性垫子并被吸收性垫子吸收,同时排除蛋白质和其它大分子。对所有分子(包含水、金属离子、盐、代谢物、蛋白质和核酸)均不可渗透的平板膜也可用于本公开的系统、组合物和方法中。

[0414] 可逆的粘合可以通过“分子魔术贴”来介导,例如,含金属卟啉的聚合物与含吡啶的聚合物(Sievers、Namyslo、Lederle、Huber (2018)《聚合物快报(eXPRESS Polymer Letters)》12:556-568)。其它分子魔术贴粘合剂涉及L-3,4-二羟基苯基丙氨酸、ssDNA的互补链(共价连接到皮可孔板的平坦上表面的一种类型的ssDNA,以及共价连接到垫子的另一种类型的ssDNA)、含有邻苯二酚侧链的共聚物等(参见,Sievers等人,同上)。另外,可逆的粘合可以通过镓粘合剂来介导,其中粘合程度可以通过温度的轻微变化来控制(Metin Sitti (2016年5月18日)Switch和Stick。化学元素镓可用作新型的可逆的粘合剂,可轻松打开和关闭其粘合效力。(马普协会)Max-planck-Gesellschaft)。又另一种可逆的粘合剂可从荷兰兹沃勒的DSM-Niaga技术公司获得。

[0415] 吸收性物质(非特定吸收剂;特定吸收剂)。可掺入垫子以提供吸收特性的吸收性物质包含“分子筛”珠粒,如Sephacrose®、Sephadex®、Agarose®以及由DEAE纤维素、羧甲基纤维素、磷酸纤维素或上述的任何组合制成的离子交换珠粒,所有这些结合到一个吸收性垫子中。吸收性配体包含用于高压液相色谱法(HPLC)的那些(参见,加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐(BioRad)目录)。特定吸收剂包含应答捕获元件,如poly(dT),其可以通过与polyA尾杂交来捕获mRNA。另外,应答捕获元件包含外显子靶向性RNA探针、抗体和适体。这些的每个或任何组合可以共价连接到垫子上,以形成吸收性垫子,其中使吸收性垫子接触皮可孔的顶表面能够捕获可能位于皮可孔内部的水性测定培养基或水性细胞培养基。

[0416] (IX) 将珠粒沉积到皮可孔中

[0417] 带有皮可孔的板可以采取96孔板的形式,其中这些96个孔中的每个孔都含有数千个皮可孔。另外,带有皮可孔的板可以采取24孔板的形式,其中这些24个孔中的每个孔都含有数千个皮可孔。对于96孔板,可以使用0.1-0.2mL的珠粒在水中或水溶液中的悬浮液填充每个孔。对于24孔板,可以使用约0.5mL的珠粒在水中或水溶液中的悬浮液填充每个孔。可以使用带有一次性吸头的普通移液管添加悬浮液。悬浮液中珠粒的数量可以是导致约三分之一的皮可孔仅含有一个珠粒,约三分之一的皮可孔含有两个珠粒,以及约三分之一的皮可孔不含珠粒或含有多于两个珠粒。另外,悬浮液中珠粒的数量可以导致以下情况:在确实含有一个或多个珠粒的孔中,至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%的这些孔中仅包含一个珠粒。

[0418] 珠粒沉降后,可以通过将移液管吸头接触96孔板的每个孔的壁,或通过移液管吸头接触24孔板的每个孔的壁并抽出来去除多余的液体。

[0419] 关于测定试剂,在将皮可孔用于进行反应的情况下,例如DNA测序、生化测定或培

养细胞的测定,可以将测定试剂添加到已经含有沉降珠粒的皮可孔中。如上所述,用移液管添加测定试剂,用于珠粒悬浮液的初始添加。在测定试剂与每个皮可孔中已经存在的溶液平衡之后,96孔板的96个孔中的每个孔中的多余溶液或24孔板的24个孔中的每个孔中的多余溶液可以用移液管吸头引出,所述移液管吸头与96孔板的96个孔中的每个孔的壁接触,或者与24孔板的24个孔中的每个孔的壁接触。

[0420] 皮可孔阵列的流动池实施例。皮可孔阵列可以是流动池的一部分,其中带有入口和出口的射流室安装在皮可孔阵列的顶部。在此实施例中,本公开的珠粒、细胞和其它测定材料可以从入口流入并通过出口流出。当珠粒流过流动池时,可使用重力或离心力将珠粒嵌入皮可孔。

[0421] (X) 对皮可孔中的珠粒结合的核酸进行测序

[0422] 珠粒结合的核酸可以在仍然连接到珠粒的情况下进行测序。可替代地或另外,可以在从珠粒上切割DNA条形码之后对珠粒结合的核酸进行测序。

[0423] 测序前从珠粒切割DNA条形码。在一些实施例中,本公开可以涵盖以下方法,其中从珠粒切割珠粒结合的DNA条形码,从而在扩增之前、测序之前或任何类型的序列鉴定技术(如与核酸探针杂交)之前以可溶形式释放DNA条形码。

[0424] 排他性实施例。在实施例中,本公开可以排除任何方法、相关联的试剂、系统、组合物或珠粒,其中在扩增之前、测序之前或在任何类型的序列鉴定技术(如与核酸探针杂交)之前,理解珠粒结合的DNA条形码。另外,本公开可以排除任何方法,其中在扩增之前、测序之前或在任何类型的序列鉴定技术(如与核酸探针杂交)之前,切割包括DNA条形码的多核苷酸,或切割仅包括DNA条形码的一部分的核酸。

[0425] 聚合酶链反应(PCR);定量PCR(qPCR)。PCR方法和qPCR方法依据3步骤方法,所述方法包括:(1)在高温下使DNA模板变性,在降低的温度下退火引物,最后通过DNA合成扩展引物,如DNA聚合酶催化的那样(Gadkar和Filion(2014)《分子细胞生物学当前问题(Current Issues Mol.Biol.)》16:1-6)。qPCR也被称为“实时PCR”(Kralik和Ricchi(2017)《微生物前沿(Frontiers Microbiology)》第8页(9页))。

[0426] PCR方法和qPCR方法的最新修改或改进包含使用解旋酶依赖性(HDA)扩增、使用内部扩增对照、使用锁定核酸(LNA)以及使用结合抑制剂的添加剂(Gadkar和Filion(2014)《分子细胞生物学当前问题》16:1-6)。锁定核酸具有以极高的精度识别并结合其靶标的优势。

[0427] qPCR可以同时扩增和定量靶向的DNA分子。qPCR方法比较了应答曲线达到特定荧光阈值所需的扩增循环数(Pabinger、Rodiger、Kriegner(2014)《生物分子检测定量(Biomolecular Detection Quantification)》1:23-33)。Refsland等人提供了进行qPCR的明显典型条件的简要说明(Refsland、Stenglein、Harris(2010)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》38:4274-4284)。

[0428] 可提供指导用于设计和验证PCR引物,以及如退火温度(T_a)、解链温度(T_m)、延伸步骤温度、缓冲液类型等变量(Bustin和Huggett(2017)《生物分子检测定量》14:19-28)。

[0429] 滚环扩增(RCA)。连接到珠粒的DNA可以扩增。扩增形式的DNA比未扩增的DNA更容易测序。在滚环扩增方法中,将DNA标签(DNA条形码)制成单链的。一旦成为单链的,则添加夹板寡核苷酸以桥接标签DNA的端,然后延伸并连接夹板寡核苷酸。使用DNA聚合酶(负5'→

3'核酸外切酶活性) 确保DNA催化夹板寡核苷酸的延伸后可连接。然后可以通过添加链置换DNA聚合酶(如phi29 DNA聚合酶) 对环化的DNA进行滚环扩增。在DNA条形码标签上执行滚环扩增(RCA) 的能力允许使用可能对DNA造成损害的合成化学, 因为任何存活的DNA分子都可以被热扩增到足够的数量, 易于测序。DNA可以通过外切核酸酶消化、产生切口、并在高温下熔化、或用氢氧化钠处理制成单链的。

[0430] 滚环扩增(RCA) 的更多细节由以下可用于进行RCA的步骤揭示。

[0431] 步骤一: 从珠粒结合的ssDNA开始。如果珠粒结合的DNA最初是来自(dsDNA) 的双链, 则可以制备不用于RCA的链, 以便在珠粒连接端上或其附近用尿嘧啶(U) 的残基替换胸腺嘧啶(T) 的残基。如果以这种方式制备dsDNA, 则可以使用尿嘧啶-N糖苷酶切割尿嘧啶残基, 从而留下不稳定的糖磷酸酯(作为DNA主链的一部分), 其中此不稳定的位置可通过核酸酶处理(Ostrander) 进行切割(Ostrander等人(1992)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》89:3419-3423)。

[0432] 步骤二: 将“夹板寡核苷酸”添加到珠粒结合的ssDNA中。对夹板寡核苷酸进行设计, 使其在ssDNA(共价连接到珠粒) 的端(5'端) 与约10-20个碱基对杂交, 并使其在珠粒结合的ssDNA的自由端(3'端) 也与约10-20个碱基对杂交。夹板寡核苷酸不需要使ssDNA的珠粒结合的端与珠粒结合的ssDNA的自由端紧邻。所需要的只是将珠粒结合的ssDNA序列的远端拴在一起, 以形成一个巨大的环。

[0433] 步骤三: 添加硫化叶菌DNA聚合酶IV, 以便该聚合酶使用ssDNA的巨大环作为模板, 以创建互补的巨大环, 所述环在一端共价连接到夹板寡核苷酸上。

[0434] 步骤四: 使用DNA连接酶共价闭合互补的巨大环, 其中所得结果为环状ssDNA。在RCA期间, 正是这种封闭的ssDNA循环进行了“滚动”。

[0435] 步骤五: 添加具有链置换活性的DNA聚合酶, 并添加dNTP。所添加的DNA聚合酶将dNTPs共价连接到珠粒结合的ssDNA上, 并且扩展了珠粒结合的ssDNA的端, 以创建“滚环”上的内容的互补拷贝, 然后进一步延伸以创建又另一种互补“滚环”上的内容的互补副本, 甚至进一步扩展以创建“滚环”上的内容附仍一个补充副本。在此潜在的无限扩增过程中, DNA聚合酶的链置换活性使DNA聚合酶的持续活性成为可能。

[0436] 任选地, 本公开的方法包含: 通过荧光分子信标实时监测滚环扩增(RCA) (Nilsson、Gullberg、Raap(2002)《核酸研究》30:e66(7页))。用于RCA的试剂可从西格玛奥德里奇公司(密苏里州圣路易斯)、德国海德堡的Sygnis TruePrime技术公司(TruePrime®RCA试剂盒) 和通用医疗集团(GE Healthcare) (TempliPhi 500®扩增试剂盒) 获得。荧光团和淬灭剂可从赛默飞世尔科技公司(加利福尼亚州卡尔斯巴德)、分子探针公司(Molecular Probes) (俄勒冈州尤金)、卡曼化学公司(Cayman Chemical) (密歇根州安阿伯) 和西格玛奥德里奇公司(密苏里州圣路易斯) 获得。

[0437] 步骤六. 使用通过RCA扩增的ssDNA作为PCR扩增的模板, 在其中添加引物, 在其中添加热稳定的DNA聚合酶, 并且其中随后通过下一代测序对PCR产物进行测序。

[0438] 在本公开的一个方面中, 在制备PCR产物的PCR扩增之前, 从珠粒切割RCA扩增的ssDNA。在本公开的另一个方面, 可以在不从珠粒上切割RCA扩增的ssDNA的情况下进行制备PCR产物的PCR扩增。

[0439] 如Baner等人所描述的, “通过RCA反应, 可以生成代表环化分子补体的许多串联拷

贝的链”(Baner、Nilsson、Landegren (1998)《核酸研究》26:5073-5078)。枯草芽孢杆菌 phi29 DNA聚合酶是一种合适的酶,因为它具有链置换活性和高生产力。Li等人类似地将 RCA的特征定为:在RCA中,环状模板通过具有...链置换特性的DNA聚合酶phi29等温扩增。长的单链DNA产物含有成千上万个重复序列:(Li和Zhong (2007)《分析化学 (Anal.Chem.)》79:9030-9038)。

[0440] 对本公开的DNA条形码进行的测序可以在不暗示任何限制的情况下使用Vander Horn的美国专利第8,632,975号进行,所述专利通过引用整体并入本文。另外,本公开的DNA条形码可以例如通过使用合成测序的方法(如Sanger测序方法)或通过使用“下一代测序”的方法来测序。

[0441] 用于DNA测序的Illumina方法。用于DNA测序的Illumina方法如下。DNA可以通过超声处理进行分片到100-400碱基对(bp)的尺寸范围(Hughes、Magrini、Demeter (2014)《遗传学公共科学图书馆 (PLoS Genet.)》10:e1004462)。在Illumina方法中,制成了DNA文库,其中来自一个细胞或从多个细胞中的DNA的片段通过DNA衔接子(连接到片段的端)改性。反应产物采取夹层的形式,其中要测序的DNA位于夹层的中心。反应产物采取以下形式:(第一衔接子)-(要测序的DNA)-(第二衔接子)。然后将衔接子-DNA-衔接子复合体与又一个衔接子结合,其中该另一个衔接子共价连接到固体表面。固体表面可以是平板。固体表面有许多从平整表面伸出的衔接子的菌苔。衔接子具有与夹层中的衔接子中的一个互补的DNA序列。实际上,菌苔含有两种类型的衔接子,其中一种衔接子结合(杂交)到复合体中衔接子中的一个,并且非共价地将复合体拴在板上。这些可以被称为“第一菌苔结合衔接子”和“第二菌苔结合衔接子”。DNA聚合酶的首要任务是,使用拴系的(但非共价结合的)DNA作为模板,创建子链,当DNA聚合发生时,子链的形式共价连接到“第一菌苔结合衔接子”。该共价键是通过DNA聚合酶的催化作用产生的。子链完全合成后,端(伸出培养基的端)含有与上述的夹层中第二个衔接子互补的DNA序列。这种互补的DNA序列允许新合成的子代DNA的端弯曲并与“第二菌苔结合衔接子”杂交。上面已经描述了如何使用夹层的两个衔接子,以及如何使用“第一菌苔结合衔接子”和“第二菌苔结合衔接子”。

[0442] 然后执行反应循环很多次,其中结果是原始dsDNA的扩增版本簇。实际上,所述簇采取共价连接(栓系)的ssDNA分子的形式,其中所有这些ssDNA分子仅对应于原始dsDNA(从活细胞或组织中分离出的dsDNA)的一条链。栓系的ssDNA分子的该簇被称为“聚合酶群落”。通过称为“桥式扩增”的技术来产生聚合酶群落。最终,在桥式扩增和形成聚合酶群落之后,将共价连接到固体表面的反向链从其系链上切割下来、洗掉并丢弃,仅留下正向链。

[0443] Illumina®方法的信息可从以下获得:Goodwin、McPherson、McCombie (2016)《自然综述遗传学 (Nature Rev.Genetics)》17:333-351,Gierahn、Wadsworth、Hughes (2017)《自然方法 (Nature Methods)》14:395-398,Shendure和Hanlee (2008)《自然生物技术 (Nature Biotechnology)》26:1135-1145;Reuter、Spacek、Snyder (2015)《分子细胞 (Molecular Cell)》58:586-597;“通过合成进行Illumina测序”(YouTube上的5分钟视频)。

[0444] 通过寡核苷酸连接和检测进行测序(SOLiD测序)。SOLiD可测量染料标记分子的荧光强度,以确定DNA片段的序列。DNA片段的文库从要测序的样品制备并用于制备克隆珠粒群体(各磁珠的表面上只有一个物种片段)。连接到珠粒的片段被赋予了通用的P1衔接子序列,因此每个片段的起始序列都是已知且相同的。进行PCR,然后将连接到珠粒的所得PCR产

物共价结合到玻片。

[0445] 然后,引物杂交到模板库中的P1衔接子序列。一组四个荧光标记的双碱基探针竞争与测序引物的连接。通过查询每个连接反应中的每个第1个和第2个碱基来实现双碱基探针的特异性。进行连接、检测和切割的多个循环,其中循环数决定了最终的读取长度。在一系列的连接循环之后,去除延伸产物,并用与n-1位置互补的引物重设模板以进行第二轮连接循环(参见Wu等人(2010)《自然方法》7:336-337)。

[0446] 基于pH的DNA测序。基于pH的DNA测序是一种系统和方法,其中,碱基掺入是通过测量氢离子确定的,氢离子是聚合酶催化的延伸反应的副产物。将各自具有可操作结合的引物和聚合酶的DNA模板加载到反应室或微孔中,然后进行脱氧核苷三磷酸(dNTP)添加和洗涤的重复循环。DNA模板是作为克隆群体连接到固体支持物上的模板。通过每个这样的掺入,氢离子被释放,大量模板共同释放氢离子,从而导致反应室的局部pH发生可检测到的变化(参见Pourmand(2006)《美国国家科学院院刊》103:6466-6470)。本公开可以排除基于pH的DNA测序。

[0447] 关于级联DNA条形码,可以一次运行中对整个级联DNA条形码进行测序(其中对整个级联DNA条形码进行的测序仅需要一个测序引物)。可替代地,可以对组成级联DNA条形码的某些或所有DNA条形码模块进行单独的测序(每个单独测序的DNA条形码模块都有自己的测序引物)。关于正交DNA条形码,构成正交DNA条形码的每个DNA条形码模块都需要自己的专用测序引物,因为每个DNA条形码模块都连接到珠粒自己的位点上。

[0448] 排他性实施例。在实施例中,本公开可以排除任何系统、装置、装置的组合和方法,其涉及微流体、驻留在油介质中的水性液滴、以及所创建的水性液滴,其中含有水试剂的第一通道与含有油的第二通道连接以创建水性液滴,所述水性液滴通过第三通道从连接区域开始穿过油介质。描述了微流体装置和试剂(参见例如Brouzes、Medkova、Savenelli(2009)《美国国家科学院院刊》106:14195-14200;Guo、Rotem、Hayman(2012)《芯片实验室(Lab Chip)》12:2146-2155;Debs、Utharala、Balyasnikova(2012)《美国国家科学院院刊》109:11570-11575;Sciambi和Abate(2015)《芯片实验室》15:47-51)。

[0449] 在其它排他性实施例中,可以排除的是包括“DNA头片”的任何试剂、组合物、核酸或珠粒,或共价连接到“DNA头片”的任何试剂、组合物、核酸或珠粒。MacConnell、Price、Paegel(2017)《美国化学学会组合科学杂志》19:181-192,提供了DNA头片的实例,其中珠粒被叠氮基DNA头片部分功能化。

[0450] 与测序方法和测序试剂有关的其它排他性实施例。在实施例中,本公开可以排除试剂、系统或方法,所述试剂、系统或方法不涉及DNA测序中“可逆终止子”的使用。另外,可以排除的是不包含甲氧基保护基团的任何试剂、系统或方法。而且,可以排除的是涉及DNA测序的任何试剂、系统或方法,但是其中在检测和收集多核苷酸顺序信息时,被测序的DNA并未共价结合到珠粒。此外,可以排除的是在进行测序反应之前扩增DNA模板的任何试剂、系统或方法,例如通过PCR技术或滚环技术的扩增。在实施例中,可以排除的是任何级联的条形码编码(例如核酸条形码编码)的方法(有关驻留在单个核酸上的化学文库成员的合成的所有信息)。在另一方面,可以排除的是任何正交的条形码编码(例如核酸条形码编码)的方法(关于化学文库的给定单体的合成的信息分散在珠粒上的多个连接位置上)。在与DNA连接酶有关的排他性实施例中,本公开可以排除使用DNA连接酶用于连接核酸条形码的模

块的任何试剂、系统或方法。

[0451] 荧光团、淬灭剂和基于FRET的测定。本公开提供了用于筛选化学文库的成员或用于表征化学文库的分离的成员的荧光团和淬灭剂。FRET是**Förster**共振能量转移。

[0452] 可以在珠粒结合的化学文库中进行分析。另外,可在从珠粒进行切割后不久对游离化学文库成员进行测定,即在与珠粒相同的微孔中进行或在与珠粒相同的水凝胶基底附近进行测定。而且,可以对从未连接到任何珠粒或已经从珠粒上切割然后纯化的可溶性化学文库成员进行测定。

[0453] 适合用作本公开的试剂的荧光团包含Alexa 350、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 633、A647、Alexa 680、荧光素、太平洋蓝、香豆素、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 660、ATT0655、ATT0647n、Setau-665 (伊利诺伊州乌尔班纳的SETA生物化学公司)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、四甲基罗丹明 (TMR)、德克萨斯红、四氯荧光素 (TET)、六氯荧光素 (HEX) 以及乔染料 (4'-5'-二氯-2',7'-二甲氧基-6-羧基荧光素)、SYBR green I (吸收497nm,发射520nm)、6-羧基荧光素 (6-FAM) (吸收492nm,发射518nm)、5-羧基荧光素 (5-FAM) (吸收492nm,发射518nm)、FITC和若丹明。淬灭器包含TAMRA淬灭剂、黑洞淬灭剂1 (BHQ1)、黑洞淬灭剂2 (BHQ2) 和DABCYL淬灭剂。请注意,如本专利文件中其它地方所公开的,TAMRA可以是荧光团,也可以是淬灭剂。

[0454] 有关基于FRET的测定的试剂的指南,其中FRET试剂包含荧光团和淬灭剂 (参见Johansson (2006) “选择报告子-淬灭剂对以进行有效淬灭 (Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching)”《分子生物学方法 (Methods Mol.Biol.)》335:17-29)。基于FRET的测定的实例包含测量信号肽酶 (SpsB) 与底物“SceD肽”的活性。连接到肽的FRET对是4- (4-二甲基氨基苯基偶氮) 5- ((2-氨基乙基) 氨基) -1-萘磺酸 (参见Rao等人 (2009) 《欧洲联合生化学会杂志 (FEBS J.)》276:3222-3234)。另一个实例来自使用肽底物KVSLNFPIL的HIV-1蛋白酶的测定。供体/受体FRET对是EDANS (供体) 和DABCYL (受体)。EDANS荧光可以通过共振能量转移到非荧光DABCYL而被DABCYL淬灭 (参见Meng等人 (2015) 《生物分子筛选期刊》20:606-615)。又另一个实例来自肉毒杆菌毒素的测定。SNAP-25的活性可以通过使用底物BoNT-A进行测量。对于基于FRET的测定,底物具有N端连接的荧光素-异硫氰酸酯 (FITC) 并且C端连接的淬灭剂是4- (4-二甲基氨基苯基) 二氮烯基苯甲酸 (DABSYL)。肽底物对应于SNAP-25的氨基酸190-201 (参见Rasooly和Do (2008) 《应用和环境微生物学 (Appl.Environ.Microbiol.)》74:4309-4313)。

[0455] 本公开提供了用于筛选化合物文库的试剂、组合物和方法,以发现和鉴定酶抑制剂、酶活化剂,并发现可以提高给定蛋白质的体内降解速率的化合物。这些试剂、组合物和方法可以使用基于FRET的测定,并且可替代地,可以使用基于FRET的测定以外的测定。

[0456] 描述了分子信标 (参见Baruch、Jefferey、Bogyo (2004) 《细胞生物学的发展趋势 (Trends Cell Biology)》14:29-35)。分子信标是一种试剂,其中荧光团通过连接子与淬灭剂结合。连接子可以被核酸酶切割,从而测量核酸酶活性。本公开提供了用于筛选化学文库以鉴定核酸酶抑制剂,并且可替代地,以鉴定核酸酶活化剂的方法。Feng等人描述了使用分子信标和基于FRET的测定法来测量各种核酸酶的活性 (Feng、Duan、Liu (2009) 《德国应用化学会刊 (Angew Chem.Int.Ed.Engl.)》48:5316-5321)。Feng等人示出了使用基于FRET的测定来测量各种限制性酶的活性。

[0457] (XI) 释放珠粒结合的化合物

[0458] 可切割连接子。提供了不可切割连接子。另外,提供了可切割连接子(参见Holmes和Jones (1995)《有机化学杂志(J.Org Chem.)》60:2318-2319;Whitehouse等人(1997)《四面体通讯》38:7851-7852以及Yoo和Greenberg (1995)《有机化学杂志》60:3358-3364,如由以下所引用的:Gordon等人(1999)《化学技术与生物技术杂志(J.Chem.Technology Biotechnology)》74:835-851)。可切割连接子还包含驻留在碱性水解的酰基磺酰胺连接子,以及在温和条件下切割的活化的N-烷基衍生物,以及基于芳基-硅键的无痕连接子,以及基于甲硅烷基醚键的无痕连接子(描述于Gordon等人(1999)《化学技术与生物技术杂志》的第839页和第842页74:835-851)。此外,提供了基于酒石酸的连接子,其在切割时产生C端醛,其中切割是通过高碘酸盐氧化(参见Paulick等人(2006)《组合化学杂志》8:417-426)。

[0459] 图3公开了适用于本发明的组合物和方法的各种可切割连接子。图3摘自以下文献的表1:Yinliang Yang (2014)“可切割连接子的设计及其在化学蛋白质组学中的应用(Design of Cleavable Linkers and Applications in Chemical Proteomics)”慕尼黑工业大学生物化学专业。从图3可知,本公开优选的可切割连接子是连接子a、c、d、p、q、r和t。连接子p用于本文公开的实验结果。这些的切割条件是DTT(连接子a)、 Na_2SO_4 (连接子c)、 Na_2SO_4 (连接子d)、UV光(连接子p)、UV光(连接子q)、UV光(接连接子r)和TEV蛋白酶(连接子t)。这些特定的切割条件是温和的,并且预计不会损坏珠粒,不会损坏珠粒结合的化合物或不会损坏珠粒结合的化合物的任何化学文库成员(单元)。

[0460] 与点击-化学相容的可化学切割连接子。Qian等人(2013)描述了许多与点击化学相容的可切割连接子(Qian、Martell、Pace (2013)《化学生物化学(ChemBioChem.)》14:1410-1414)。这些包含具有偶氮键的连接基,其中偶氮键可被连二亚硫酸盐切割。该连接子具有以下结构: R_1 -苯1-N=N-苯₂- R_2 。第一苯环具有与 R_1 处于对位的羟基,并且第二苯环具有与 R_2 连接的羰基,其中该羰基与偶氮基部分处于对位。

[0461] 光不稳定的可切割连接子。本公开涵盖具有邻硝基苄基基团的可光切割连接子。可以通过在330-370nm处照射来切割此基团(参见,Saran和Burke (2007)《生物缀合化学》18:275-279;Mikkelsen、Grier、Mortensen (2018)《美国化学学会组合科学杂志》DOI:10.1021)。与邻硝基苄基连接子相比,光解时间短的连接子是2-(2-硝基苯基)-丙氧羰基(NPPOC)连接子。邻硝基苄基连接子的变化是邻硝基苄基氨基连接子。当连接到肽链时,并且随后被切割时,此连接子释放酰胺。可以使用带有邻硝基苄基基团的连接子,与未经取代的邻硝基苄基连接子相比,这些具有较短的光解时间和更高的释放产率。苯甲酰基连接子、安息香连接子和新戊酰基连接子也是可用的(参见Mikkelsen等人(2018)《美国化学学会组合科学杂志》DOI:10.1021)。

[0462] 具有光可切割的醚键的连接子是可用的。可以使用该光可切割连接子,其中连接子连接到珠粒并且可切割基团为“R基团”,并且在切割后,所释放的基团采取ROH的形式(参见Glatthar和Giese (2000)《有机快报(Organic Letters)》2:2315-2317)。具有光可切割酯键的连接子也是可用的(参见Rich等人(1975)97:1575;Renil和Pillai (1994)《四面体通讯》35:3809-3812;Holmes (1997)《有机化学杂志》62:2370-2380,如Glatthar和Giese,同上所引用的)。连接子中的醚键可以通过酸、碱、氧化、还原和氟化物敏感的甲硅烷基-氧键切割和光解作用切割(Glatthar和Giese,同上)。

[0463] 已经用于连接肽(R_1)和核酸(R_2)的另一种光可切割连接子如下。 R_1 直接连接到苄基的亚甲基部分。与亚甲基基团处于对位的是环连接的硝基基团。亚甲基部分的间位是环连接的乙基。乙基的1-碳带有磷酸盐。 R_2 基团连接到该磷酸盐的氧原子(Olejnik等人(1999)《核酸研究》27:4626-4631)。

[0464] Akerblom等人公开了 α 连接子-甲基2-硝基苄基型的光不稳定连接子,含有氨基、羟基、溴和甲基,以及4-硝基苯氧活化的羟基和氨基基团(参见Akerblom和Nyren(1997)《分子多样性(Molecular Diversity)》3:137-148)。组织蛋白酶B可以切割具有靶序列“缬氨酸-瓜氨酸”的连接子(Dal Corso、Cazzamalli、Neri(2017)《生物缀合化学》28:1826-1833)。

[0465] 酶可切割连接子。可用如蛋白酶等酶切割的连接子(参见Leriche、Chisholm、Wagner(2012)《生物有机化学与医药化学(Bioorganic Medicinal Chem.)》20:571-582)。可以用胰凝乳蛋白酶切割羟甲基苯氧基连接子(Maltman、Bejugam、Flitsch(2005)《有机生物分子化学(Organic Biomolecular Chem.)》3:2505-2507)。可用烟草蚀刻病毒蛋白酶切割的连接子(参见Weerapana、Speers、Cravat(2007)《自然实验手册(Nature Protocols)》2:1414-1425;Dieterich、Link、Graumann(2006)《美国国家科学院院刊》103:9482-9487)。连接子序列LVPRG和LVPRGS可以被凝血酶切割(Jenny、Mann、Lundblad(2003)《蛋白质表达纯化(Protein Expression Purification)》31:1-11)。可用纤溶酶切割的连接子(Devy、Blacher、Noel(2004)《美国实验生物学会联合会杂志》18:565-567)。

[0466] 珠粒结合的释放监测器。本公开提供了新颖且独特的释放监测器,其能够评估珠粒结合的化合物的释放。释放监测器采取荧光团和淬灭剂的珠粒结合复合体的形式,其中荧光团通过可切割连接子与珠粒相连。优选地,可切割连接子是光可切割连接子。优选地,珠粒结合的释放监测器位于专用的皮可孔中,所述皮可孔中不含任何其它类型的珠粒。切断光可切割连接子后,荧光团会从珠粒中释放出来,扩散到皮可孔中的介质中,与珠粒结合的淬灭剂保持一定距离,其中结果是荧光的增加与释放的数量成正比。荧光的增加允许计算皮可孔中的游离荧光团的浓度,并且更重要的是,允许计算从位于其它孔中的其它珠释放的化合物的量。

[0467] 总而言之,珠粒结合的释放监测器位于其自己的专用孔中,其中其它孔中含有珠粒结合的化合物,所述化合物为候选药物。

[0468] 图8公开了珠粒结合的释放监测器的优选且非限制性实例的简化形式。释放监测器采取淬灭剂的形式,所述淬灭剂被固定在荧光团附近,从而导致荧光团淬灭。在实施例中,淬灭为至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%、至少99.9%、至少99.95%等。在皮可孔中,一个珠粒专门用作释放监测器,而另一个珠粒或另一些珠粒用于连接化合物和DNA文库。将皮可孔中的所有珠粒暴露于UV光会导致荧光团和化合物的同时切割.QSY7是优选的淬灭剂.QSY7的结构和CAS号如下(如下所示):

[0469] CAS名称/编号:咕吨鎗,9-[2-[[4-[[[2,5-二氧-1-吡咯烷基)氧基]羰基]-1-哌啶基]磺酰]苯基]-3,6-双(甲基苯基氨基)-,氯化物304014-12-8

[0470] 由淬灭剂中的荧光团分离引起的荧光增加可以用于推断同时释放的化合物在皮可孔中的浓度。另外,由淬灭剂中的荧光团分离引起的荧光增加可以用于推断以自由形式

驻留在皮可孔中的分子(分子以化合物形式存在,所述化合物以前是珠粒结合的化合物)的数量。在更优选的实施例中,释放监测器包括淬灭剂和荧光团,其中切割导致释放荧光团(而不释放淬灭剂)。与下面的较不优选的实施例相比,该实施例提供较低的背景噪声。在较不优选的实施例中,切割导致淬灭剂的释放,其中读数采取来自珠粒结合的荧光团增加荧光的形式。

[0471] 在UV诱导的化合物从珠粒中释放出来之后,释放监测器向用户提供了可溶化合物的浓度的度量。在优选的实施例中,一种类型的珠粒专用于作为释放监测器。“专用”是指该珠粒不含珠粒结合的化合物,也不含珠粒结合的DNA文库。

[0472] 作为一般的建议,仅因为化合物已经通过光敏连接子的切割而从珠粒中释放出来,就不能推断所述化合物已经变成可溶的化合物。首先,请注意,仅因为化合物被认为是“疏水的”或被认为是“水不溶性”,并不意味着没有分子在溶剂中自由移动。例如,即使胆固醇在水中也具有可测量的溶解度(参见Saad和Higuchi (1965) “胆固醇的水溶性 (Water Solubility of Cholesterol)”《药物科学杂志 (J. Pharmaceutical Sciences)》54:1205-1206)。此外,通过表面活性剂、清洁剂、添加剂(如DMSO)或载剂(如人血清白蛋白)可以提高珠粒结合的水不溶性化合物的生化功效。因此,在皮可孔含有上述试剂中的一个试剂,或者可替代地,在水不溶性化合物在皮可孔内部培养的活细胞的质膜附近释放的情况下,释放监测器可以用于评估水溶性有限或无水溶性化合物的总体浓度。

[0473] 图9公开了珠粒结合的释放监测器的优选实施例的简化形式,而图10公开了珠粒结合的释放监测器的该优选实施例的完整和详细结构。

[0474] 图30提供了证明使用珠粒结合的释放监测器的数据,其中珠粒在皮可孔中。珠粒结合的荧光团(使用光可切割连接子结合)为TAMRA(激发波长530nm;发射波长570nm)。图示出了从珠粒释放荧光团的时程。这示出了珠粒结合的释放监测器的操作,在 $t=0$ 秒, $t=1$ 秒, $t=11$ 秒以及 $t=71$ 秒时获取荧光数据。图30还包含示出四个较小图中的两个的较小图的放大的插图。通过将组织蛋白酶-D(一种天冬氨酰蛋白酶)与“肽Q-Fluor底物”和珠粒一起温育得到图30。将试剂置于4℃的孔中。使用365nm的紫外光从珠粒上切割荧光团,从而释放荧光团并将其与淬灭剂分离。该测定的目的是评估在单独的孔中发生的释放的时间过程,其中单独的孔含有不同类型的珠粒。不同类型的珠粒具有相同的光可-切割连接子,但是该光可切割连接子连接到胃酶抑素-A上。胃酶抑素-A的释放可以结合到并抑制在相同测定培养基中的天冬氨酰蛋白酶。这种结合珠粒结合的抑肽酶-A和天冬氨酰蛋白酶的设置可以用作阳性对照。

[0475] UV通过20倍物镜曝光。通过增益=5获得图像;曝光为400毫秒。在530nm处在TAMRA处激发。TAMRA在570nm处发射。

[0476] 图35公开了酶促测定的更多细节,其中释放了珠粒结合的胃酶抑素-A,并且其中所释放的胃酶抑素-A导致酶抑制。显示光致胃酶抑素-A(阳性对照)和共价的Cy5标记的10 μ m的TentaGel珠粒与显示在PBST缓冲液中的光切割的Fmoc-缬氨酸(阴性对照)的10 μ m的TentaGel珠粒混合。将此珠粒群体引入皮可孔,然后将缓冲液交换到蛋白酶抑制测定中,包含组织蛋白酶D蛋白酶和肽Q-Fluor底物($\lambda_{\text{ex}}=480\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=525\text{nm}$)。孔被空气包封,整个玻片暴露于UV(365nm, 77J/cm²),切割光不稳定连接子,释放出化合物以达到大约13 μ M。温育流动池(30分钟, 37℃)。含有阳性对照珠粒的孔应抑制组织蛋白酶D的肽蛋白水解,从而导

致低荧光信号。含有阴性对照珠粒的孔不应示出任何组织蛋白酶D抑制,并且荧光强度应与空孔相似。

[0477] 对于给定的化学物质,淬灭剂和荧光团的术语可能会发生变化,取决于紧邻区域内的其它化学物质。尽管在珠粒结合的释放监测器的实验室数据中使用的TAMRA是荧光团,但在其它上下文中,TAMRA可以是淬灭剂。TAMRA在含有FAM和TAMRA的 **TaqMan®** 探针中充当淬灭剂。

[0478] 实验设置和实验室数据的另外说明。本公开提供了在填充的皮可孔内的磷酸盐缓冲液(10mM磷酸盐、154mM钠、pH 8.0)中被空气隔开的受控5(6)-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)浓度的数据。捕获的荧光图像(曝光时间分别为10毫秒、2毫秒),并通过平均像素强度($n \geq 100$)对孔区域进行定量,以生成浓度与荧光强度的校准曲线。以上数据采取标准曲线的形式,示出了在各种预定浓度的游离TAMRA(2mM、10mM、30mM、60mM、100mM TAMRA)下的荧光。该标准曲线是在两种不同条件下制备的,即在2毫秒曝光或10毫秒曝光下拍摄摄影图像。用于制备标准曲线的实验是在皮可孔中进行的,但是该实验中没有使用任何珠粒(只是已知数量的TAMRA)。所述摄影图像未在该专利文件中示出,因为数据仅采取标准曲线的形式,所述标准曲线也可以被称为校准曲线。

[0479] 实验设置包含以下内容。对于方案X),TentaGel-Lys(PCL1-Tamra)-QSY7珠粒结构。QSY7(灰色)淬灭了Tamra荧光团(橙色),同时通过光可切割连接子(紫色)共价连接到珠粒。UV(365nm)的照射提供原位化合物的定量释放。

[0480] 图31A公开了天冬氨酰蛋白酶在淬灭剂荧光团底物上的催化作用的照片。图31B公开了在天冬氨酰蛋白酶在淬灭剂荧光团底物上的催化作用之后产生的发射数据。更大的荧光意指所述酶更具催化活性。较少的荧光意指所述酶的催化活性较低,也就是说,所述酶被一种游离的抑制剂更多地抑制,其中抑制剂从珠粒中释放出来,并且其中通过切割光可切割连接子获得了自由。在UV释放和组织蛋白酶D测定温育后($\lambda_{ex}=480nm, \lambda_{em}=525nm$)捕获图像。含有阳性对照珠粒的孔可以通过Cy5荧光团进行光谱鉴定($\lambda_{ex}=645nm, \lambda_{em}=665nm$,橙色假色)。用横跨开放孔体积的线条图分析切片,包含阴性对照珠粒的孔不引起组织蛋白酶-D抑制。含有阳性对照珠粒的孔中的检测体积暗,表明强烈的抑制作用。空孔内的测定体积可与含有阴性对照珠粒的孔相媲美。

[0481] 图32示出了以下流程。进一步关于方案X),将皮可孔基底(每孔46pL)封闭在流动池中,将孔在真空下润湿,引入TentaGel-Lys(PCL1-TAMRA)-QSY7珠粒的悬浮液,并使空气通过流动池,分隔每个孔(顶部)。在以荧光显微镜图像对所释放的化合物(TAMRA)浓度(底部)进行定量之前,用具有受控光通量的UV LED($\lambda_{mean}=365nm$)照射流动池,允许其平衡(20分钟)(图32)。详细地说,图32示出皮可孔的横截面图,展示了皮可孔在流动池中弄湿的步骤,将悬浮液中的珠粒引入皮可孔的步骤(使得每个皮可孔一个珠粒),跨过流动池抽出空气以减少过量的分散溶液的步骤(导致弯液面掉落到皮可孔板的平面顶表面以下),受控UV暴露(365nm)的步骤(导致一些TAMRA释放),以及通过荧光显微镜检测荧光信号(激发531/40nm)(发射594/40nm)激发TAMRA发光的步骤。记号“斜线40”指的是带宽,即,它意指截止滤波器将光限制在以下范围内:531nm加上20nm以及减去20nm,并且对于594nm,加上20nm以及减去20nm(此斜杠记号可以用于激发波长,并且也可用于发射波长)。

[0482] 本发明人获得了示出以下数据的照片(见图33)。在皮可孔流动池中暴露于UV LED

(365nm) 后,从10 μ m TentaGel-Lys (PCL1-TAMRA) -QSY7珠粒中释放的荧光团 (TAMRA) 的荧光发射 (λ_{ex} 531/40nm, λ_{em} 593/40)。A) 由于QSY7的FRET淬灭作用,在暴露于UV之前 (0J/cm²) 没有高于背景的明显发射。在暴露于 (B) 25J/cm²、(C) 257J/cm²、(D) 489J/cm²、(E) 721J/cm²、(F) 953J/cm²的UV后使TAMRA释放达到平衡 (20分钟),然后使用适当的曝光时间成像。在每个珠粒周围的体积内测量了荧光发射,以测量TAMRA浓度 (图33)。记号“斜线40”是指带宽,即,它意指截止滤波器将光限制在以下范围内:531nm加上20nm以及减去20nm (此斜杠记号可以用于激发波长,并且也可用于发射波长)。

[0483] 以下是本发明人对来自测试和使用珠粒结合的释放监测器 (参见图34) 的一些荧光数据的解释。暴露于UV (365nm) 后,皮可孔 (45pL) 中释放的珠粒释放的TAMRA浓度。图像分析使用珠粒填充孔周围溶液的平均像素强度 ($n \geq 14$),将其归一化为图像曝光时间,然后与皮可孔中已知TAMRA浓度的标准曲线相关。误差棒代表1 σ ,从RSD%计算。UV释放的化合物浓度为1.1 μ M (RSD%8.9)、54.3 μ M (RSD%5.2)、142 μ M (RSD%4.2)、174 μ M (RSD%7.7)、197.3 μ M (RSD%10.1) (图34)

[0484] (XII) 化合物的生化测定 (不是基于细胞的测定)

[0485] 使用皮可孔内的珠粒可以进行各种生化测定。非限制性实例包含结合测定、酶测定、催化测定、基于荧光的测定、基于发光的测定、基于散射的测定等。下面详细说明实例。

[0486] 对蛋白酶和肽酶抑制剂敏感的生化测定。如果目标是检测然后研发抑制蛋白酶的化合物,则筛选测定可以使用特定蛋白酶或肽酶、合适的可切割基底以及基于颜色的测定或基于荧光的测定 (对候选药物化合物的抑制程度敏感) 的混合物。例如,一种试剂可以是珠粒结合的化合物,其中所述化合物的活性尚未经过测试。另一种试剂可以采取珠粒结合的胃抑素 (一种已确立的HIV-1蛋白酶抑制剂) 的形式 (Hilton和Wolkowicz (2010)《公共科学图书馆:综合》5:e10940 (7页))。又另一种试剂可以是HIV-1蛋白酶的可切割底物,并且其中被HIV-1蛋白酶裂解时会导致颜色变化或荧光变化。在特定分析 (在给定的微孔中) 导致颜色差异 (或荧光差异) 的情况下,鉴定出了阳性筛选候选药物。可切割底物采取易感肽的形式,所述肽与淬灭剂和荧光剂共价结合并且与其侧接。切割前,由于附近的淬灭剂,荧光团不会发出荧光,但是切割后,荧光会实现 (参见Lood等人 (2017)《公共科学图书馆:综合》12:e0173919 (11页);Ekici等人 (2009)《生物化学》48:5753-5759;Carmona等人 (2006)《自然实验手册》1:1971-1976)。本公开的试剂和方法涵盖以上公开的技术。

[0487] 用于抑制泛素连接酶的化合物的基于酶的筛选测定,其中试剂包含MDM2 (酶) 和 p53 (底物)。申请人基于以下技术进行了工作测试。MDM2调节细胞中p53的量。MDM2在某些癌症中过表达。MDM2是一种酶,如以下陈述所示:“体外研究已示出,纯化的MDM2.足以泛素化...p53” (Leslie等人 (2015)《生物化学期刊》290:12941-12950)。申请人的目的是发现MDM2的抑制剂,其中预期这些抑制剂降低p53的泛素化并因此减少随后的p53降解。考虑到细胞中p53的预期增加,预期具有上述性质的抑制剂可用于治疗癌症。

[0488] 申请人使用以下基于酶的测定评估来那度胺对MDM2/HDM2介导的p53泛素化的影响。申请人使用了以下试剂盒中的试剂:MDM2/HDM2泛素连接酶试剂盒—p53底物 (波士顿生物化学公司 (Boston Biochem), 剑桥, 马萨诸塞州)。测定中使用的试剂中的一个试剂是带有共价结合的抗体的珠粒。珠粒是TentaGel[®]M NH₂ (目录号M30102, 拉普聚合物公司, 德国), 并且抗体是在小鼠中生物合成的抗人p53单克隆抗体。MDM2是一种E3连接酶,其可以使

用p53作为底物,其中MDM2催化p53的泛素化。

[0489] 激活p53减少癌症的目标。以下描述暗示了MDM2,被称为“p53”的转录因子与抗癌治疗之间的关系。所述描述为:“MDM2是泛素化p53的E3泛素连接酶,将其靶向于蛋白酶体降解”(Ortiz、Lozano (2018)《致癌基因 (Oncogene)》37:332-340)。p53具有肿瘤抑制活性。MDM2可以抑制p53活性。根据Wu等人,MDM2是“p53结合蛋白”(参见Wu、Buckley、Chernov (2015)《细胞死亡和疾病 (Cell Death Disease)》6:e 2035)。如果化合物通过例如阻止MDM2和p53之间的相互作用来阻止p53的泛素化,则预期所述化合物发挥抗癌药的作用。

[0490] 筛选测定的目的。筛选测定的目的是发现影响p53泛素化的化合物,例如,刺激p53泛素化的化合物和抑制p53泛素化的化合物。详细地说,所述目的是发现进行抑制或激活的化合物,其中它们的作用是通过MDM-2和E1连接酶、E2连接酶或E3连接酶进行。MDM2意指“鼠双微粒体”。MDM2被称为“E3泛素连接酶”。当MDM2发生在细胞中时,有证据表明其催化p53泛素化的活性需要许多其它蛋白质,如CUL4A、DDB1和RoC1 (参件Banks、Gavrilova (2006)《细胞周期 (Cell Cycle)》5:1719-1729;Nag等人 (2004)《癌症研究 (Cancer Res.)》64:8152-8155)。Banks等人已经将涉及p53和MDM2的物理相互作用描述为“发现L2DTL、PCNA和DDB1/CUL4A复合体与p53肿瘤抑制和它的调节器MDM2/HDM2进行物理相互作用”(Banks、Gavrilova (2006)《细胞周期》5:1719-1729)。Nag等人还将涉及p53和MDM2的物理相互作用描述为“Cul4A充当E3连接酶,并通过泛素蛋白酶体途径参与多种调节蛋白的蛋白水解”。在本文,我们示出了Cul4A与MDM2和p53缔合(Nag等人 (2004)《癌症研究》64:8152-8155)。

[0491] 来自p53泛素化调节剂的基于珠粒的测定的期望读数。其中筛选化合物导致阳性筛选击中,即存在更多AF488荧光时,这意指已经发现活化剂。并且其中筛选化合物导致阳性筛选击中,即在荧光减少时,这意指已经发现抑制剂。抑制p53泛素化的化合物表明所述化合物可以用于治疗癌症。另外,特异性抑制p53泛素化的化合物,即所述化合物不抑制其它蛋白的泛素化,或所述化合物对其它蛋白的泛素化的抑制不如对p53严重,也表明所述化合物可以用于治疗癌症。

[0492] 材料。材料包含来自波士顿生物化学公司的E3连接酶试剂盒K-200B。波士顿生物化学公司的目录将该试剂盒描述为:Mdm2/HDM2泛素连接酶试剂盒—p53底物。以下涉及Mdm2,其是该试剂盒的一部分。该试剂盒不包含cereblon。来那度胺和类似化合物可以与cereblon或Mdm2结合,其中最终结果是激活泛素连接酶。材料还包含25mm×75mm的Diamond White Glass显微镜玻片(新泽西州帕拉默斯的Globe Scientific公司)。康宁(Corning)搅拌器/热板(设置从零到十)698瓦特,型号PC-420。N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)。甲基四嗪(mTET)。AlexaFluor488 (AF488) (赛默飞世尔科技公司)。TentaGel珠粒M NH₂ (目录号M30102) (拉普聚合物公司)。封口膜(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)。图8示出了Alexa Fluor®488的结构。有关AlexaFluor488-纳米金-链霉亲和素(纽约州亚普汉克的Nanoprobe公司)的信息示出了Fluor 488 (AF488)的结构。

[0493] (XIII) 化合物的基于细胞的测定

[0494] 在皮可孔中进行的基于细胞的测定可以使用人类细胞、非人类细胞、人类癌细胞、非人类癌细胞、细菌细胞、寄生虫细胞(如疟原虫细胞)。另外,基于细胞的测定可以用“被杀死但具有代谢活性的”人类细胞或非人类细胞进行,也就是说,它们的基因组已经交联以允许新陈代谢但防止细胞分裂(参见Dubensky的美国专利出版号2007/0207170,其全部内容

通过引用合并于此)。而且,可以对凋亡细胞、坏死细胞或死细胞进行基于细胞的测定。细菌细胞的基于细胞的测定可以用于筛选抗生素。感染了病毒的人类细胞可以用于筛选抗病毒试剂。提供了细胞组合以用于基于细胞的测定。例如,提供树突细胞和T细胞的组合以筛选和鉴定刺激抗原呈递或可替代地,削弱抗原呈递的化合物。

[0495] 基于细胞的测定可以基于细胞的原代培养,例如,从正常组织的活检、实体瘤或血液学的活检或循环的实体瘤细胞的活检中获得的细胞。另外,基于细胞的测定可以基于已经传代一次或多次的细胞。

[0496] 在皮可孔中进行的基于细胞的测定可以使用仅含有一个细胞或含有两个细胞、三个细胞、四个细胞、五个细胞或约2个细胞、约3个细胞、约4个细胞、约5个细胞或多个细胞、或至少3个细胞、少于4个细胞、少于5个细胞等的培养物。

[0497] 申请人基于以下技术进行了工作测试。这描述了用于筛选示例性实施例化合物的基于细胞的测定,其中来那度胺(测试化合物)抑制泛素介导的转录因子蛋白水解。转录因子包含Ikaros和Aiolos。

[0498] 本公开提供了一种基于细胞的测定,所述测定筛选珠粒结合的化合物上的化合物,并且其中筛选是使用带有多个皮可孔的平板进行的。基于细胞的测定的组分包含皮可孔,其用于容纳珠粒结合的化学文库,其中每个珠粒基本上只连接一种均匀类型的化合物。所述化合物通过可切割连接子释放。哺乳动物细胞在皮可孔中培养。皮可孔还包含培养基。目前使用来那度胺的非限制性实例是原理论证实例,其可以用于筛选化学文库,以发现调节给定靶蛋白泛素化的其它化合物。

[0499] 对基于细胞的测定的简短描述。重组细胞用作检测和筛选诱导绿色荧光蛋白(GFP)蛋白水解的化合物的试剂,其中鉴定阳性筛选化合物的读数是以下情况:绿色细胞变为无色细胞或绿色减少的细胞。关于这种基于细胞的测定的机制,来那度胺导致绿色细胞变为无色细胞或绿色减少的细胞的作用机制是来那度胺与被称为“cereblon”的蛋白质结合。在细胞中,cereblon是被称为“E3泛素连接酶”的蛋白质的复合体的一部分。Cereblon是抗癌药物来那度胺、沙利度胺和泊马度胺的直接靶标。E3泛素连接酶的正常和组成活性及其与cereblon的关系被描述为“cereblon.通过参与E3泛素连接酶来促进[靶蛋白质的]的蛋白酶体降解”..(参见Akuffo等人(2018)《生物化学期刊》293:6187-6200)。与E3泛素连接酶的正常活性相反,当加入如来那度胺、沙利度胺或泊马度胺等药物时,结果是“来那度胺、沙利度胺和泊马度胺.e18556通过E3泛素连接酶促进[s].底物的泛素化和降解.这些药物中的每种药物会诱导转录因子IKZF1和IKZF3的降解”(Kronke等人(2015)《自然(Nature)》523:183-188)。

[0500] 关于术语,cereblon已经被描述为蛋白质复合物的一部分,所述蛋白质复合物被称为“E3连接酶”,并且也被称为“E3泛素连接酶”。通常,cereblon本身不被称为“E3连接酶”。以下摘录揭示了如何使用“cereblon”一词。根据Akuffo等人(2018)《生物化学期刊》293:6187-6200,“与沙利度胺结合后,.E3连接酶底物受体cereblon.通过参与DDB1-CUL4A-Roc1-RBX1 E3泛素连接酶来促进[底物的]蛋白质组破坏”。一致地,Yang等人(2018)《生物化学期刊》293:1014110157公开了“Cereblon.充当cullin 4RING E3连接酶的底物受体以介导蛋白质[底物]泛素化”。Zhu等人(2014)《血液(Blood)》124:536 545,指出“沙利度胺与CRBN[cereblon]结合以改变E3泛素连接酶复合体的功能,.所述复合物由CRBN、DDB1和CUL4

组成”。Lopez-Girona等人(2012)《白血病(Leukemia)》26:2326-2335,指出“研究确定E3连接酶蛋白cereblon(CRBN)为..沙利度胺..的直接分子靶标。CRBN和..DDB1与Cul4A和Roc1形成功能化E3连接酶复合体”。

[0501] 要查看申请人设计和使用的基于细胞的测定的概况,第一步是将来那度胺添加到细胞中。最后一步是IKZF1和IKZF3的降解。当IKZF1作为与GFP的融合蛋白出现时,最后一步是整个融合蛋白被蛋白酶体降解。类似地,当IKZF3作为与GFP的融合蛋白出现时,最后一步是该整个融合蛋白被蛋白酶体降解。GFP降解的结果是,曾经是绿色荧光细胞的细胞变成了非荧光细胞。

[0502] 对基于细胞的测定的详细描述。这涉及E3泛素连接酶的蛋白质名称(蛋白质复合体)、与该复合体结合的蛋白质名称以及作为该复合体的靶标的蛋白质名称。对于这些名称,已发表的文献是不一致的。有时用蛋白质的名称来指代蛋白质,并且有时用对蛋白质进行编码的基因的名称来指代蛋白质。因此,以下描述将蛋白质名称与基因名称一起使用,如“cereblon”(蛋白质名称)和“CRBN”(基因名称)。另外,“Ikaros”是蛋白质名称,而基因名称是IKZF1。另外,“Aiolos”是蛋白质名称,而IKZF3是基因名称。“Cullin-环指连接酶-4”是蛋白质名称,并且基因名称是CUL4。“cullin-1的调节子”是蛋白质名称,并且基因名称是ROC1。ROC1也称为RBX1(Jia和Sun(2009)《细胞分裂(Cell Division)》4:16.DOI:10.1186。“Cullin-4A”是蛋白质名称,并且基因名称是CUL4A。参见Schafer、Ye、Chopra(2018)《风湿病年鉴(Ann.Rheum.Dis.)》DOI:10.1136;Chen、Peng、Hu(2015)《科学报告》5:10667;Matyskiela等人(2016)《自然》535:252-257;Akuffo等人(2018)《生物化学期刊》293:6187-6200)。

[0503] E3泛素连接酶催化泛素残基转移到靶蛋白,其中结果是靶蛋白被送到蛋白酶体进行降解。E3连接酶催化泛素与靶蛋白的一个或多个赖氨酸残基的连接。人类表达约617种不同的E3泛素连接酶(参见Shearer等人(2015)《分子癌症研究(Molecular Cancer Res.)》13:1523-1532)。E3泛素连接酶是这些蛋白质的复合体:DNA损伤结合蛋白-1(DDB1);Cullin-4(CUL4A或CUL4B);Cullins-1(Roc1)的调节子;以及RING Box-域蛋白(RBX1)。如上所述,Roc1与RBX1是同一蛋白质(参见Jia和Sun(2009)《细胞分裂》4:16.DOI:10.1186)。当cereblon(CRBN)加入E3泛素连接酶复合体时,所得的较大复合体被称为:CRL4^{CRBN}(Matyskiela等人(2016)《自然》535:252-257)。术语“CRL4”意指“Cullin-4 RING连接酶”(Gandhi等人(2013)《肝脏病学杂志(J.Haematol)》164:233-244;Chamberlain等人(2014)《自然结构和分子生物学(Nature Struct.Mol.Biol.)》21:803-809)。阅读cereblon的文献时,需要考虑上述术语的差异。

[0504] 以下是以上公开的简短摘要的较长版本。下面示出的是术语的另一种形式,即术语:“CRL4^{CRBN} E3泛素连接酶”。较长的描述更全面地集成各种名称和细胞性活动。cereblon(CRBN)与E3泛素连接酶复合体之间的关系已描述为:“cereblon(CRBN)通过参与DDB1-CUL4A-Roc1-RBX1 E3泛素连接酶来促进[靶蛋白的]蛋白酶体降解”(Akuffo等人(2018)《生物化学期刊》293:6187-6200)。关于抗癌药,来那度胺、沙利度胺和泊马度胺.通过E3泛素连接酶促进.底物的泛素化和降解。这些化合物结合CRBN, CRL4^{CRBN} E3泛素连接酶的底物衔接子,这些药物中的每种药物诱导.转录因子IKZF1和IKZF3降解”(Kronke等人(2015)《自然》523:183-188)。

[0505] 这涉及基于细胞的测定,其中任何给定的微孔、纳米孔或皮可孔含有珠粒,其中珠粒具有共价连接的化合物,其中所述化合物通过可切除连接子连接,并且其中所述孔含有一个或多个培养的哺乳动物细胞。可以通过一种或多种生物标志物评估对本公开的化合物和对候选药物的应答。

[0506] 生物标志物包含诊断性生物标志物、预测特定患者是否会对特定药物产生反应(变得更好)的生物标志物以及预测特定患者是否会对特定药物产生不可接受的毒性的生物标志物(Brody, T. (2016)《临床试验:研究设计、终点和生物标志物、药物安全性以及FDA和ICH指南(Clinical Trials: Study Design, Endpoints and Biomarkers, Drug Safety, and FDA and ICH Guidelines)》,第2版,加利福尼亚州圣地亚哥的爱思唯尔公司(Elsevier))。本公开利用了又另一种生物标记物,即在药物治疗已经开始之后监测患者对给定药物的反应的生物标记物。例如,以下涉及生物标志物peroxiredoxin6 (PRDX6)和肺癌。根据Hughes等人,“与媒介相比,在用吉非替尼治疗后,细胞系的细胞培养基中的PRDX6水平升高”。PRDX6随时间的累积与吉非替尼敏感性呈正相关。血清PRDX6水平. 在治疗的最初24小时内显着增加。吉非替尼治疗期间,血清PRDX6的变化. 提供了. 优于基于成像的策略来监测抗EGFR药物反应的优势”。请注意评论,生物标志物比更直接衡量应答功效有优势,即,使用“成像”来检测肿瘤大小和数量的减少(Hughes等人(2018)《癌症标记物(Cancer Biomarkers)》22:333-344)。监测对抗癌药物的应答的其它生物标志物包含监测卵巢癌对铂治疗的应答的CA125以及监测卵巢癌对化疗的应答的血清HSPB1(参见Rohr等人(2016)《抗癌研究(Anticancer Res.)》36:1015-1022;Stope等人(2016)《抗癌研究》36:3321-3327)。

[0507] 细胞因子表达。可以通过测量表达的细胞因子,如IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 来评估应答。可以使用金纳米结构(带有特异性地识别这些细胞因子中的一个细胞因子的抗体)来同时测量这些特定的细胞因子,其中检测涉及等离子体共振(Spackova、Wrobel、Homola(2016)《IEEE论文集(Proceedings of the IEEE)》104:2380-2408;Oh等人(2014)《ACS纳米(ACS Nano.)》8:2667-2676)。可以在包含微孔的装置中通过荧光抗体来测量由单个细胞(如单个T细胞)表达的细胞因子(Zhu、Stybayeva(2009)《分析化学》81:8150-8156)。以上方法可用作本公开的试剂和方法。

[0508] 在一些实施例中,细胞因子的抗体可以连接到皮可孔的壁,其中作为药物暴露的函数,从细胞释放或差异释放的任何细胞因子可以被结合到皮可孔的壁的抗体捕获。所捕获的细胞因子可以通过第二组标记抗体来鉴定。在一些实施例中,细胞因子的抗体可以连接到封盖珠粒。然后可以将封盖珠粒嵌入到交联的水凝胶片中,所述交联的水凝胶片可以被剥离并进行进一步的分析,例如,通过ELISA、质谱仪或其它分析技术。

[0509] 细胞凋亡。可以使用表面增强拉曼光谱(SERS)和局部表面等离子体共振(LSPR)来测量单细胞凋亡的实时数据以及细胞凋亡的早期事件(参见Stojanovic、Schasfoort(2016)《传感与生物传感研究(Sensing Bio-Sensing Res.)》7:48-54;Loo、Lau、Kong(2017)《微型机械(Micromachines)》8:338。DOI:10.3390)。Stojanovic,同上,检测细胞色素C、EpCam和CD49e从细胞中的释放。Loo等人,同上,测量细胞色素C从细胞的释放,其中检测涉及DNA适体(该DNA适体的作用类似于抗体)。Zhou等人使用SERS检测单细胞的早期凋亡,其中所测量的是细胞膜上的磷脂酰丝氨酸(参见Zhou、Wang、Yuan(2016)《分析家

(Analyst)》141:4293-4298)。除了收集有关凋亡的数据外,SERS还可以用于通过收集有关有丝分裂的阶段、代谢物释放、结合到质膜的生物分子的表达的数据来评估药物活性(参见Cialla-May等人(2017)《化学学会评论(Chem.Soc.Rev.)》46:3945-3961)。等离子体共振可以测量细胞凋亡中发生的蛋白质变性和DNA片段化(参见Kang、Austin、El-Sayed(2014)《ACS纳米》8:4883-4892)。等离子体共振(SERS)可以通过测量 α 螺旋形式与 β 折叠形式的有丝分裂蛋白的百分比来区分癌细胞和正常细胞(Panikkanvalappil、Hira、El-Sayed(2014)《美国化学会志》136:159-15968)。以上方法适合作为本公开的试剂和方法。

[0510] 还可以通过不使用等离子体共振的方法,而是使用利用抗切割的半胱天冬酶-3抗体的免疫细胞化学方法来测量所培养的细胞的凋亡(Shih等人(2017)《分子癌症疗法(Mol.Cancer Ther.)》16:1212-1223)。

[0511] 有关基于细胞的测定的一般信息。本公开的基于细胞的测定可以用于测试来自人类癌细胞、实体瘤细胞、血液癌症细胞、人类干细胞、人类肝细胞、致病菌、传染性细菌、感染了细菌的人类细、感染了病毒的人类细胞等的应答。所述测定可以检测细胞的形态应答,如迁移,以及遗传应答和生化应答。

[0512] 可以设计本公开的测定以检测位于皮可孔内部的细胞的应答,或检测位于皮可孔外部的细胞的应答,如位于营养液培养基中,所述营养培养基位于皮可孔阵列上方。另外,本发明的测定可以设计成检测细胞的应答,其中细胞和珠粒位于培养基中,其中细胞位于培养基中,并且珠粒位于培养基上方或下方,其中细胞位于培养基的顶部并且珠粒位于培养基上方或内部或下方。

[0513] 本公开提供了皮可孔阵列的细胞群体。在实施例中,至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约40%、至少约60%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、或至少约100%的细胞群体位于皮可孔内部(而不是位于皮可孔上方的任何区域)。在实施例中,驻留在孔内的细胞的比例可以是约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、大约60%、大约70%、约80%、约90%、约95%、约100%或在这些数字中的两个限定的任何范围内,如“大约60%到约90%,其余位于孔阵列的上方的营养培养基的层中”。

[0514] 细胞矩阵。对于细胞的生物活性测定,其中细胞暴露于从珠粒释放的化合物或细胞暴露于珠粒结合的化合物,合适的基质包含包括以下中的一种或多种的那些:聚-D-赖氨酸(PDL)、聚-L-赖氨酸(PLL)、聚-L-鸟氨酸(PLO)、玻连蛋白、骨桥蛋白、胶原蛋白、含有RGD序列的肽、含有RGD序列的多肽、层粘连蛋白、层粘连蛋白/纤连蛋白复合体、层粘连蛋白/巢蛋白复合体等。合适的基质还包含可从康宁公司获得的产品,如PuraMatrix® Peptide Hydrogel®、Cell-Tak®细胞和组织粘合剂、Matrigel®等。参见《康宁生命科学(Corning Life Sciences)》(2015)《康宁细胞培养表面(Corning Cell Culture Surfaces)》,图克斯伯里,马萨诸塞州(20页),De Castro、Orive、Pedraz(2005)《微包封期刊(J.Microencapsul)》22:303-315。在排他性实施例中,本公开可以排除包含上述基质中的一个或上述聚合物中的一个的任何组合物或方法。

[0515] 在实施例中,本公开提供了一种阵列,其中单个皮可孔含有珠粒、一个或多个细胞,以及溶液(无任何基质)或基质或溶液和基质的组合。基质可以是水凝胶、聚赖氨酸、玻连蛋白、MatriGel®等。

[0516] 可以进行珠粒结合的化合物或珠粒释放的化合物的活性。评估活性的测定可以包含激活或抑制酶,激活或抑制细胞信号级联或单个细胞信号蛋白,与抗体(或与抗体的互补性决定区(CDR)结合,与抗体的可变区结合)结合,抑制配体或底物与酶(或与抗体或与抗体的可变区)的结合。

[0517] 对于上述测定,可以通过荧光测定确定读数,例如,涉及与淬灭剂(F-Q)连接的荧光团。所述连接子可以被设计成通过内切蛋白酶、DNA酶、RNA酶、或磷脂酶切割(参见 Stefflova、Zheng (2007)《生物科学前沿 (Frontiers Bioscience)》12:4709-4721)。术语“分子信标”是指这类F-Q分子,但是,“分子探针”也用于指通过杂交诱导F和Q分离的构建体,如 **TaqMan®**测定(Tyagi和Kramer (1996)《自然生物技术 (Nature Biotechnol.)》14:303-308;Tsourkas、Behlke、Bao (2003)《核酸研究》15:1319-1330)。

[0518] 应答于药物暴露的转录谱分析。本公开的DNA条形码可以被修饰以含有应答捕获元件,其中应答捕获元件捕获细胞对由条形码的编码部分编码的扰动的应答。在一些实施例中,DNA条形码可以终止于聚-T区段(胸腺嘧啶核苷的多个重复),而聚-T序列可以用于捕获从裂解细胞释放的聚-A封端的mRNA。在一些实施例中,应答捕获序列可以与感兴趣的基因互补,从而通过与该实施例的珠粒杂交来捕获期望基因的表达谱。在一些实施例中,皮可孔可以含有单细胞皮可孔,其转录谱被捕获在珠粒上。在一些其它实施例中,多个细胞可以在其转录谱被捕获的皮可孔中包含。

[0519] 在一个示例性的工作流程中,可以遵循以下流程来捕获细胞对药物的转录应答。(a)提供了设计用于捕获每孔的单个细胞的皮可孔。(b)将载有化合物的DNA条形码珠粒引入皮可孔,以使每个皮可孔中存在一个珠粒。(c)通过适当的方法在每个皮可孔中的珠粒上释放化合物(通过UV可切割连接子连接的化合物的UV处理,在珠粒浸入化合物中的情况下的扩散,酸可切割、碱可切割、温度可切割等,适合于该实施例的珠粒)。(d)皮可孔可以通过将内容物保留在皮可孔中的封盖珠粒相互隔离,或通过其它方式(如,皮可孔顶部的气障或油栏)隔离。(e)在从珠粒释放的化合物存在下,使皮可孔中的细胞温育一段时间。(f)在一段适当的时间后,例如1小时、2小时、5小时、9小时、12小时、15小时、18小时、一天、3天、一周、两周、一个月或另一个合适的基于测定的时间,通过裂解方法裂解细胞。裂解方法可以涉及添加去污剂、重复循环的冷冻和解冻、加热、添加破膜肽、机械搅拌或其它合适的方式。(g)一旦裂解,细胞的内容物就会暴露在皮可孔内的珠粒上,这时,皮可孔的珠粒上的应答捕获元件便能够捕获其指定的应答。在一些实施例中,应答捕获是聚-T序列,其捕获每个皮可孔内的一个细胞(或多个细胞)的完整mRNA谱。在一些实施例中,将应答捕获元件设计成从细胞捕获特异性DNA或RNA序列。在一些实施例中,可以根据化合物的剂量(或浓度)来捕获细胞的转录应答。

[0520] (XIV) 细胞的扰动应答分析

[0521] 本文所描述的方法可包含扰动文库和细胞文库。在一些实施例中,扰动和细胞在密闭环境中温育。在温育期间或之后,可以将标识扰动的条形码(“扰动条形码”)转移到与之温育的细胞中。所述方法可以进一步包含从扰动释放(即,分离或去除)细胞,以及使细胞经受第二限制,在第二限制中捕获细胞内容物以及扰动条形码。在一些实施例中,第二限制可含有细胞特异性条形码,其可用于随后研究细胞内容物和扰动条形码,从而使扰动与细胞应答相关。

[0522] 在一些实施例中,本文描述的方法可以包含两个反应,即由扰动条形码编码的扰动反应和测量反应。在扰动反应中,可以对细胞进行扰动。在测量反应中,可以测量由于扰动引起的细胞应答。在一些实施例中,测量反应可以包含测量条形码。在其它实施例中,所述方法可以包含将扰动条形码带到测量反应中,并捕获测量条形码和包含在测量反应中的扰动条形码,从而使扰动与细胞应答相关。

[0523] 本文所描述的方法可以包含由扰动条形码编码的扰动反应。扰动反应包含使细胞经受扰动,然后测量细胞对所经受的扰动的细胞应答。可以在测量细胞应答之前或之后对扰动条形码进行解码,从而将扰动的身份与所测得的细胞应答相关。

[0524] 在一些实施例中,所述方法包含提供DNA编码的、珠粒结合的化合物文库,其中化合物可以从珠粒中释放,使DNA编码的、珠粒结合的化合物文库与细胞文库接触,其中所述接触可以通过将珠粒限制在第一有限体积中的一个或多个细胞,将化合物从珠粒中释放,并将化合物与第一有限体积的细胞一起温育来进行。在一些实施例中,在同时或者在温育之后,可以从珠粒释放标识化合物的DNA条形码并连接到细胞。然后可以将连接有DNA条形码的细胞从第一个有限体积中释放出来,并再次限制在第二个有限体积中,其中第二个有限体积中具有用于裂解细胞的试剂和捕获细胞内容物的机制以及由细胞携带的珠粒特异性条形码。在一些实施例中,用于捕获细胞内容物和条形码的机制可涉及使用捕获条形码,其可用于唯一地标识单个细胞或小细胞簇。在一些实施例中,捕获条形码和珠粒特异性条形码可以被链接。在一些实施例中,可以合并含有单独条形码材料的所有密闭体积,以创建条形码细胞内容物库和特定于细胞和珠粒的条形码库。条形码材料库可以通过测序进行分析,以研究单个细胞的应答并将它们与引起细胞应答的扰动联系起来。

[0525] 在一些实施例中,所述方法包含捕获液滴内的单个细胞。细胞可以在其细胞膜上含有核酸条形码,以唯一地标识细胞所经历的扰动。可以在液滴内裂解细胞,并且可以在一组条形码捕获寡核苷酸(“捕获条形码”)上捕获细胞的mRNA和与细胞膜结合的核酸条形码。每个液滴可包含不同的唯一条形码捕获的寡核苷酸,其中一个液滴内的条形码具有基本上相同序列的一段。可以使用逆转录酶将mRNA和细胞膜结合的条形码复制到液滴条形码的寡核苷酸上。核酸材料可以通过使液滴破裂而从液滴汇集在一起。可以对所有核酸材料进行测序以研究单个细胞的转录谱并将其与与转录谱相关联的扰动相关。

[0526] 本文所描述的方法可包含使细胞文库经受两个条形码限制、扰动限制和裂解限制。细胞可以被单独限制或作为小簇。条形码可以包含在扰动细胞时引入到细胞的条形码和在裂解细胞时引入的条形码。在一些实施例中,扰动条形码可以被细胞携带到裂解步骤。在一些实施例中,可将裂解条形码应用于细胞内容物和/或扰动条形码,导致建立条形码化的细胞内容物,所述条形码化的细胞内容物将细胞内容物与细胞所经历的扰动相关。在一些实施例中,扰动珠粒还可以含有应答捕获探针。在这种情况下,代替两个分区步骤,一个皮可孔分区步骤就足够了。在此实施例中,化合物条形码可以被功能化以能够捕获细胞应答。在一些实施例中,扰动条形码以poly(T)片段(mRNA分子的poly(A)尾可与其杂交)结尾。

[0527] 在一些实施例中,用于单细胞扰动应答分析的工作流程如下:(1)提供功能化的扰动珠粒,其中扰动条形码以捕获序列结尾,其中捕获序列可以包括用于捕获mRNA的poly(T)核苷酸,或用于捕获其它细胞应答的一组其它合适的捕获探针,(2)捕获皮可孔阵列中的细胞文库,(3)捕获相同皮可孔中的功能化扰动的文库,其中,在一些实施例中,在每个孔捕获

单个细胞和单个功能化的珠粒,并且在其它实施例中,可以在皮可孔中捕获细胞簇,(4) 任选地用油介质覆盖皮可孔,以防止孔之间的试剂交叉污染,(5) 从扰动珠粒中释放出化合物,并与从扰动珠粒中释放出的化合物一起温育每个孔中的细胞,(6) 通过流过皮可孔上方的裂解缓冲液来裂解皮可孔内的细胞,(7) 直接在扰动条形码的顶端捕获mRNA或其它细胞应答,(8) 使用聚合酶或逆转录酶将细胞应答复制到扰动条形码上,(9) 通过超声从皮可孔释放珠粒,然后从所释放的珠粒上切割扩展的扰动条形码,或者在珠粒仍在皮可孔内的同时简单地从珠粒上切割扰动条形码,并且(10) 对切割的核苷酸(扩展的扰动条形码)实施合适的文库制备方法,并对如此制备的核苷酸进行测序。在一些实施例中,测序的核苷酸含有两个片段:标识细胞所经受的扰动/化合物的扰动条形码,和对应于经受扰动/化合物的细胞的mRNA表达的应答片段,所述扰动/化合物由扰动条形码标识。此工作流程如图36所示,具有用于过程QC的任选成像步骤。逆转录酶方法可用于将捕获的RNA延伸到珠粒连接的DNA上,从而将细胞内容物信息转移到功能化的珠粒上。然后将珠粒合并、提取并在测序仪上进行分析。在一些实施例中,来自单细胞的DNA也可以被捕获到功能化的珠粒上的特定引物上。在此实施例中,聚合酶可以代替逆转录酶。

[0528] 在一些实施例中,扰动和细胞应答捕获可以在两个不同的限制中发生,如图37中所描述的。可以将扰动条形码在进行细胞应答捕获限制之前转移到细胞表面。细胞应答捕获还可以涉及捕获细胞表面上携带的扰动条形码,从而将细胞应答与细胞所暴露于的扰动直接相关。在一些实施例中,细胞应答的捕获可以通过Drop-seq方法完成。在一些实施例中,细胞应答的捕获可发生在任何商业单细胞分析仪器中,如10X Genomics单细胞仪器、Raindance单细胞分析协议、伯乐单细胞隔离仪、Mission Bio单细胞分析协议、GigaGen仪器和服务和/或任何其它可商购的单细胞分析仪器或服务。

[0529] 在一些实施例中,细胞悬浮液可以用作受到扰动珠粒限制的细胞的起点。将细胞悬浮于水性培养基中或将细胞悬浮于悬浮液中的方法是本领域技术人员众所周知的。在本领域中还描述了悬浮细胞和在悬浮液中培养细胞的方法。例如,在一些实施例中,球状细胞培养物可用作扰动的起点,因为它们比分离的单个细胞捕获更多的细胞-细胞互动签名(参见例如Edmondson等人,《测定和药物开发技术(Assay Drug Dev Technol.)》12:207-218,2014,Fennema等人,《生物科技趋势》31:108-115,2013,Han等人,《科学报告》5:11891,2015,Zanoni等人,《科学报告》6:19103,2016,其全部公开内容通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,类器官可以代替单细胞用于经历高通量扰动(参见,例如,Foley,《自然方法(Nat Methods)》14:559-562,2017,Liu等人,《药理学前沿(Front Pharmacol.)》7:334,2016,Neugebauer等人,《生物预印本期刊》2017年4月,Skardal等人,《今日药物发现(Drug Discov Today)》21:1399-1411,2016,Boehnke等人,《生物分子筛选杂志(J Biomol Screen)》21:931-941,2016,它们全部通过引用整体并入本文)。

[0530] 在一些实施例中,细胞获自疾病模型。本文描述的方法允许跨疾病模型细胞进行大规模的高通量化合物筛选,以查看是否通过暴露于扰动/化合物文库中的一种或多种化合物获得了治愈应答。在其它实施例中,细胞是各种谱系的健康细胞。本文描述的方法允许细胞对各种化合物的应答的大规模高通量作图。在一些实施例中,通过无偏筛选细胞上的组合化合物文库收集的数据允许基于药物-细胞相互作用的已知图谱从头进行药物预测。

[0531] 在一些实施例中,在本文描述的方法中使用的限制包括液滴限制。在一些实施例

中,液滴包括在油基质中的水性液滴。在一些实施例中,在包括水相和油相的混合的微流体接合处产生液滴。在一些实施例中,微流体连接包括细胞、扰动珠粒和油相。通过“Drop-Seq”方法(参见,例如,Macosko等人,《细胞(Cell)》161:1202-1214,2015)说明了用于产生具有细胞和珠粒的液滴的微流体体系结构的一个实施例。

[0532] 在一些实施例中,所述方法包含水凝胶限制。在一些实施例中,本文所述方法中使用的限制包括水凝胶限制,其中细胞和珠粒嵌入水凝胶基质中,防止其自由扩散。在一些实施例中,偶然发生细胞和珠粒彼此接近的共定位。在一些实施例中,珠粒含有粘附到细胞的结合部分,然后将细胞珠粒双链体嵌入在水凝胶中。在一些实施例中,珠粒与细胞的接近性确保了从所述珠粒释放的化合物仅扰动没有扩散引起的交叉反应性的细胞(细胞间距比化合物在水凝胶中的扩散半径远)。在一些实施例中,在扰动之后,通过使裂解缓冲液通过水凝胶来裂解细胞,其中所释放的细胞内容物被捕获在靠近细胞的珠粒上。一些相关的出版物为:Zhu和Yang,《化学研究综述(Acc.Chem.Res.)》50:22,2017,Sung和Shuler,《芯片实验室》9:1385-1394,2009,Gurski等人,《生物材料(Biomaterials)》30:6076,2009,《免疫细胞亚群免疫监测的微流免疫分型测定平台(Microfluidic Immunophenotyping Assay Platform for Immunomonitoring of Subpopulations of Immune Cells)》,第1761-1763页,第17届化学和生命科学微型系统国际会议,MicroTAS,2013以及美国专利出版号US20030175824 A1,其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0533] 在一些实施例中,本文所述方法中使用的限制包括皮可孔限制,其中单个珠粒和细胞被捕获在微制造的皮可孔中,并且测定可以在皮可孔的阵列中进行。在例如Yuan和Sims,《科学报告》6:33883,2016中描述了将细胞和珠粒加载到皮可孔阵列中的详细流程。在一些实施例中,扰动珠粒还含有应答捕获探针,其中代替两个分隔步骤,一个皮可孔分隔步骤就足够了。在此实施例中,扰动条形码可以被功能化以能够捕获细胞应答。在一些实施例中,扰动条形码以poly(T)片段(mRNA分子的poly(A)尾可与其杂交)结尾

[0534] 在一些实施例中,用于单细胞扰动应答分析的工作流程如下(参见,例如图36):
(1) 提供功能化的扰动珠粒,其中扰动条形码以捕获序列结尾,其中捕获序列可以包括用于捕获mRNA的poly(T)核苷酸,或用于捕获其它细胞应答的一组其它合适的捕获探针,(2) 捕获皮可孔阵列中的细胞文库,(3) 捕获相同皮可孔中的功能化扰动的文库,其中,在一些实施例中,在每个孔捕获单个细胞和单个功能化的珠粒,并且在其它实施例中,可以在皮可孔中捕获细胞簇,(4) 任选地用油介质覆盖皮可孔,以防止孔之间的试剂交叉污染,(5) 从扰动珠粒中释放出化合物,并与从扰动珠粒中释放出的化合物一起温育每个孔中的细胞,(6) 通过流过皮可孔上方的裂解缓冲液来裂解皮可孔内的细胞,(7) 直接在扰动条形码的顶端捕获mRNA或其它细胞应答,(8) 使用聚合酶或逆转录酶将细胞应答复制到扰动条形码上,(9) 通过超声从皮可孔释放珠粒,然后从所释放的珠粒上切割扩展的扰动条形码,或者在珠粒仍在皮可孔内的同时简单地从珠粒上切割扰动条形码,并且(10) 对切割的核苷酸(扩展的扰动条形码)实施合适的文库制备方法,并对如此制备的核苷酸进行测序。在一些实施例中,测序的核苷酸含有两个片段:标识细胞所经受的扰动/化合物的扰动条形码,和对应于经受扰动/化合物的细胞的mRNA表达的应答片段,所述扰动/化合物由扰动条形码标识。

[0535] 在一些实施例中,将细胞应答作为形态应答进行光学测量。在一些实施例中,通过标记某些细胞特征来测量细胞应答,以研究扰动后测量信号的差异。在一些实施例中,细胞

应答是工程化到细胞中的应答,其中有利的刺激使细胞表达工程化的应答。在一些实施例中,工程化的应答是报告基因。在一些实施例中,工程化的应答是荧光蛋白的表达。

[0536] 在一些实施例中,细胞应答包括细胞的转录组。在一些实施例中,通过捕获细胞的mRNA内容物并分析mRNA转录物的表达水平来测量转录应答(参见,例如,Bacher等人,《基因组生物学(Genome Biol)》17:63,2016,Svensson等人,《自然方法》14:381,2017,Miao和Zhang,《定量生物学(Quantitative Biol)》4:243,2016,其公开内容通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,细胞应答包括细胞中蛋白质或酶的表达和/或转译后活化状态。在一些实施例中,捕获细胞应答包括使用poly(T)寡核苷酸从细胞捕获poly(A)mRNA。在一些实施例中,细胞应答包括细胞中增强子RNA的表达水平(参见,例如,Rahman等人,《核酸研究》45:3017,2017,其公开内容通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,细胞应答包括细胞中新生转录物的水平。在一些实施例中,新生转录应答通过Global Run-On测序(GRO-Seq)捕获(参见,例如,Gardini,《分子生物学方法》1468:111-120,2017以及Danko等人,《自然方法》12:433,2015,其公开内容通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,细胞应答包括蛋白质浓度,其中蛋白质通过DNA标记的抗体鉴定,其中进一步地,将适当的标记转移到珠粒上。在本文描述的方法的一些实施例中,可以通过成像、基因组分析或分子生物学和测序中的任何其它工具来捕获细胞应答。

[0537] 实例

[0538] 实例1.第一工作流程

[0539] 本公开提供了方法,包含以下概述为“第一工作流程”和“第二工作流程”的方法。

[0540] 第一工作流程包含以下步骤:(1)生成DELB,(2)将珠粒放入皮可孔,(3)将测定试剂装载入皮可孔,(4)释放与珠粒结合的化合物,(5)测量测定读数,(6)对测定读数进行排名,以及(7)生成一组新的DELB。

[0541] 生成DELB。首先,在珠粒上创建DNA编码的文库(DELB)。每个珠粒含有完全相同的化合物群体,尽管在某些制造的化合物具有不完全的偶联或遭受化学损伤(如无意氧化)的情况下可能会略有偏离。

[0542] 将珠粒放入皮可孔。然后,将珠粒放入皮可孔中。在优选的实施例中,每个皮可孔仅得到一个珠粒。每个皮可孔可以具有圆形的上边缘、圆形的下边缘、实心的圆形底部、敞开的顶部和壁。所述壁的底部由圆形的上边缘和圆形的下边缘限定。在优选的实施例中,所述壁是成角度的,其中圆形的上边缘的直径大于圆形的下边缘的直径。以此方式,所述壁(本身查看)类似于倒锥形的切片。可以制备皮可孔阵列,以便有冗余的珠粒。换句话说,可以制备阵列,以使置于皮可孔中的数千个珠粒中的两个珠粒含有完全相同的化合物。所述冗余可以是例如2个珠粒、3个珠粒、4个珠粒、5个珠粒、10个珠粒、20个珠粒、40个珠粒、60个珠粒、80个珠粒、100个珠粒等,或约2个珠粒、约3个珠粒、约4个珠粒、约10个珠粒、约20个珠粒、约40个珠粒、约60个珠粒、约80个珠粒、约100个珠粒、约200个珠粒、约500个珠粒、约1,000个珠粒等,或多于2个珠粒、多于5个珠粒、多于10个珠粒、多于20个珠粒、多于40个珠粒、多于60个珠粒、多于80个珠粒、多于100个珠粒、多于200个珠粒、多于500个珠粒、多于1,000个珠粒等。

[0543] 将测定试剂装载入皮可孔。在每个皮可孔中引入试剂,所述每个皮可孔可用于评估每个珠粒结合的化合物的生化活性。生化活性可以采取结合活性、酶抑制活性、酶激活活

性、哺乳动物活细胞(其中分子靶未知)的活性、哺乳动物活细胞(其中分子靶是已知的)的活性等的形式。所述试剂可以采取FRET试剂加酶的形式。FRET试剂可以通过蛋白酶底物连接到淬灭剂的荧光团。所述酶可以是所述蛋白酶的底物,其可以被蛋白酶切割。正在测试珠粒结合的化合物抑制蛋白酶的能力。

[0544] 装载测定材料后,每个皮可孔可以用膜封盖,或者许多或所有皮可孔可以用一层膜封盖,或者许多或所有皮可孔可以用带有丘疹的膜封盖,其中每个丘疹装配到一个皮可孔,或者每个皮可孔配合有一个多孔球体。在实施例中,约5%的体积、约10%的体积、约20%的体积、约30%的体积或约40%的球体积装配到皮可孔(其中其余部分与表面齐平或位于表面上方)。在实施例中,约5%、约10%、约20%、约40%、约60%、约80%、约90%或约100%的丘疹装配到皮可孔。

[0545] 释放珠粒结合的化合物。执行导致释放珠粒结合的化合物的步骤。在实施例中,所述步骤可引起释放约0.1%、约0.2%、约0.1%、约0.2%、约2%、约5%、约10%、约20%、约40%、约60%、约80%、约99%或约100%的连接到给定珠粒的化合物。释放可以通过光、通过化学试剂、通过酶、通过温度变化、通过其任意组合等来实现。

[0546] 释放可以采取以下形式:(i) 单次释放,(ii) 多次释放,(iii) 连续释放。例如,多次释放可以采取若干种紫外光发射的形式,其中每种发射足以切割约10%的珠粒结合的化合物,这些化合物恰好在光发射开始时连接到珠粒。例如,连续释放可以采取在一小时的过程中连续发光的形式,从而导致游离化合物的浓度稳定增加。在这种情况下,稳定增加游离化合物(切割化合物)的浓度可能是为了滴定所述化合物的靶标。这种滴定实验可以用于评估给定化合物的效力。为了提供非限制性实例,在单次释放方法中,曝光一段时间后是进行读数的一段时间;在连续释放方法中,在某个、大部分或全部时间段内,曝光持续进行。

[0547] 在排他性实施例中,本公开可以排除使用单次释放、使用多次释放或使用连续释放的任何方法、试剂、组合物或系统。

[0548] 测量测定读数。检测上文公开的生化活性,以及所述释放的化合物对所述活性的影响。这种生化活性可以采取酶活性、报告基因的活性,遗传活性(例如,转录或转译速率)、结合活性(例如,抗原与抗体)、细胞活力(例如,迁移改变、细胞信号通路、形态变化)。可以通过荧光、生色活性、发光、光学显微镜、**TaqMan®**测定、分子信标、质谱、拉曼光谱、局部表面等离子共振(LSPR)、表面等离子偶联发射(SPCE)、表面增强拉曼散射来检测活性(SERS)等。可以使用完全远程的方法进行检测,如荧光检测或光学显微镜,或者可替代地,通过涉及从皮可孔中采集样品的方法。在一个实施例中,可以通过部分插入皮可孔中的球形多孔海绵取出含有反应物和产物混合物的样品进行分析。

[0549] 对测定读数进行排名。在此步骤中,针对多种不同化合物(与一种特定的珠粒相关联的每种类型的化合物)的测定读数,根据其激活、抑制或以某种方式调节生化活性的能力进行排名。

[0550] 生成一组新的DELBS。上文描述的步骤将具有生化活性的各种化合物告知用户。所述信息可以具有最大活性的一种化合物的形式,其余的具有最大活性的一半或更少。可替代地,所述信息采取若干种具有相似的最大活性的化合物的形式,而其它化合物具有约一半或更少的最大活性。可以如下创建一组新的DELBS。基于以下中的一种或多种非限制性策略,可以将一种或多种排名最高的化合物(先导化合物)用作制造新的DELBS的基础:(i) 用同

系物代替脂肪族链,如用丁醇侧链代替丙醇侧链;(ii)用异构体代替脂族链,如用异丙醇侧链代替丙醇侧链;(iii)用类似肽键的类似物代替肽键,例如用不能被肽酶水解的键;(iv)用另一种类型的带电基团代替一种类型的带电基团,例如用磷酸酯、硫酸根、磺酸根或羧基代替磷酸根。

[0551] 实例二.第二工作流程

[0552] 第二工作流程涉及用盖密封的皮可孔。所述盖可以采取直径略大于皮可孔直径的球体的形式,其中该直径是在皮可孔的顶部边缘处测量的(不是在皮可孔的底部测量)。通过使整个皮可孔板经受轻度重力离心作用,可以使所述盖紧贴皮可孔的顶部。在第二工作流程中,所述盖采取含有连接子的珠粒的形式,其中每个连接子与化合物连接。连接子是可切割连接子,其中切割释放出化合物并允许它们扩散到细胞中。这种类型的盖被称为“有源盖”。第二工作流程包含以下步骤:(1)生成DELB,(2)将测定试剂装载入皮可孔中,(3)用DELB封盖皮可孔,(4)从充当盖的珠粒中释放珠粒结合的化合物,(5)测量测定读数,(6)确定珠粒上DNA条形码的序列;(7)对测定读数进行排名,以及(8)生成一组新的DELB。

[0553] 实例3.释放控制

[0554] 这涉及控制和监测珠粒结合的化合物的释放。申请人设计了以下流程来合成珠粒结合的释放监测器。参见图11以及以下文字。

[0555] 图11描述了珠粒结合的释放监测器的上述示例性实施例的有机合成中的步骤。

[0556] 步骤1.提供树脂

[0557] **TentaGel®**树脂(M30102,10 μ m NH₂,0.23mmol/g,10mg;MB160230,160 μ m RAM,0.46mmol/g,2mg)放入试管中称重(1.5mL Eppendorf)并且溶胀(400 μ L,DMA)。

[0558] 将树脂转移到熔块的旋转柱(**MoBiCol®**旋转柱,塞默飞世尔科技公司)中,通过真空使用过滤器去除溶剂,并且将侧链Fmoc脱保护(DMA中5%的哌嗪和2%的DBU,400 μ L;在40℃下2 \times 10分钟)。MoBiCol旋转柱具有一个10微米大的熔块和一个鲁尔锁盖。

[0559] 真空过滤树脂,并且洗涤(2 \times DMA,400 μ L;3 \times DCM,400 μ L;1 \times DMA,400 μ L)。

[0560] 步骤2.将赖氨酸连接子与树脂偶联

[0561] 制备的溶液含有混合在DMA(350 μ L)中的温育(1分钟,室温)的L-Fmoc-Lys(Mtt)-OH(21 μ moles,6.6eq.)、DIEA(42 μ moles,13.3eq.)、COMU(21 μ moles,6.6eq.),然后将其添加到熔块的旋转柱内部的干燥树脂中,涡旋并温育(15分钟,40℃)以酰胺化游离胺。通过真空过滤树脂,并且将该反应重复一次。

[0562] 真空过滤树脂,并且洗涤(2 \times DMA,400 μ L;3 \times DCM,400 μ L;1 \times DMA,400 μ L)。

[0563] 步骤3.去除Fmoc保护基

[0564] 悬垂的Fmoc脱保护(DMA中5%的哌嗪和2%的DBU,400 μ L;在40℃下2 \times 10分钟)。

[0565] 真空过滤树脂,并且洗涤(2 \times DMA,400 μ L;3 \times DCM,400 μ L;1 \times DMA,400 μ L)。

[0566] 步骤4.偶联淬灭剂

[0567] 制备的溶液含有混合在DMA(350 μ L)中的温育(1分钟,室温)的QSY7-NHS(4.9 μ moles,1.55eq.)、Oxyma(9.5eq,3.3eq.)、DIC(21 μ moles,6.6eq.)、TMP(3.5 μ moles,1.1eq.)然后将其添加到熔块的旋转柱内部的干燥树脂中,涡旋并温育(14小时,40℃)以酰胺化游离胺。

[0568] 真空过滤树脂,并且洗涤(2 \times DMA,400 μ L;3 \times DCM,400 μ L;1 \times DMA,400 μ L)。

[0569] 制备的溶液含有混合在DMA (400 μ L) 中的醋酸酐 (80 μ moles, 25.3eq)、TMP (80 μ moles, 25.3eq.), 将其混合然后添加到熔块的旋转柱内部的干燥树脂中, 涡旋并温育 (20分钟, 室温)。

[0570] 真空过滤树脂, 洗涤 (2 \times DMA, 400 μ L; 3 \times DCM), 并在DCM中温育 (1小时, 室温), 然后真空过滤并在真空室中干燥 (30分钟, 2.5PSI)

[0571] 步骤5. 去除Mtt保护基

[0572] 制备Mtt脱保护混合物, 其含有TFA (96 μ L)、甲醇 (16 μ L), 在DCM (1488 μ L) 混合, 得到6:1:93%的TFA:甲醇:DCM溶液。

[0573] 将Mtt脱保护混合物添加到完全干燥的树脂 (400 μ L) 中, 混合, 通过真空过滤洗脱, 然后依次添加等分的Mtt脱保护混合物 (4 \times 400 μ L), 混合, 温育 (5分钟, 室温), 并且在室温下洗脱的总温育时间为20分钟。

[0574] 真空过滤树脂, 并且洗涤 (3 \times DCM, 400 μ L; 1 \times DMA, 400 μ L; 1 \times DMA与2%的DIEA, 400 μ L; 3 \times DMA, 400 μ L)。

[0575] 步骤6. 将光可切割连接子偶联到赖氨酸的 ϵ -氨基

[0576] 制备的溶液含有混合在DMA (400 μ L) 中的温育 (1分钟, 室温) 的Fmoc-PCL-OH (32 μ moles, 10eq.)、Oxyma (32eq, 10eq.)、DIC (50 μ moles, 15.8eq.)、TMP (32 μ moles, 10eq.) 然后将其添加到熔块的旋转柱内部的干燥树脂中, 涡旋并温育 (14小时, 40 $^{\circ}$ C) 以酰胺化游离 ϵ 胺。

[0577] 真空过滤树脂, 并且洗涤 (2 \times DMA, 400 μ L; 3 \times DCM, 400 μ L; 1 \times DMA, 400 μ L)。

[0578] 步骤7. 从先前偶联的光可切割连接子上去除Fmoc保护基

[0579] 悬垂的Fmoc脱保护 (DMA中5%的哌嗪和2%的DBU, 400 μ L; 在40 $^{\circ}$ C下2 \times 10分钟)。

[0580] 真空过滤树脂, 并且洗涤 (2 \times DMA, 400 μ L; 3 \times DCM, 400 μ L; 1 \times DMA, 400 μ L)。

[0581] 步骤8. 偶联荧光团

[0582] 制备的溶液含有混合在DMA (400 μ L) 中的温育 (1分钟, 室温) 的TAMRA (6 μ moles, 1.9eq.)、TMP (24 μ moles, 7.6eq.)、COMU (16 μ moles, 5eq), 然后将其添加到熔块的旋转柱内部的干燥树脂中, 涡旋并通过混合温育 (2小时, 40 $^{\circ}$ C, 800RPM) 以酰胺化游离胺。

[0583] 真空过滤树脂, 并且洗涤 (2 \times DMA, 400 μ L; 3 \times DCM, 400 μ L; 2 \times DMA, 400 μ L; 2 \times DMSO), 然后在DMSO中混合温育 (16小时, 40 $^{\circ}$ C)。

[0584] 以下提供了上文公开的实验室流程的更广泛的描述。

[0585] 连接到珠粒的双功能连接子。双功能连接子是在溶液中合成的, 并且连接到胺功能化的珠粒。图11公开了从赖氨酸开始的有机合成途径。然后通过TCO连接子连接赖氨酸-Boc。连接子的主要部分采取一端带有氮的聚乙二醇 (PEG) 形式。Boc是该连接反应中的离去基团。使用的TCA实际上是羟基-TCO的外消旋物。该TCO衍生物的羟基与位于距双键的一侧四个碳原子的碳原子连接 (这与位于距双键的另一侧三个碳原子的相同)。如图11所示, 多步合成中的第一个产物采取Boc-赖氨酸-连接子-TCO的形式。曾经是羟基-TCO一部分的羟基仍连接到TCO基团, 其位于胺化聚乙二醇基团和TCO基团之间 (图11)。

[0586] 合成途径中的第二组涉及用HCl处理和添加光切割连接子 (PCL)。第二步的产物与第一步的产物相同, 除了Boc基团被光可切割连接子代替。赖氨酸部分在第二步的产物中处于中心位置。关于赖氨酸部分, 该赖氨酸部分具有游离羧基, 并且在所述流程的第三步中,

将胺化的珠粒连接到该游离羟基上,从而合成了珠粒结合的试剂,其中所述试剂采取两个分支的形式,并且其中一个分支的端是TCO标签,而另一个分支的端是带有可切割键的芳香环。为了将化学单体连接到光可切割连接子的远端,首先去除Fmoc基团,然后在本文中將Fmoc基团替换为氢原子。

[0587] 去除Fmoc。根据Isidro-Llobet等人,“Fmoc.可通过主要是仲胺的碱去除,因为它们更易于捕获在去除过程中产生的二苯并富勒烯”。(参见Isidro-Llobet等人(2009)《化学评论》109:2455-2504)。可替代地,可以通过具有Pd/BaSO₄的催化氢解或通过液氨和吗啉或哌啶来去除Fmoc。

[0588] 去除Fmoc基团,然后连接化学单体。然后申请人缩合具有羧酸基团的化学单体,其中结果是产生酰胺键。

[0589] 实例4. 基于CEREBLON的活性化合物测定

[0590] 化合物的基于细胞的测定(基于cereblon的测定)的结果。用于基于细胞的测定的试剂和方法。申请人使用了从ATCC(弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心)获得的CCL-2HeLa细胞。细胞培养基是用HEPES缓冲的Gibco DMEM高葡萄糖培养基。细胞培养物上方的大气是添加有5%二氧化碳的大气,温育箱温度为37摄氏度。细胞培养基是DMEM+10%胎牛血清,并添加了GlutaMAX®(吉博科(Gibco)赛默飞世尔),并还添加了非必需的氨基酸和青霉素加链霉素(马萨诸塞州沃尔瑟姆的吉博科赛默飞世尔)。用LTR-CTCF-Promoter-IKZF1(或IKZF3)-mNeon-P2A-mScar-LTR-CTCF形式的构建体转染HeLa细胞。mScarlet是用作阳性对照的元素。mScarlet对被称为“mScarlet”的红色荧光蛋白进行编码(参见Bindels等人(2017)《自然方法》14:53-56)。所述启动子是强力霉素可诱导的启动子,其能够快速开始诱导和滴定底物。P2A是位于两个其它多肽之间的元素。P2A在转译过程中会产生两个单独的多肽,从而使mScar多肽充当产生红光的阳性对照,而不受融合蛋白(由IKZF1/绿色荧光蛋白(GFP)组成)的泛素化和降解的影响。mNeonGreen来源于文昌鱼文昌鱼多聚体黄色荧光蛋白(加利福尼亚州圣地亚哥的Allele生物科技公司)。P2A是一个区域,其允许在P2A蛋白的某个点进行自我切割。更准确地说,P2A肽可导致核糖体跳过2A肽C端的糖基-脯氨酰胺键的合成,从而导致2A肽与其下游肽之间的切割(Kim、Lee、Li、Choi(2011)《公共科学图书馆:综合》6:e18556(8页))。

[0591] 证明基于细胞的测定对测试化合物的功效。以下证明了基于细胞的测定对采取来那度胺和来那度胺类似物形式的测试化合物的使用。图5揭示了用慢病毒载体转染的HeLa细胞的结果,其中所述载体表达绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(mScarlet)。添加的来那度胺的浓度的增加会导致逐渐减少的绿色荧光,并消除最高浓度的绿色荧光。但是来那度胺基本上没有减少红色荧光。上图:IKZF1/GFP融合蛋白的表达。下图:mScarlett对照物的表达。以零、0.1、1.0或10微摩尔添加来那度胺。

[0592] 图6公开了用慢病毒载体转染的HeLa细胞的结果,其中所述载体表达绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(mScarlet)。添加的来那度胺的浓度的增加会导致逐渐减少的绿色荧光,并消除最高浓度的绿色荧光。但是来那度胺基本上没有减少红色荧光。上图:IKZF3/GFP融合蛋白的表达。下图:mScarlett对照物的表达。以零、0.1、1.0或10微摩尔添加来那度胺。

[0593] 为了总结来那度胺引起融合蛋白发生蛋白水解的途径,首先将来那度胺添加到

HeLa细胞中。然后,来那度胺结合到天然存在这些细胞中的cereblon。此cereblon存在于与E3泛素连接酶形成的复合体中。E3泛素连接酶通过用泛素标记重组IKZF1融合蛋白(或重组IKZF3融合蛋白)来应答来那度胺。最终结果是,泛素标记的融合蛋白在细胞的蛋白酶体中被降解。

[0594] 涂覆皮可孔板。这描述了涂敷皮可孔板顶表面的溶液,但不一定进入皮可孔板并在皮可孔板内部涂覆。这也与涂敷皮可孔板的顶表面,进入皮可孔并涂覆皮可孔的底表面的溶液有关。申请人将**Pluronic®** 127的溶液(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)添加到干燥塑料中。结果是表面是亲水的而不再是疏水的。然后,用水洗涤表面。然后,添加磷酸盐缓冲盐水(PBS),该PBS进入皮可孔内部。移动的空气是通过真空施加的,其中结果是它导致皮可孔中的小气泡膨胀,然后用PBS代替气泡,最终结果是许多皮可孔中充满了PBS。然后,用玻连蛋白涂料溶液(AF-VMB-220)(新泽西州洛基山的派普泰克公司(PeproTech))代替PBS。**Pluronic®** 127为: $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3))_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{OH}$ 。施用玻连蛋白涂料溶液后,申请人在37摄氏度下温育30分钟,以允许涂料溶液进入皮可孔。**Pluronic** 127涂覆了分开皮可孔的脊,并且玻连蛋白位于皮可孔的底部。HeLa细胞连接到玻连蛋白上,并且当它们连接到玻连蛋白上时,它们会粘附在皮可孔的底部。

[0595] 通过流式细胞术筛选HeLa细胞中成功转染的细胞。同时使用两个标准来确定成功的转染。首先,在通过流式细胞术分选前2天将来那度胺添加到细胞培养基中。阳性细胞是红色加号和绿色减号,其中红色加号意指细胞被基因编码mScar转染,而绿色减号表示来那度胺实际上已促进了融合蛋白,IKZF1/mNeon(或融合蛋白,IKZF3/mNeon)的泛素化和降解。关于强力霉素,以3微摩尔使用强力霉素以诱导慢病毒载体构建体的表达。强力霉素的浓度/诱导曲线在以下示出:Go和Ho(2002)《基因医学期刊(J. Gene Medicine)》4:258-270)。用慢病毒载体转染后,使用以下条件使IKZF1在生长的细胞中最少表达。条件是将强力霉素从培养基中移出,并在构建体中使用“绝缘序列”。绝缘序列阻止构建体外部启动子的读数。已经描述了绝缘序列(参见,Anton等人(2005)《癌症基因疗法(Cancer Gene Therapy)》12:640-646;Carr等人(2017)《公共科学图书馆:综合》12:e0176013)。绝缘序列防止在构建体之外的启动子驱动作为构建体一部分的开放阅读框(ORF)的表达。为了将细胞放入皮可孔,可以以[细胞数]/[皮可孔数]的给定比率将细胞转移到皮可孔板的顶表面。所述比率可以是例如约1个细胞/40个孔、约1个细胞/20个孔、约1个细胞/10个孔、约2个细胞/10个孔、约4个细胞/10个孔、约8个细胞/10个孔、约16个细胞/10个孔、约32个细胞/10个孔、约50个细胞/10个孔、约100个细胞/10个孔等。一旦细胞连接到涂覆在皮可孔底部的玻连蛋白,细胞就可以用于皮可孔中的测定。

[0596] 慢病毒构建体和细胞培养的详细信息。这涉及为IKZF1/3构建报告细胞系,在皮可孔中培养它们,并用大量来那度胺进行测定。携带报告基因构建体的质粒使用Gibson组装件(参见附图)组装而成。具有报告基因构建体的慢病毒以及UbC驱动的rtTA-M2.2在具有第三代包装系统(嵌合CMV启动子且不含tat蛋白)的LentiX HEK293T细胞(加利福尼亚州帕洛阿尔托的Clontech公司)中制成。通过钙沉淀法转染质粒。在推荐的LentiX培养基加1%牛血清白蛋白(BSA)中收获病毒上清液,并通过0.45um低蛋白结合滤膜(密理博公司(Millipore))过滤。宿主HeLa细胞获自ATCC,在标准条件下培养。在用Doxicyclin更换为LentiX培养基24小时后,将病毒上清液用于亚融合HeLa培养物。在克隆选择的前两天,将来

那度胺加入培养物中。通过荧光激活细胞分选 (FACS) 选择克隆, 分别在AlexaFluor 488 (阴性) 和Cy3通道 (阳性) 上进行门控。在测定前, 无来那度胺的克隆生长10天。最稳定的表达水平克隆用于筛选。

[0597] 这描述了用珠粒密封细胞并通过多孔珠粒裂解细胞的实验。用Pluronic F127清洁剂 (密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司) 处理具有皮可孔图案化底部的96孔板 (MuWells), 而无需施加真空以钝化孔的上部。温育30分钟后, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或蒸馏的H₂O冲洗掉过量的洗涤剂。孔用乙醇冲洗, 并在空气流通的生物安全柜中干燥。在强真空下用PBS润湿孔, 直至完成, 然后用Virtonection涂覆试剂 (Preprotech公司) 代替PBS。将所述板在37°C温育30分钟。去除玻连蛋白涂覆试剂, 并以期望密度接种报告细胞。从细胞接种的那一刻起, 培养基就在整个测定过程中停留在培养皿中。载有光可切割化合物的TentaGel®珠粒可以在玻连蛋白涂覆之前或细胞接种后进行接种。将PEG聚合物珠粒以超过孔数的过量加载到培养物的顶部。以400rcf的速率将所述板旋转1分钟。使用365nm LED光源将化合物从珠粒上光释放适当时间。在CO₂培养箱中温育直至成像 (荧光报告分子的读数)。

[0598] 构建体。图20和图21公开了相关的构建体。这些图中的每个公开了要整合到HeLa细胞基因组中的序列, 并且每个图公开了载剂序列 (属于慢病毒的序列)。属于慢病毒的序列是从约1点到约9点, 其中该序列被两个长端重复序列 (LTR) 括起来。从约9点到约1点的序列已整合到HeLa细胞基因组中。详细地, 首先将质粒转染到生产细胞 (HEK93T) (加利福尼亚州帕洛阿尔托的Clontech公司) 中。生产细胞产生慢病毒然后释放慢病毒。然后所释放的慢病毒感染HeLa细胞, 并将核酸整合到HeLa细胞基因组中。

[0599] 光学。在当前的细胞培养实验中, 申请人使用了连接到HB0 100 (德国卡尔·蔡司显微镜股份有限公司) 的EBQ100隔离汞灯, 所述灯连接到带有Lud1电子产品平台 (纽约州霍桑的Lud1电子产品有限公司) 的Axiovert 200-M卡尔·蔡司显微镜。申请人还使用了带有汞灯的滤光镜立方体, 其中滤光镜立方体控制激发的波长并且还控制探测发射的波长。使用Basler ACA2440-35UM (德国阿伦斯堡的邮编为22926的宝视纳股份公司 (Basler AG)) 捕获图像。卤素灯被用作汞灯的替代。将微孔板、皮可孔板等通过板固定器和带有控制器的“XY平台”固定在位。XY平台和其它用于光学的精确定位平台可从加利福尼亚州兰乔圣玛格丽塔市的纽马克系统公司 (Newmark Systems, Inc.); 宾夕法尼亚州匹兹堡的艾罗德克公司 (Aerotech, Inc.); 德国卡尔斯鲁厄的邮编为76228的物理仪器股份有限公司 (Physik Instrumente GmbH) 获得。

[0600] 实例5. 基于MDM2的活性化合物测定

[0601] 改性玻璃以含有氨基。可以通过多种“功能化硅烷”中的一种或多种将二氧化硅基底改性以含有氨基。这些“功能化硅烷”是3-氨基丙基-三乙氧基硅烷 (APTES)、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷 (APTMS)、N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (AEPTES)、N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (AEAPTMS) 和N-(6-氨基己基) 氨基甲基三乙氧基硅烷 (AHAMTES)。这些试剂与玻璃的反应可以在气相或在溶液相中进行 (参见Zhu, Lerum, Chen (2012) 《朗缪尔 (Langmuir)》28:416-423)。

[0602] 化合物的生化测定 (基于MDM2的测定) 的结果。实验室方法。将以下试剂涂敷到载玻片上。将载玻片改性为具有氨基。试剂为NHS-PEG-mTET。NHS为N-羟基-琥珀酰亚胺。NHS是

一种活化酯。NHS可用于生物缀合反应,如微珠粒或微阵列载玻片的表面活化(Klykov和Weller (2015)《分析方法 (Analytical Methods)》7:6443-6448)。

[0603] PEG是聚乙二醇。mTET是甲基四嗪。将该试剂与DMSO混合,然后将2微升的体积涂敷到载玻片上。通过将10微升的50mM NHS-PEG-mTET与30微升的DMSO混合来制备混合物。NHS基团与玻璃侧的氨基反应,结果是mTET基团固定在载玻片上。mTET的目标是在玻片和珠粒之间建立共价连接。

[0604] TCO和四嗪可以介导“点击化学”反应。这些点击化学反应的实例是使用被四嗪功能化的抗体与被TCO功能化的DNA偶联。或使用经TCO改性的抗体与四嗪-改性的珠粒偶联(参见van Buggenum等人 (2016)《科学报告》6:22675 (DOI:10.1038);Rahim等人 (2015)《生物缀合化学》18:352-360;Haun等人 (2010)《自然纳米科技 (Nature Nanotechnol.)》5:660-665)。

[0605] 详细地,通过在玻片的顶部上涂敷一片封口膜来制备载玻片,其中在封口膜的中间切出一个小孔口,将上述混合物的液滴直接从所述孔口滴加到载玻片上。在涂敷混合物之前,将带有封口膜的载玻片在高温下加热90秒,以在封口膜和载玻片之间形成紧密的密封,从而防止将混合物涂敷于封口膜中的开口区域(所述孔口)后液体渗漏。将载有2微升液滴的载玻片切入封口膜的孔口中,于室温下温育过夜。在温育期间,载玻片位于培养皿中,其中在培养皿上盖有覆盖培养皿顶部和侧面的玻璃盖。在过夜温育之前,将一块方形的封口膜放置在液滴上方和周围的封口膜上方,以防止水从液滴中蒸发。

[0606] 制作玻片/珠粒/抗体的复合体的发明方法。申请人的方法使用通过TCO功能化的珠粒。珠粒的TCO组介导了甲基四嗪-功能化玻片与珠粒的共价连接。另外,珠粒的TCO组介导了甲基四嗪-功能化抗-p53抗体与珠粒的共价连接。

[0607] 申请人惊奇地发现,如果第一步是使接触玻片和珠粒,那么随后添加抗体将不会导致抗体共价连接到珠粒。另外,申请人惊奇地发现,如果第一步是使珠粒与抗体接触,那么该混合物随后转移到玻片上将不会导致珠粒与玻片共价连接。在一种优选的方法中,所有这三种试剂—玻片、珠粒和抗体同时相互接触。在另一个优选的实施例中,首先将珠粒和抗体混合在一起以引发珠粒与抗体的共价连接,然后立即或在几分钟内将该混合物涂敷到玻片上,结果是珠粒共价连接到玻片。

[0608] 基于酶的筛选测定法的性质。所述测定采取具有连接的珠粒的载玻片的形式。珠粒含有特异性结合转录因子p53的连接抗体。该抗体可以结合人类p53,并且也可以结合泛素化的人类p53。到目前为止,可以看出测定涉及以下试剂之间的夹层:

[0609] 玻片/共价结合的珠粒/珠粒结合的抗p53抗体/泛素化的p53

[0610] 该测定的读数为泛素化p53,其中泛素化p53通过对泛素特异的荧光抗体检测。详细地,所述抗体是在山羊中制备的多克隆抗体,其中所述抗体用荧光团(AF488)标记。图8公开了AF488的结构。该荧光抗体与泛素结合。因此,当检测到泛素化-p53时,存在以下夹层:

[0611] 玻片/共价结合的珠粒/珠粒结合的抗-p53抗体/泛素化的p53/荧光抗体

[0612] 实例6.在皮可孔中对DNA进行测序。

[0613] 对珠粒结合的DNA条形码进行测序,其中珠粒位于皮可孔中,每个皮可孔一个珠粒。所述测定方法涉及通过荧光核苷酸的瞬时结合,一次查询与珠粒结合的DNA条形码上的每个位置。每个珠粒含有约一百个偶联DNA条形码的小原子,其中通过点击化学进行偶联。

该数目相当于每珠粒偶联约六千万个寡核苷酸。对于DNA条形码上的每个碱基,所述测定涉及同时添加所有四个荧光dNTP。在不加任何限制的情况下,四个荧光dNTPs为AF488-dGTP、CY3-dATP、TexasRed-dUTP和CY5-dCTP。捕获荧光信号,然后通过ImageJ软件(美国国立卫生研究院,NIH)进行处理,以提供相应的数值。数据来自于五个连续核苷酸(连续)的测序,这些核苷酸是与珠粒结合的DNA条形码的一部分。珠粒结合的DNA条形码包含DNA发夹区域。DNA发夹区域中的碱基对其自身退火,从而形成发夹,并且其中所述DNA发夹中的3'端核苷酸用作测序引物。在此3'端开始通过瞬时结合进行测序。测序测定一式三份进行,即使用三个不同的珠粒,其中三个珠粒中的每个珠粒使用一个DNA条形码序列。换句话说,期望三个珠粒中的每个珠粒提供与其它两个珠粒相同的测序读数。

[0614] 图28公开了测序结果,其中对珠粒结合的DNA条形码进行测序。示出的是询问第一碱基、第二碱基、第三碱基、第四碱基和第五碱基的结果。对于这些碱基中的每个碱基,通过直方图条分别示出了分别通过AF488-dGTP、CY3-dATP、TexasRed-dUTP和CY5-dCTP询问产生的荧光发射。四个直方图条中的每个直方图条具有不同的图形:AF488-dGTP(黑色轮廓,灰色内部)、CY3-dATP(黑色轮廓,白色内部)、TexasRed-dUTP(黑色实心直方图)和CY5-dCTP(灰色实心直方图)。在水溶液中溶胀后,珠粒直径为10-14微米。皮可孔的体积为12微微升。

[0615] 被查询的模板序列为:5'-CTCACATCCCATTTTCGCTTTAGT-3'。对于此特定的测序测定,询问了五个连续的碱基,其中提供最大荧光信号的荧光dNTP是荧光dGTP、dATP、dGTP、dUTP和dGTP,其对应于模板上的序列dC、dT、dC、dA和dC。因此,测序结果是100%准确的。结果表明,可以对珠粒结合的DNA条形码进行测序,即当DNA条形码仍与珠粒结合时。换句话说,珠粒结合的DNA条形码是可测序的。

[0616] 实例7.细胞条形码编码

[0617] 条形码编码概念介绍。这介绍了条形码编码的概念。常见的条形码技术是对给定单细胞的转录组进行条形码编码。图36和图37展示了捕获和扩增转录组以制备将来测序的流程的步骤。图36示出了细胞裂解以释放mRNA,随后进行逆转录。图37示出了通过固定的poly(dT)捕获mRNA,随后进行逆转录,最后进行测序。可以使用下一代测序(NGS)进行测序。

[0618] 可以使用共同的条形码来标记来自给定细胞的一些或大多数信使RNA(mRNA)分子,其中该标记允许研究人员针对任何给定的mRNA序列确定给定细胞的编码序列的起源。例如,如果代表来自一百个不同单细胞的每个单独的转录组的核酸混合在一起,并且来自100个不同单细胞的每个的核酸具有其自己的条形码,那么将产生以下优点。优点是可以将所有转录组的核酸在一个试管中混合在一起,然后进行下一代测序,其中条形码使用户能够标识来自同一细胞的信息。

[0619] 下面以不同的方式描述了上述优势。在使用mRNA条形码编码时,将处理给定的单细胞,以便将来自所述细胞的部分或大部分mRNA分子的信息转换为相应的cDNA分子,其中这些cDNA分子中的每个拥有完全相同的DNA条形码。可以对十个、二十个、100个、数百个或超过1,000个不同的细胞重复此条形码流程,其中每个细胞的cDNA分子具有唯一的、特定于细胞的条形码,从而得以区分。此方法使研究者能够进行DNA测序,都在一个测序运行,从来自所有细胞的条形码cDNA分子的池(在测序之前,所有条形码的cDNA分子混合在一起)(参见Avital、Hashimshony、Yanai(2014)《基因组生物学》15:110)。

[0620] 与标记质膜的条形码相比,标记核酸的条形码。可使用指南来制备化学物质文库,

其中每个化学物质或每类化学物质的所有成员与唯一的DNA条形码相关联(参见Brenner和Lerner (1992)《美国国家科学院院刊》89:5381-5383;Bose、Wan、Carr (2015)《基因组生物学》16:120。DOI 10.1186)。考虑到上面的条形码编码实例,以下提供另一种类型的条形码编码,其也可以应用到特定的单细胞。本公开提供了与细胞相关联的条形码,其采取稳定地连接到细胞质膜的标签的形式。

[0621] 选择连接到质膜结合的至少两种条形码。用于标记给定细胞的质膜的条形码可以包含标识细胞类型的第一条形码和标识暴露于细胞的扰动物的第二条形码。例如,第一条形码可以标识出所述细胞是来自健康人类受试者、来自临床研究7的38号人类受试者、人类原发性结肠直肠癌细胞系、五次传代的人类原发性结肠直肠癌细胞系、患有多发性骨髓瘤的多发性骨髓瘤人类受试者、初治的多发性骨髓瘤的23号人类受试者、或来自经过治疗的多发性骨髓瘤的32号人类受试者。

[0622] 另外,条形码可以标识给所述特定单细胞的“扰动物”(在条形码编码之前或之后给出)。“扰动物”可以是抗癌药、抗癌药的组合、组合产生的化合物或抗体药和小分子药的组合。条形码编码可以用于跟踪给定的单细胞,并可以用于使所述细胞与随后的行为(如通过一个或多个细胞信号通路的激活或抑制、迁移的增加或减少、细胞凋亡、坏死、一种或多种CD蛋白(CD;分化簇)的表达的改变、一个或多个致癌基因的表达的改变、一个或多个微RNA(miRNA)的表达的改变)相关联。表达可以是转录速率、细胞中给定多肽的水平、给定蛋白质从胞质到膜结合的位置变化等。

[0623] 标记膜结合糖蛋白的细胞表面寡糖。有方法和试剂可用于将标签(如DNA条形码)连接到活细胞的质膜。可以使用试剂来完成标记,所述试剂由DNA条形码的共价复合体与反应性部分组成,所述反应性部分攻击并共价结合膜结合糖蛋白的寡糖链。文献证实,酰肼生物胞素可以用于将生物素与膜结合糖蛋白上的碳水化合物连接。除了用DNA条形码代替生物素以外,本公开使用该试剂。碳水化合物需要被氧化形成醛。酰肼与醛反应形成肼键。寡糖上的唾液酸成分很容易被1mM的偏高碘酸钠(NaIO_4)氧化。在进行氧化步骤和酰肼连接步骤时,应避免使用带有伯胺基的缓冲液。参见,例如,“EZ-Link酰肼生物胞素说明”28020号。赛默飞世尔科技公司(2016)(4页),Bayer(1988)《分析生物化学(Analyt.Biochem.)》170:271-281;Reisfeld(1987)《生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》142:519-526,Wollscheid、Bibel、Watts(2009)《自然生物技术》27:378-386。

[0624] 标记活细胞上糖蛋白的寡糖部分的另一种方法是使用高碘酸盐氧化和苯胺催化的肼连接。此方法使用唾液酸的高碘酸盐轻度氧化,然后在苯胺存在下与氨基基标签连接。在此方法的一种变形中,半乳糖氧化酶可以用于将醛引入寡糖的端半乳糖残基和端N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基。半乳糖氧化酶催化碳-6处的氧化,生成醛。醛生成后,可以通过苯胺催化的连接与氨基氧生物素偶联(参见Ramya、Cravatt、Paulson(2013)《糖生物学(Glycobiology)》23:211-221)。本公开用DNA条形码代替生物素,并提供了氨基基-DNA条形码的苯胺-催化的连接。

[0625] 由与细胞表面结合的抗体介导的标记。本公开提供了将条形码连接到细胞质膜的方法和试剂,其中连接由特异性结合到膜结合蛋白的抗体介导。抗体可以用反式-环辛烯(TCO)共价改性,其中所述改性可以在4℃下过夜温育进行(参见Devaraj、Haun、Weissleder

(2009)的支持信息(5页)《应用化学国际版》48:7013-7016)。抗体的这种共价改性可以使用试剂反式环辛烯琥珀酰亚胺碳酸酯进行(Devaraj、Haun、Weissleder (2009)《应用化学国际版》48:7013-7016)。然后可以使抗体-四嗪复合体与细胞接触,产生膜结合的抗体。膜结合的抗体各自带有四嗪部分,这可以通过点击化学(如,将抗体暴露于DNA条形码-四嗪复合体)来标记抗体。

[0626] 可以使用试剂N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)在抗体的游离氨基上引入四嗪(参见van Buggenum、Gerlach、Mulder (2016)《科学报告》6:22675)。一旦抗体含有一个或多个四嗪基团,就可以使用试剂(TC0-DNA条形码)通过连接DNA条形码对抗体进行进一步改性。通过这种经过改性的抗体,所述抗体可以用于标记活细胞,其中抗体与细胞的膜结合蛋白结合。

[0627] 可以制备四嗪-DNA条形码复合体。然后将该复合体引入细胞培养基中,所述培养基中包含细胞,并且其中所述细胞带有连接的抗体-TC0复合体。当四嗪-DNA条形码与膜-结合的抗体-TC0复合体接触时,结果是点击化学反应,其中细胞被DNA条形码标记。该点击化学反应可以在37℃下进行30分钟。

[0628] 用于上述流程的优选抗体是那些与质膜的膜结合蛋白紧密结合且特异性结合的抗体,其中膜结合蛋白大量存在,例如每个细胞膜的拷贝数超过50,000,并且其中膜结合蛋白在细胞表面上是稳定的,不会大量回收到细胞内部,并且其中膜结合膜很少渗入培养基。

[0629] 用叠氮化物标记膜结合蛋白,然后用辛炔偶联物进行点击化学。可以通过酶,即硫辛酸连接酶将叠氮化物引入活细胞的膜结合蛋白上,然后将氟化辛炔化合物与DNA条形码偶联。描述了氟化辛炔化合物与荧光团的缀合(参见Jewett和Bertozzi (2010)《化学学会评论》39:1272-1279;Fernandez-Suarez、Bertozzi、Ting (2007)《自然生物技术》25:1483-1487)。为了重申这一点,“Ting和同事使用.硫辛酸连接酶...将叠氮化物引入哺乳动物细胞表面蛋白,然后可以用氟化的环辛炔偶联的荧光染料偶联的荧光染料标记蛋白质”(Jewett等人,同上)。

[0630] 实例7.皮可孔上方的盖

[0631] 封盖皮可孔。每个皮可孔都封盖有球体,每个皮可孔有一个球体,其中所述球体装配到皮可孔的孔口(顶部开口)。为了将所述球体施加到皮可孔板,将所述球体放入生长培养基中并悬浮,然后施加到皮可孔板的顶表面,并使所述球体沉降。然后,将整个板放入离心机中,并以低重力旋转,以使球体牢固地固定在每个皮可孔的孔口中。

[0632] 有源盖和无源盖。图18A示出了插入皮可孔顶部的有源盖。图18B示出了插入到皮可孔顶部的无源盖。优选地,所述盖由比用于制造皮可孔板的材料更软的材料制成,其中当所述盖被压入皮可孔的孔口中时,结果是盖的轻微变形,并且结果是防止泄漏的紧密贴合。在实施例中,本公开提供了有源盖、无源盖或有源盖和无源盖两者中的一个或多个。每个盖可以独立放置,并且不与任何其它盖连接。在替代实施例中,例如可以通过一片能够放置在板的顶面上的聚合物片将更多的盖连接在一起,并且其中多个盖从所述片的聚合物的底部突出,并且其中突出的盖被预定地间隔开以便装配到每个皮可孔中。可以使用有源盖代替能够放在皮可孔板上的珠粒。有源盖含有许多基本上相同化合物的连接拷贝,其中每种化合物连接到有源盖上(本文示出在球形珠粒的样品中),并且其中切割会导致化合物释放到驻留在皮可孔中的溶液中(图18A)。

[0633] 关于无源盖,无源盖是多孔的并且其作用类似于海绵。无源盖吸收生化反应中的

产物,因此有助于收集产物,其中用户的目标是确定给定化合物对皮可孔培养的活生物细胞的影响。换句话说,所述化合物刺激细胞作出应答,其中应答采取一种或多种代谢物表达增加(或减少)的形式,并且其中一些代谢物向无源盖扩散并被无源盖吸收。然后,用户可以收集无源盖并分析已吸收到无源盖的代谢物(图18B)。

[0634] 粘附到盖的阵列的聚合物垫。图19示出了能够粘附到多孔盖阵列中的每个盖的聚合物垫。一旦粘附,就可以将聚合物垫剥离并去除,从而带走阵列中的每个多孔盖。结果,具有多孔盖的聚合物垫可用于测量与多孔盖相关联的代谢物或其它化学物质的测定。

[0635] 为了提供逐步的实例,成千上万皮可孔的阵列中的每个孔可以含有一个珠粒,其中每个珠粒含有一种类型的化合物,其中所述化合物通过可切割连接子连接。皮可孔还含有溶液以及培养的细胞。皮可孔用多孔盖密封,并且其中多孔盖与溶液接触并能够捕获(采样;吸收;吸收)从培养的细胞中释放出来的代谢物。代谢物可以是化合物的代谢物,或者代谢物可以采取细胞因子、白介素、中间代谢物、microRNA分子、外泌体等形式。最后,将聚丙烯酰胺溶液倒入皮可孔板上,然后将聚丙烯酰胺浸入成千上万个多孔盖中,然后以牢固粘附在每个盖上的垫子形式固化。然后去除胶化的垫子,其中针对吸收的代谢物分别分析每个盖。

[0636] 在优选的实施例中,使用聚丙烯酰胺凝胶将封盖珠粒交联到啮合层或垫子中。产生20%聚丙烯酰胺溶液的方案如下,所述溶液可以倾倒在皮可孔阵列上方以固化和啮合封盖珠粒。将4ml的40%双丙烯酰胺溶液和2ml的1.5M Tris (pH为8.8) 添加到1.8ml蒸馏去离子水中。将此混合物倒入封盖的皮可孔阵列之前,加入80微升的自由基引发剂过硫酸铵(APS,10%储备液)和8微升的自由基稳定剂N,N,N',N'-四甲基乙烯-二胺(TEMED)以开始凝胶的交联。在完全交联之前倒入凝胶层,并允许在封盖的皮可孔阵列上方完全交联。一种完全交联的(足以处理的刚性,或大约60分钟的固化),可以使用镊子将聚丙烯酰胺层剥离。发现封盖珠粒从皮可孔的顶部提起并连接到聚丙烯酰胺层。对于多种珠粒类型(包含聚丙烯酰胺珠粒、Tentagel珠粒、聚苯乙烯珠粒和二氧化硅珠粒),可以观察到此行为。

[0637] 测量盖防止泄漏的功效。在实施例中,可以通过将珠粒与光可切割连接子一起使用来确定盖的功效。可以在将皮可孔暴露于UV光之前,以及在将皮可孔暴露于UV光之后的时间范围内,捕获皮可孔或一个特定皮可孔阵列中的几个皮可孔的图像。例如,可以在 $t =$ 负十秒和 $t = 10$ 秒、20秒、40秒、60秒、2分钟、4分钟、8分钟、15分钟、60分钟、90分钟、2小时、3小时和4小时时捕获图像。可以示出优异的功效,其中给定孔在2小时时的荧光等于在 $t = 10$ 秒时发现的荧光的至少90%、至少95%、至少98%或约100%,减去在 $t =$ 负十秒时拍摄的背景图像。也可以对皮可孔外部的皮可孔板的区域,例如在所述盖附近,拍摄图像。可以显示出优异的功效,其中板表面(皮可孔外部)和所述盖附近的区域的荧光小于1%、小于0.5%、小于0.1%、小于0.05%、小于0.01%、小于0.005%或小于0.001%。可以不考虑孔中流体的体积,并且也不考虑位于板顶部和盖外部的任何流体的体积进行这种比较,并且在本文中,所述比较可以只考虑全部光检测器捕获的视野。可替代地,可以通过校正流体的深度(皮可孔的深度;皮可孔板顶部上的流体的深度)来进行比较。同样可替代地,所述比较可以考虑皮可孔板的整个表面上方的任何泄漏的荧光团的扩散。

[0638] 条形码编码如何装配到本公开的试剂和方法。以下提供了本公开的试剂和方法的进一步的实施例。

[0639] 试剂和能力。提供了微珠粒。可以通过多个第一连接子对微珠粒进行共价改性,每个连接子能够通过固相合成与单体偶联,其中固相合成的完成会创建化学文库的成员。化学文库的此成员是珠粒结合的。相同的微珠粒可以通过多个第二连接子进行共价改性,每个连接子能够与多个DNA条形码偶联。DNA条形码的此成员是珠粒结合的。

[0640] 实例9. 本公开的DNA条形码

[0641] 这涉及可以打印在纸上或以计算机语言存储的一组信息,所述信息提供了使DNA序列与化学文库成员相关的“DNA条形码”。此DNA条形码可被称为“图例”或“密钥”。DNA条形码还提供了可以标识特定种类的化合物的核酸,如特定的FDA批准的抗癌药物的类似物,或者可以标识用户的姓名,或者可以标识要通过珠粒结合的化学文库进行测试的特定疾病。

[0642] 实例10. 来那度胺类似物

[0643] 图13、14和15公开了来那度胺转换成三种不同的衍生物,每个衍生物带有羧酸基团。这些羧酸基团中的每个随后都可以用于珠粒-连接子复合体缩合。在这种情况下,羧酸基团缩合到珠粒-连接子复合体,其连接到由Fmoc先前占据的位置。

[0644] 从伯胺开始并将其转化为羧酸(图13)。申请人采取通过将具有伯胺的化合物转化为具有羧基的化合物来生成化合物文库的方法。图13公开了从利那度胺开始。来那度胺具有伯胺。向其中添加琥珀酸酐的4-二甲基氨基吡啶(DMA)和乙腈(ACN)溶液。琥珀酸酐与伯氨基缩合,产生带有羧酸基的来那度胺。术语“cat.”在图中意指催化性。

[0645] 随后,此羧酸基团可以与珠粒连接。因此,所得复合体为:珠粒-琥珀酸部分-来那度胺

[0646] 图14公开了从利那度胺开始并添加溴-乙酸叔丁-酯以得到中间体。然后将中间体用FmocOSu(邻琥珀酰亚胺)处理,以产生最终产品,所述产品是来那度胺的羧酸衍生物。然后可以使羧酸部分与游离氨基缩合,例如与曾经具有连接的Fmoc基团的游离氨基缩合。可替代地,可将羧酸与驻留在珠粒上的化学单体的游离氨基缩合,其中缩合的结果是两个彼此连接的化学单体。

[0647] 图15公开了来那度胺为起始材料。来那度胺与3-羧基苯甲醛反应,其中醛基与氨基缩合,生成来那度酰亚胺的另一种羧酸衍生物。

[0648] 图16A、图16B和图16C公开了申请人的又另一种方法,用于生成新颖且独特的与珠粒结合的化合物,其中化合物可从珠粒中释放出来,然后在基于细胞的测定或无细胞的测定中进行活性测试。这三种化合物中的每种化合物是来那度胺类似物,其中伯胺在苯环的独特位置。

[0649] 实例11. 含有细胞以及具有偶联的应答捕获元件的珠粒的皮可孔。

[0650] 本公开提供了用于评估细胞对化合物的应答的试剂、系统和方法,并且其中所测量的应答采取转录组变化的形式。“转录组的变化”可以指,在不暗示任何限制的情况下,改变细胞中每种独特的mRNA的量,以及改变细胞中预定的一组mRNA分子的量。“转录组的变化”包含从检测下限以下到变为可检测的变化,以及从可检测到下降到检测下限以下的变化,这些变化与珠粒结合的化合物的释放有关。

[0651] 可以通过在皮可孔阵列中添加去污剂或表面活性剂来裂解细胞。例如,可以将一定体积的含有去污剂的缓冲液吸移到微孔中,所述微孔中含有成千上万的皮可孔。可以使去污剂扩散到所有皮可孔中,引起其中的细胞裂解、mRNA释放并最终通过珠粒结合的“捕获

应答元件”进行结合。

[0652] 细胞裂解。可以通过冷冻和解冻的一个或多个循环来裂解细胞 (Bose、Wan、Carr (2015)《基因组生物学》16:120。DOI 10.1186)。细胞也可以用全氟-1-辛醇摇动裂解 (Macosko、Basu、Sati ja (2015)《细胞》161:1202-1214; Ziegenhain (2017)《分子细胞》65: 631-643; Eastburn、Sciambi、Abate (2014)《核酸细胞研究》42:e128)。此外,细胞可以通过表面活性剂(**Tween-20®**)和蛋白酶的组合作来裂解 (Eastburn、Sciambi、Abate (2013)《分析化学》85:8016-8021)。细胞裂解导致在mRNA的释放。mRNA被珠粒捕获,所述珠粒与裂解的细胞(或多个细胞)位于同一皮可孔。珠粒含有大量的珠粒结合的多核苷酸,其中每个多核苷酸含有两个核酸,其中第一个核酸含有通用的DNA条形码并且第二个核酸含有“应答捕获元件”。如果靶标是无差别地捕获细胞中的所有mRNA,则“应答捕获元件”可以采取poly (dT)的形式。此poly (dT)与mRNA分子的poly (A)尾结合。

[0653] 更多的细胞裂解条件。细胞裂解可通过将其暴露于含钠盐的去污剂中进行,例如,含15mM NaCl、25mM NaCl、50mM NaCl、75mM NaCl、100mM NaCl的0.05%Triton X-100,含15mM NaCl、25mM NaCl、50mM NaCl、75mM NaCl、100mM NaCl的0.1%Triton X-100,含15mM NaCl、25mM NaCl、50mM NaCl、75mM NaCl、100mM NaCl的0.2%Triton X-100,或含15mM NaCl、25mM NaCl、50mM NaCl、75mM NaCl、100mM NaCl的0.5%Triton X-100,或含钾盐的去污剂如含15mM KCl、25mM KCl、50mM KCl、75mM KCl、100mM KCl的0.05%Triton X-100,含有15mM KCl、25mM KCl、50mM KCl、75mM KCl、100mM KCl的0.1%Triton X-100,含15mM KCl、25mM KCl、50mM KCl、75mM KCl、100mM KCl的0.2%Triton X-100,或含15mM KCl、25mM KCl、50mM KCl、75mM KCl、100mM KCl的0.5%Triton X-100。在约4摄氏度或室温(23摄氏度)下,可以暴露10分钟、20分钟、40分钟或60分钟等。

[0654] 本公开可以评估化合物对表达谱的影响。珠粒结合的捕获元件可以采取一种或多种脱氧核糖核苷酸的形式,所述脱氧核糖核苷酸可以与一种或多种目的mRNA分子特异性杂交,其中一种或多种mRNA分子与特定疾病相关联。各种疾病的表达谱可用于,例如结肠癌 (Llarena (2009)《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》25:155 (e22182),卵巢癌 (Spentzos (2005)《临床肿瘤学杂志》23:7911-7918)以及肺腺癌 (Takeuchi (2006)《临床肿瘤学杂志》11:1679-1688)。举一个类似的实例,也可以表征的是所释放的化合物对与已经转移到肝脏的非肝肿瘤细胞相关联的mRNA的影响(参见Barshack、Rosenwald、Bronfeld (2008)《临床肿瘤学杂志》26:15Suppl.11026,Barshack (2010)《国际生物化学与细胞生物学期刊(Int.J.Biochem.Cell Biol.)》42:1355-1362.)。

[0655] 捕获转录组。可通过将其polyA基团与固定的poly (dT)杂交来捕获mRNA的方法(参见Dubiley (1997)《核酸研究》25:2259-2265; Hamaguchi、Aso、Shimada (1998)《临床化学(Clinical Chem.)》44:2256-2263; D.S.Hage (2005)《亲和色谱手册(Handbook of Affinity Chromatography)》,第2版,CRC出版社,第549页)。

[0656] 捕获从裂解细胞(或多个裂解细胞)释放的mRNA分子后,珠粒结合的多核苷酸用作支持从mRNA反转录的引物,从而产生珠粒结合的互补DNA (cDNA),并且在其中可以对珠粒结合的cDNA进行测序。可替代地,可以从珠粒释放珠粒结合的cDNA,其中珠粒结合的“应答捕获元件”通过可切割连接子(如光可切割连接子)偶联到珠粒。如果使用光可切割连接子,则切割释放珠粒结合的化合物(由化学单体库制成的化合物)的条件,但不切割珠粒结合的

“应答捕获元件”。

[0657] 如果细胞暴露于珠粒结合的化合物或从珠粒释放的化合物中,则可以筛选细胞的遗传应答,例如,通过表征转录组(暴露于或未暴露于化合物)中的任何变化。另外,可以筛选细胞的表型应答,例如凋亡,一种或多种细胞信号蛋白的活性变化或一种或多种CD蛋白的细胞表面表达变化。CD是分化簇(参见,Lal (2009)《分子细胞蛋白质组学(Mol. Cell Proteomics)》8:799-804;Belov (2001)《癌症研究》61:4483-4489;IUIS/WHO CD命名小组委员会(1994)《世界卫生公报(Bull. World Health Org.)》72:807-808;IUIS-WHO命名小组委员会(1984)《世界卫生公报》62:809-811)。对于某些表型应答测定,不得裂解细胞。

[0658] 本公开解决了例如通过将单细胞暴露于一种类型的药物(其中在皮可孔中发生暴露)来将不同的药物分配给不同的细胞的未满足的需求。

[0659] 本公开还消除了制备条形码的mRNA的需要,其中从细胞释放mRNA,然后制备cDNA(在这种条形码中,当转录体被覆盖到相应的cDNA的文库中时,来自给定细胞的所有mRNA都接收相同的条形码)。

[0660] 细胞与扰动物温育期间的参数。对于任何给定的化合物或其它某一类型的扰动物、可以改变的参数或控制光、温度、细胞培养基的pH值、声音、浓度和对试剂的暴露时间(试剂可以是从小珠粒中释放出来的化合物、酶底物、细胞因子、已经是公认药物的化合物、盐)、机械搅拌、针对细胞表面蛋白的抗体等。

[0661] 对细胞进行条形码编码。可以将细胞与珠粒结合的化合物一起温育,或与从珠粒结合的可切割连接子切割后的化合物一起温育。温育期间或之后,细胞可用标识扰动物的膜结合条形码进行条形码编码。这种膜结合条形码可以偶联到细胞膜的寡糖、细胞膜的多肽或细胞膜的磷脂。

[0662] 应答捕获元件而不是poly(dT)。可以通过5'-7-甲基鸟苷盖捕获信使RNA。在polyA尾较短的情况下,此方法特别有用(参见Blower、Jambhekar (2013)《公共科学图书馆:综合》8:e77700)。同样,可以使用对mRNA编码区特异的固定DNA捕获mRNA。此方法被称为“RNA外显子组捕获”,以及此名称的变体。根据Cieslik等人,“独特的捕获转录组学是使用外显子靶向性RNA探针进行的过夜捕获反应(RNA-DNA杂交)”(Cieslik (2015)《基因组研究(Genome Res.)》25:1372-1381)。

[0663] 微RNA(miRNA)。本公开可以评估释放的珠粒结合的化合物对给定细胞中miRNA的表达谱的影响,或者可替代地,对特定miRNA物种特异结合的mRNA的表达谱的影响(Jain、Ghosh、Barh (2015)《科学报告》5:12832)。例如,本公开提供了珠粒,其含有:(1)珠粒结合的化合物;(2)珠粒结合的DNA条形码;(3)珠粒结合的应答捕获元件,其中所述应答捕获元件捕获miRNA,或者其中所述应答捕获元件包含一种miRNA(作为应答捕获元件的一部分)。已经发现针对各种类型的癌症的microRNA的表达谱,例如乳腺癌乳腺癌(Tanja (2009)《临床肿瘤学杂志》27:15Suppl. 538)。

[0664] 有方法可以从整个转录组中捕获选定的mRNA群体。可以通过使用一种类型的microRNA(miR-34a)作为“下拉”测定中的桥接化合物来赋予选择性。简而言之,“使用miR-34a下拉的转录本为:.丰富了它们在生长因子信号传导和细胞周期进程中的作用”(Lal、Thomas、Lieberman (2011)《公共科学图书馆:遗传学(PLOS Genetics)》7:e1002363)。被捕获的mRNA分子是与miR-34A结合的分子。

[0665] 可以使用捕获mRNA和分析表达水平的其它方法(Bacher (2016)《基因组生物学》17:63;Svensson (2017)《自然方法》14:381;Miao和Zhang (2016)《定量生物学》4:243;Gardini (2017)《自然方法》12:443)。可以测量采取增强子RNA改变形式的细胞应答(参见Rahman (2017)《核酸研究》45:3017)。

[0666] 本发明不受本公开的组合物、试剂、方法、系统、诊断、实验室数据等的限制。而且，本发明不受本文公开的任何优选实施例的限制。

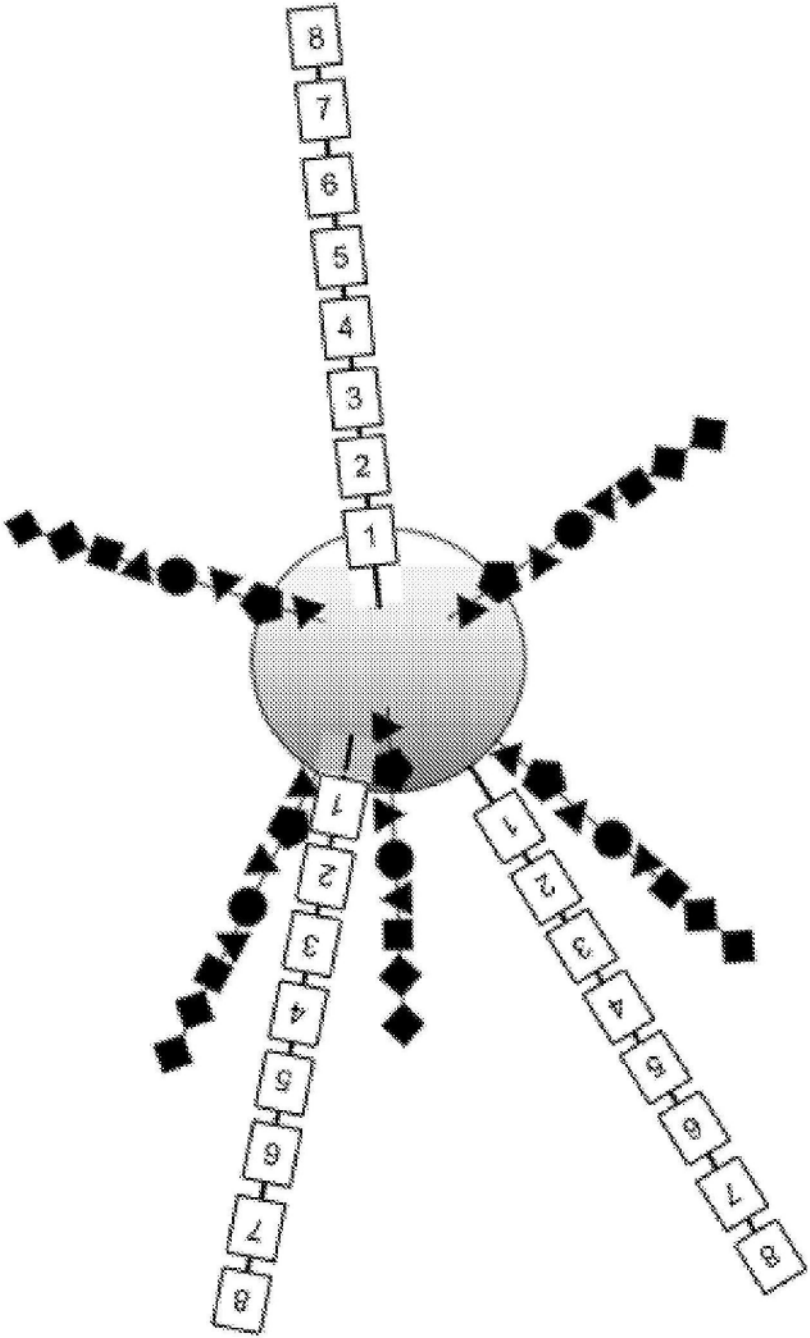


图1

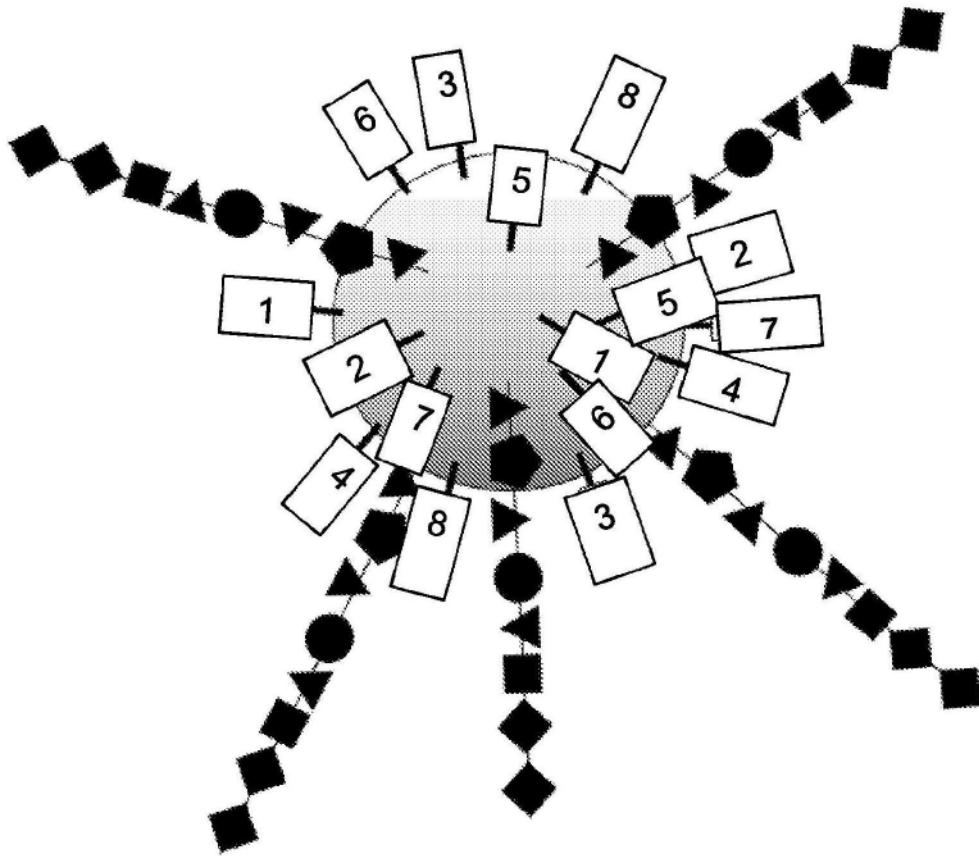


图2

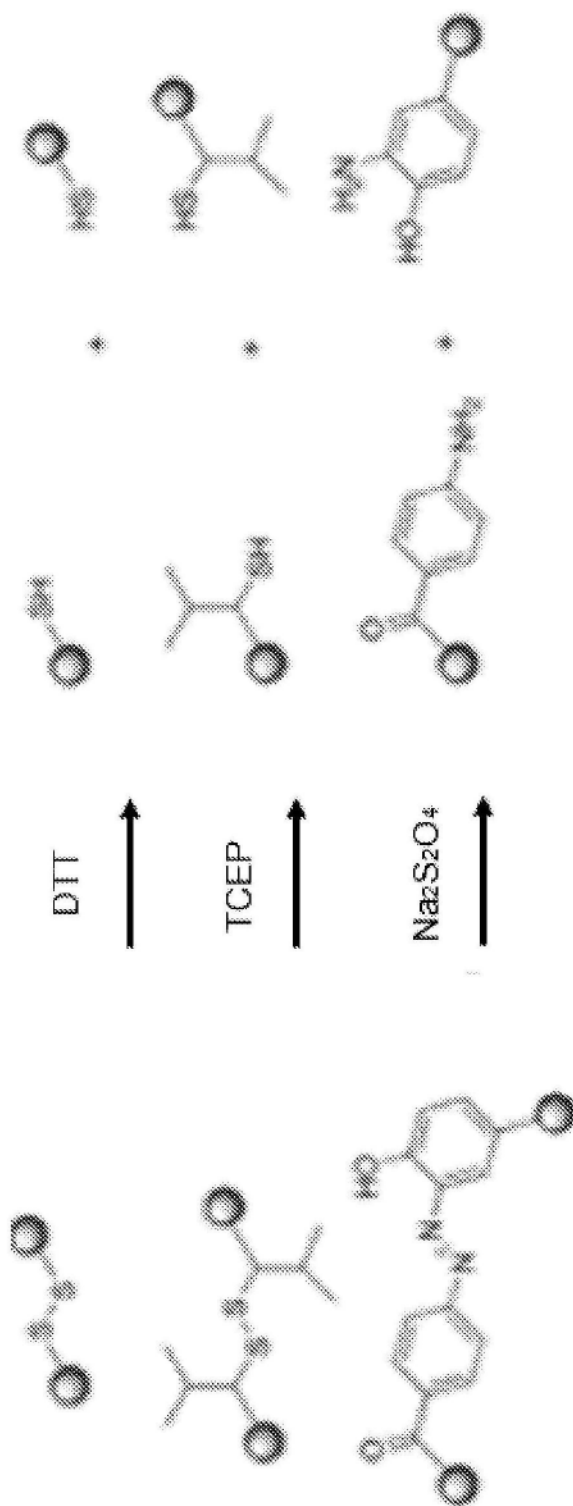


图3

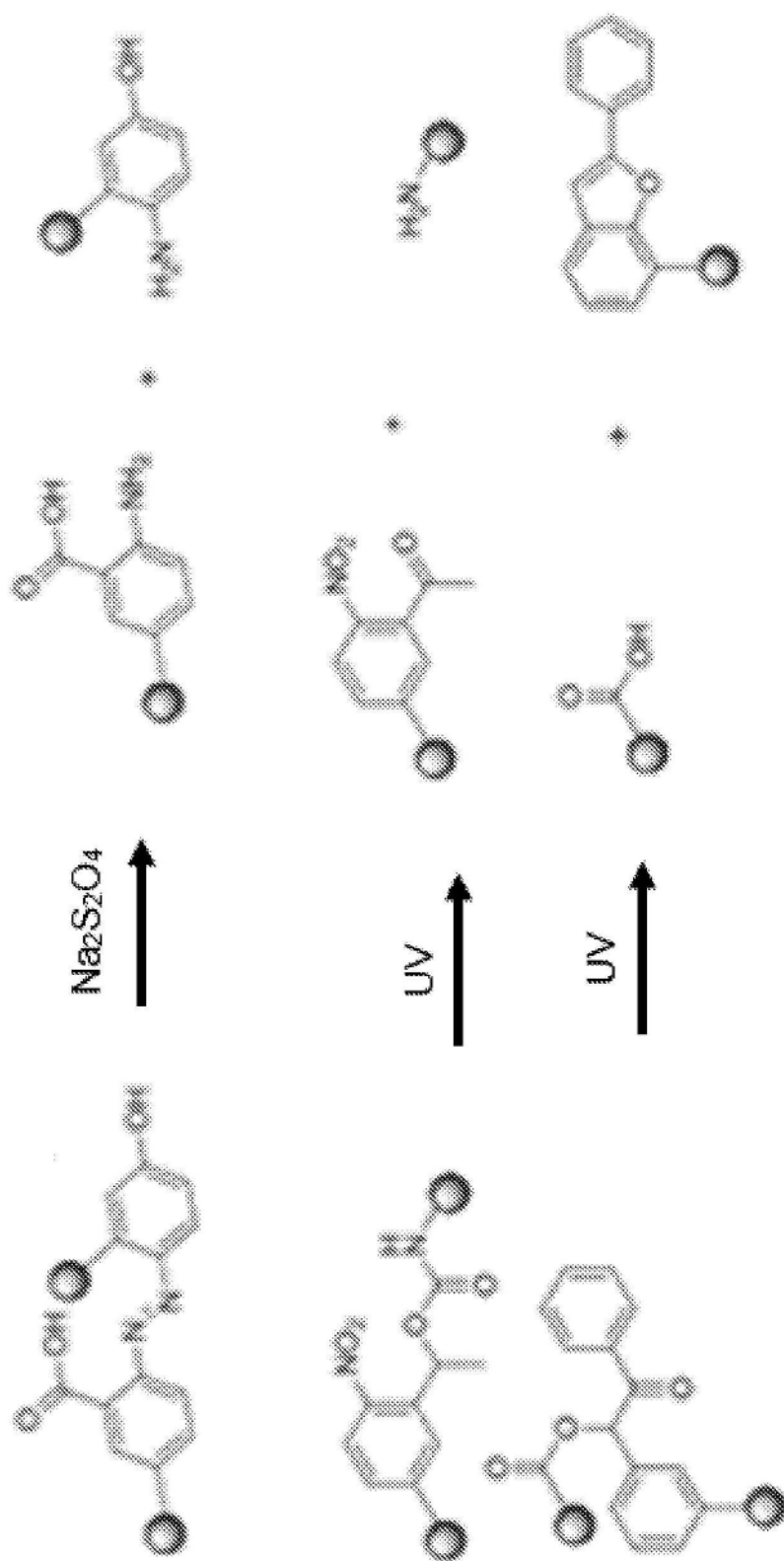


图3(续)

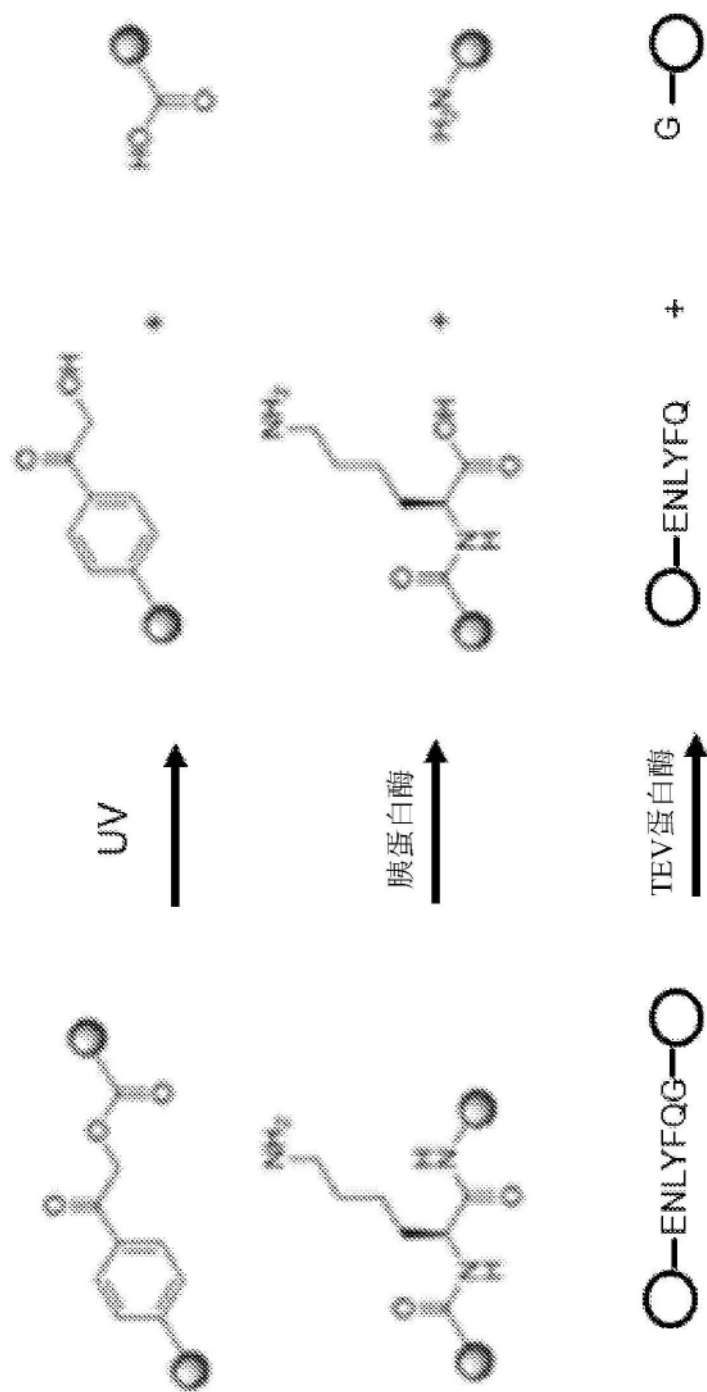


图3(续)

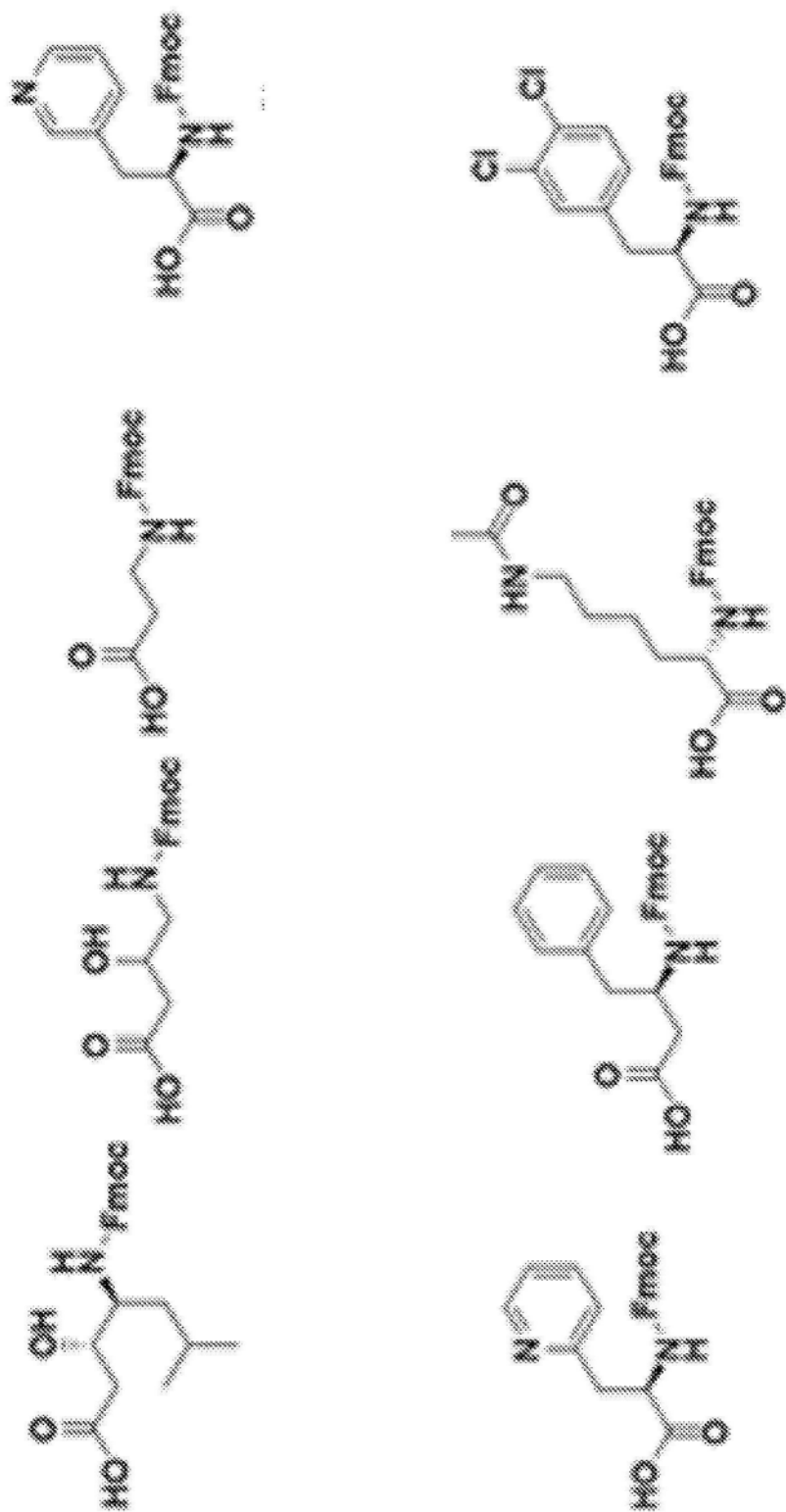


图4

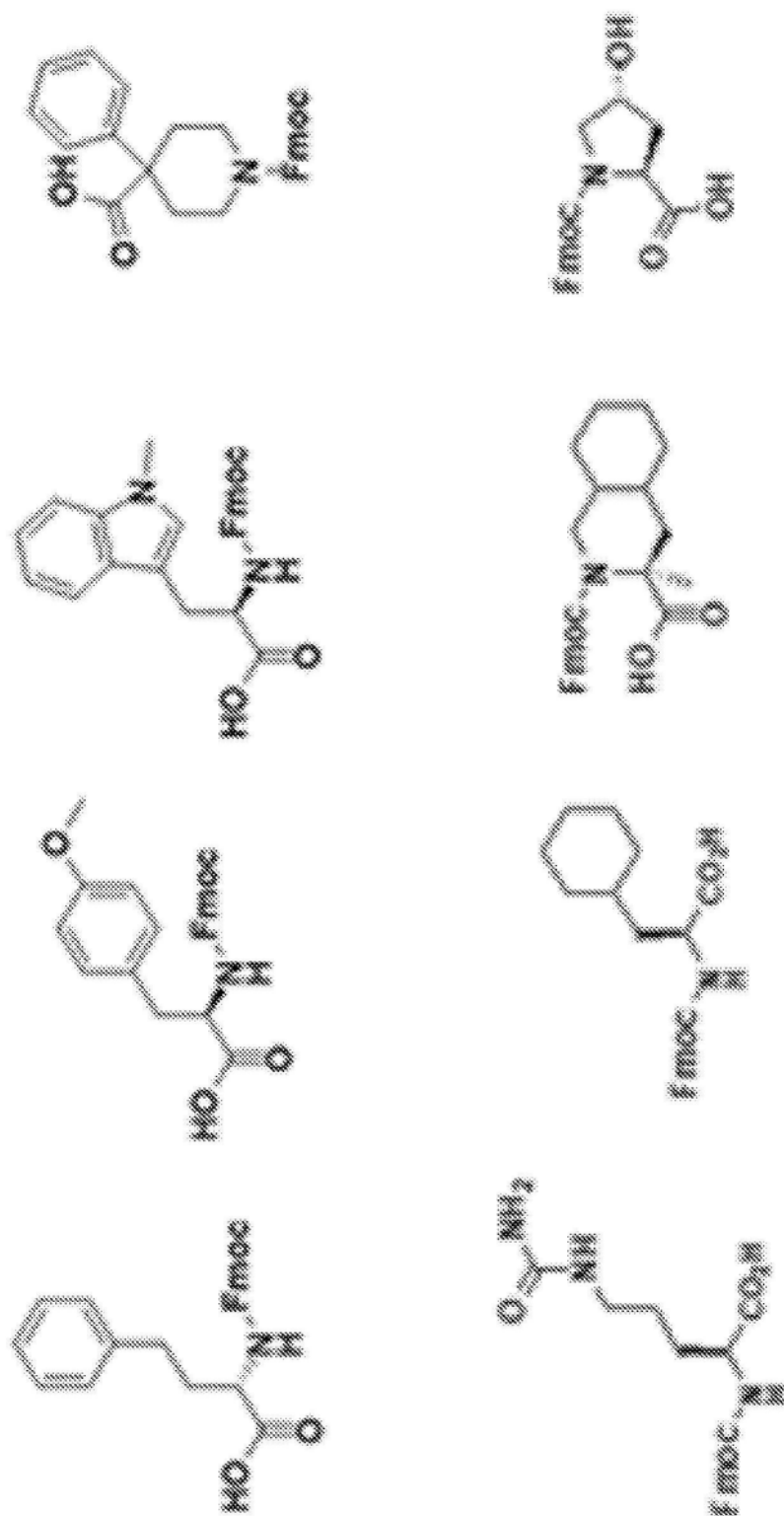


图4(续)

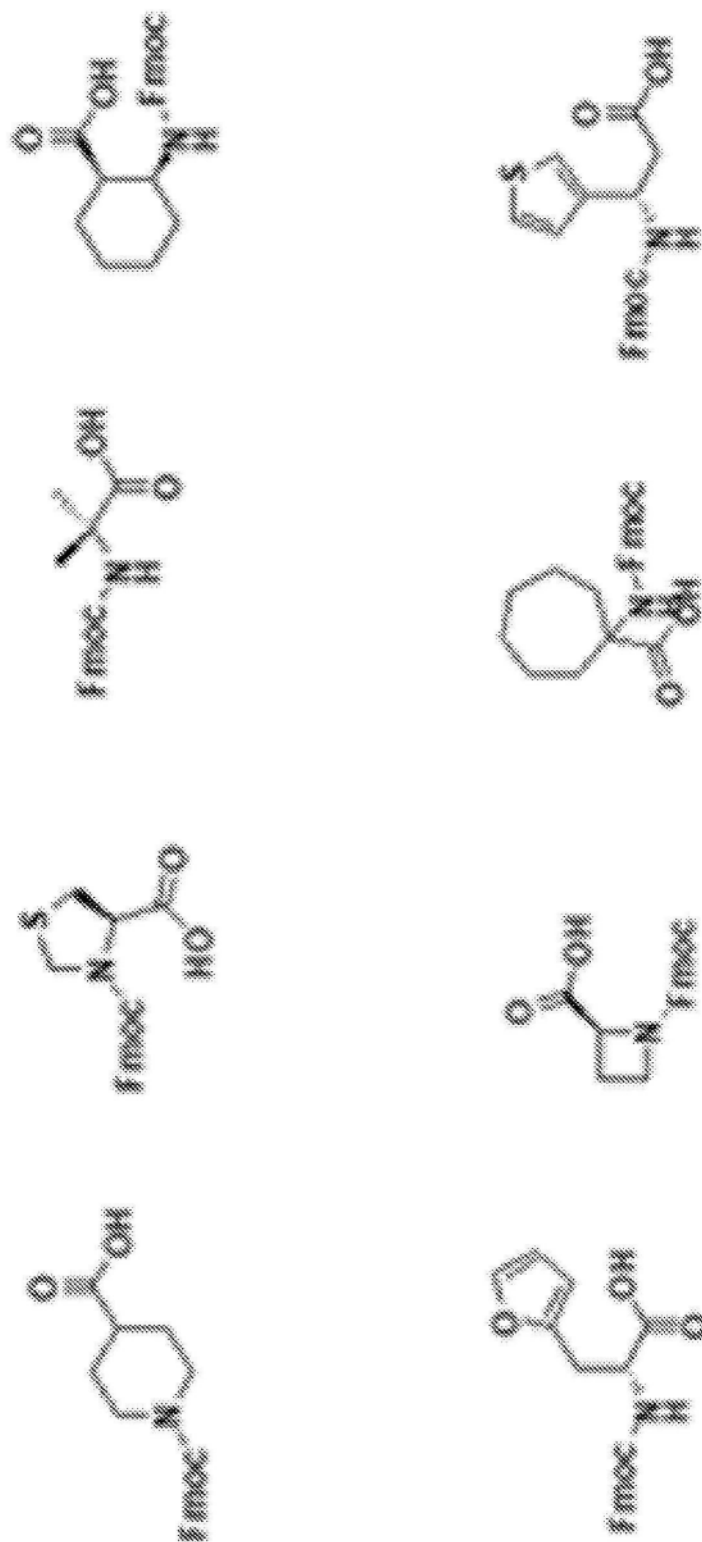


图4(续)

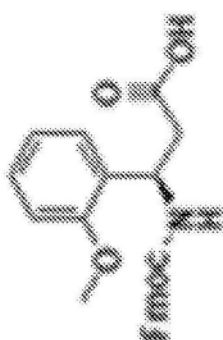
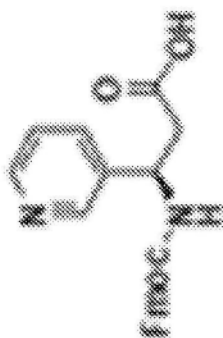
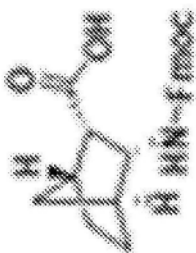
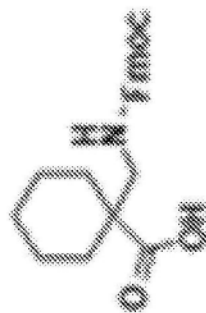


图4(续)

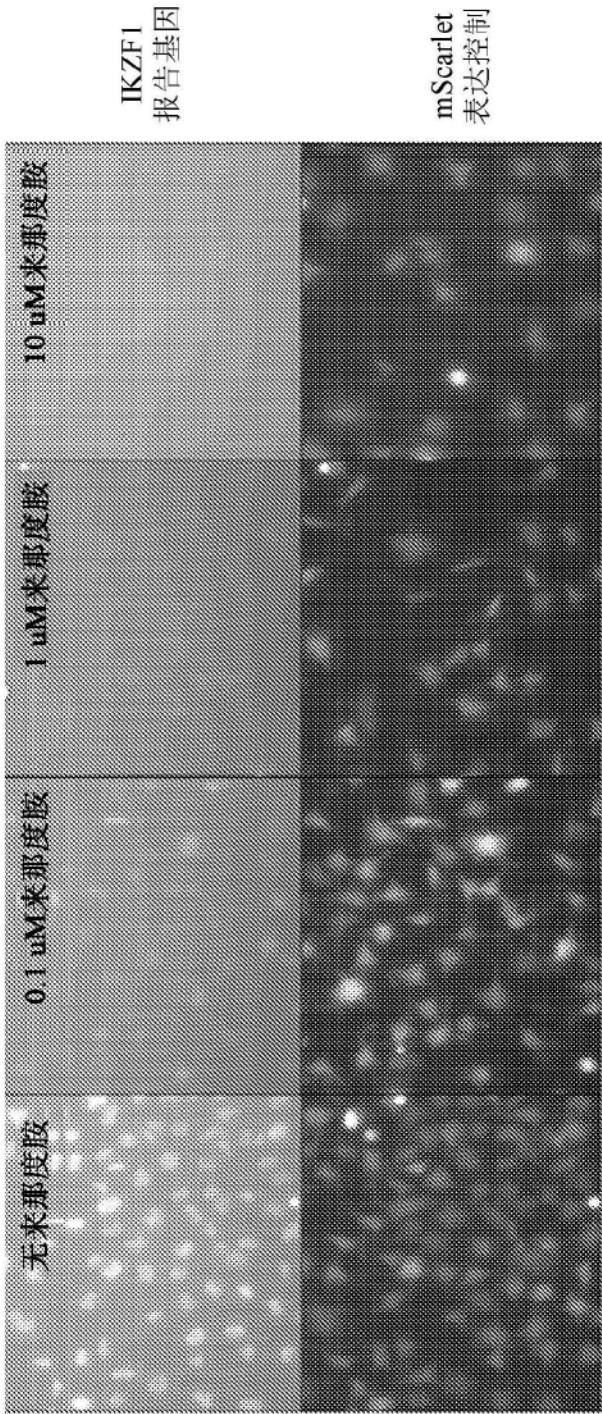


图5

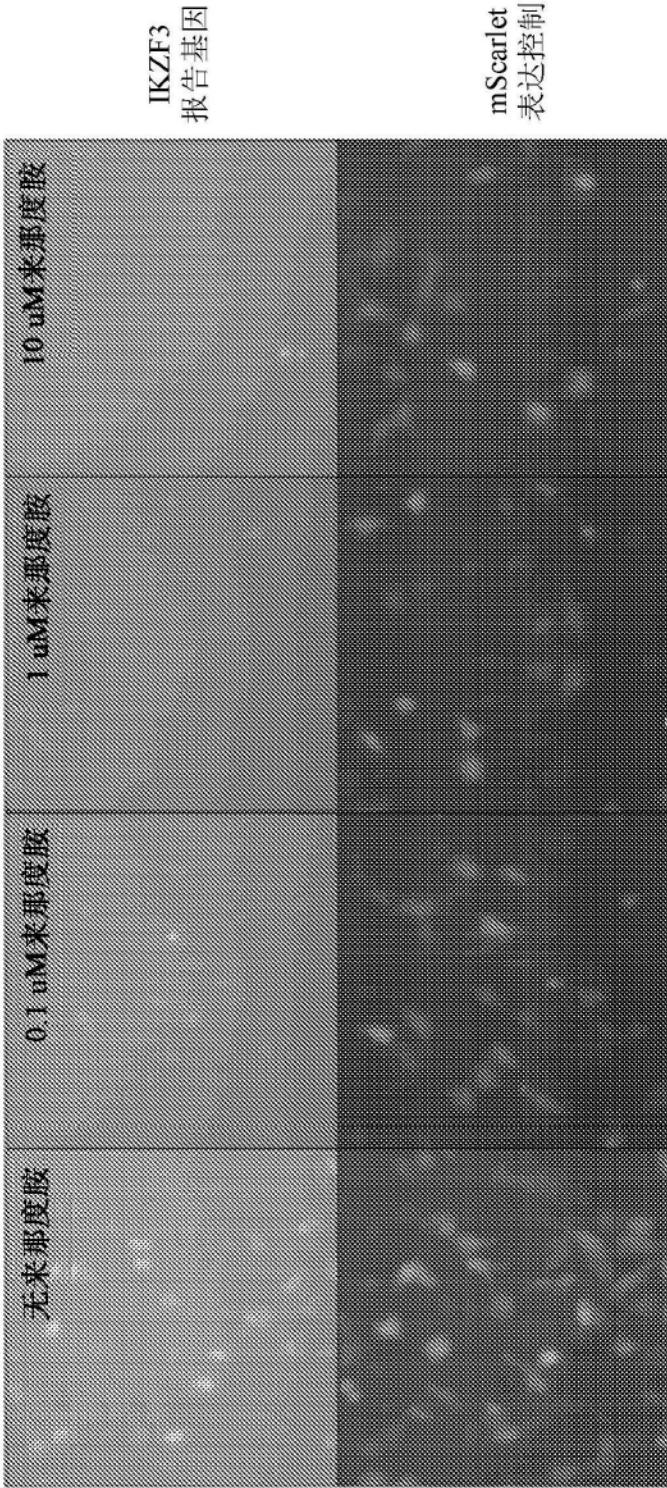


图6

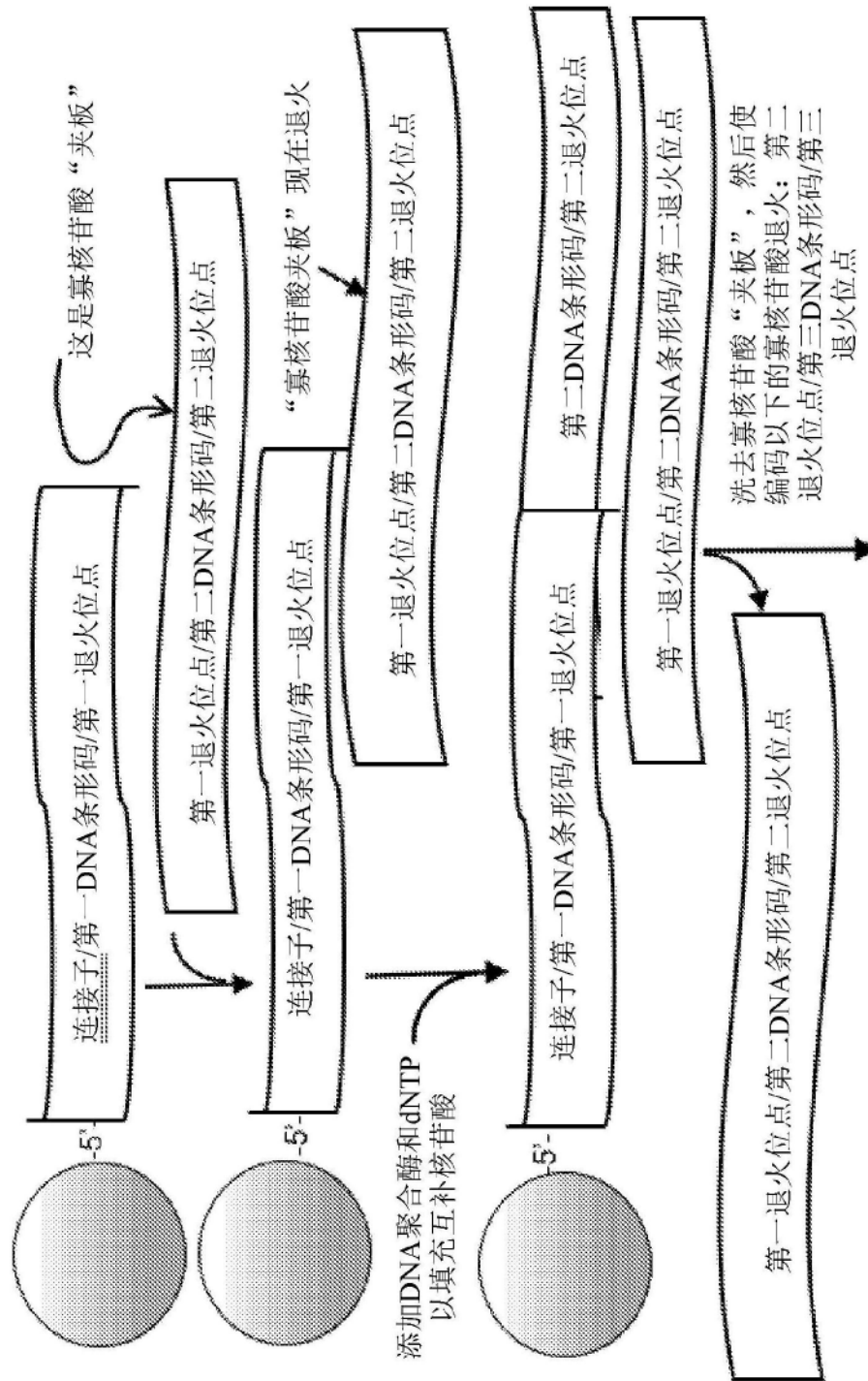


图7

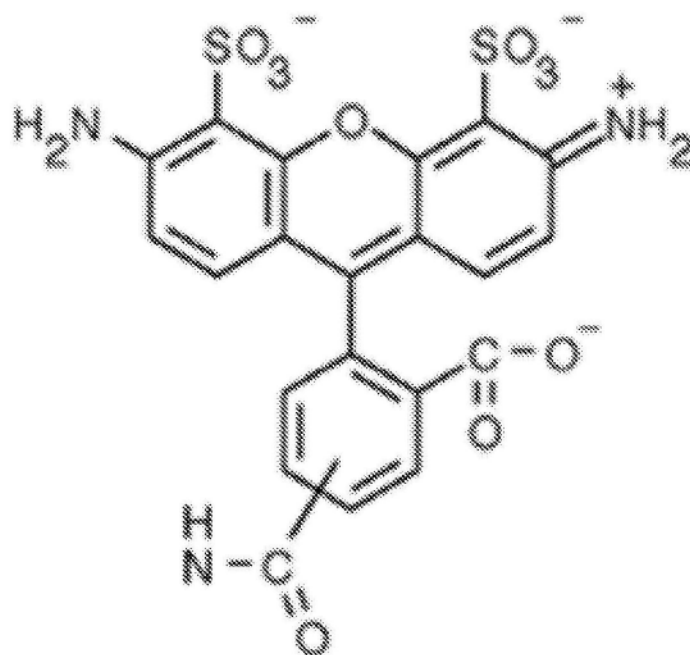


图8

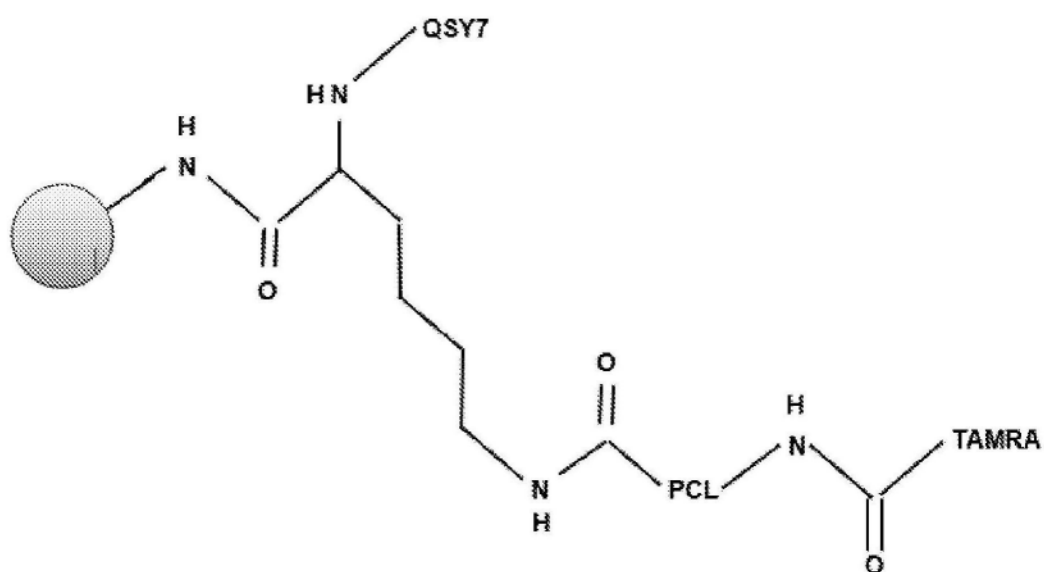


图9

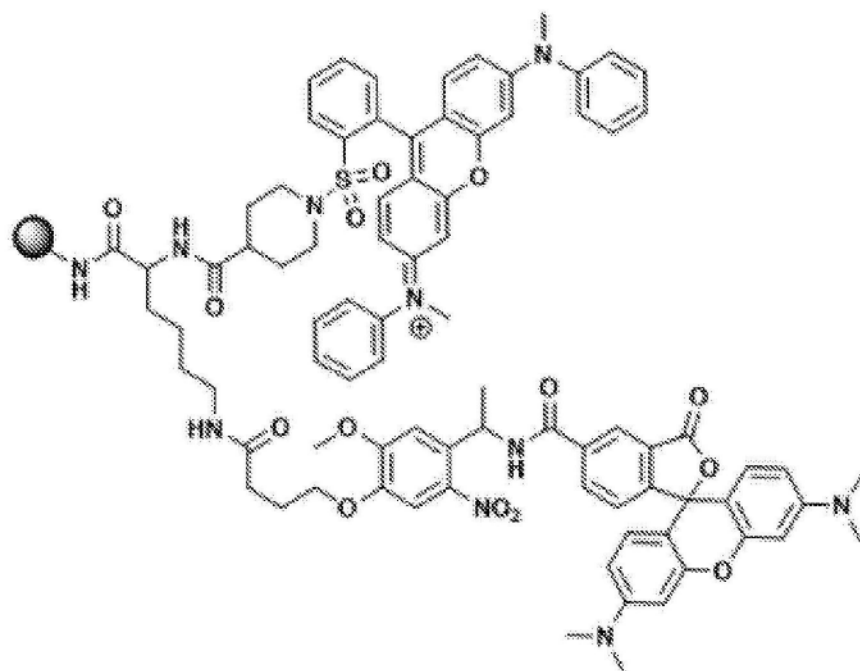


图10

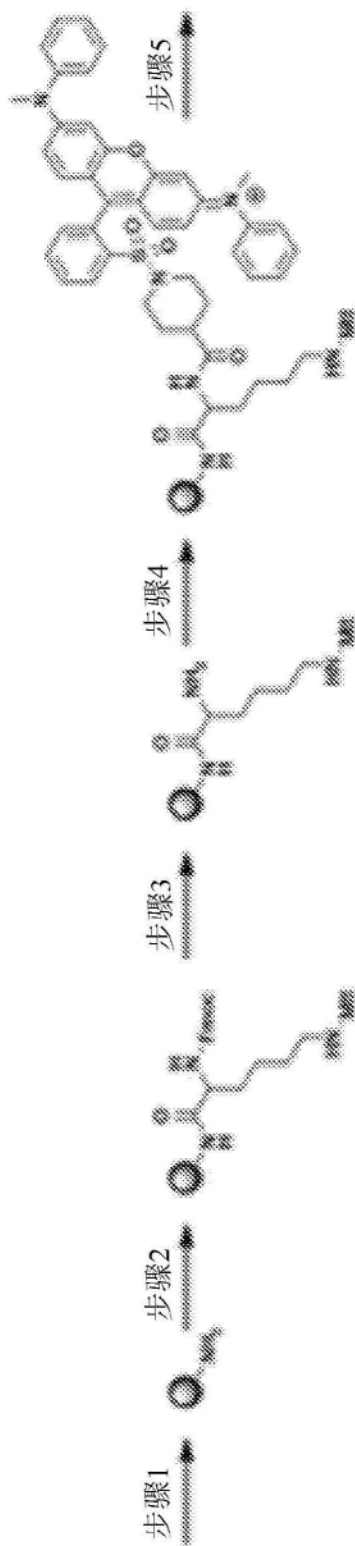


图11

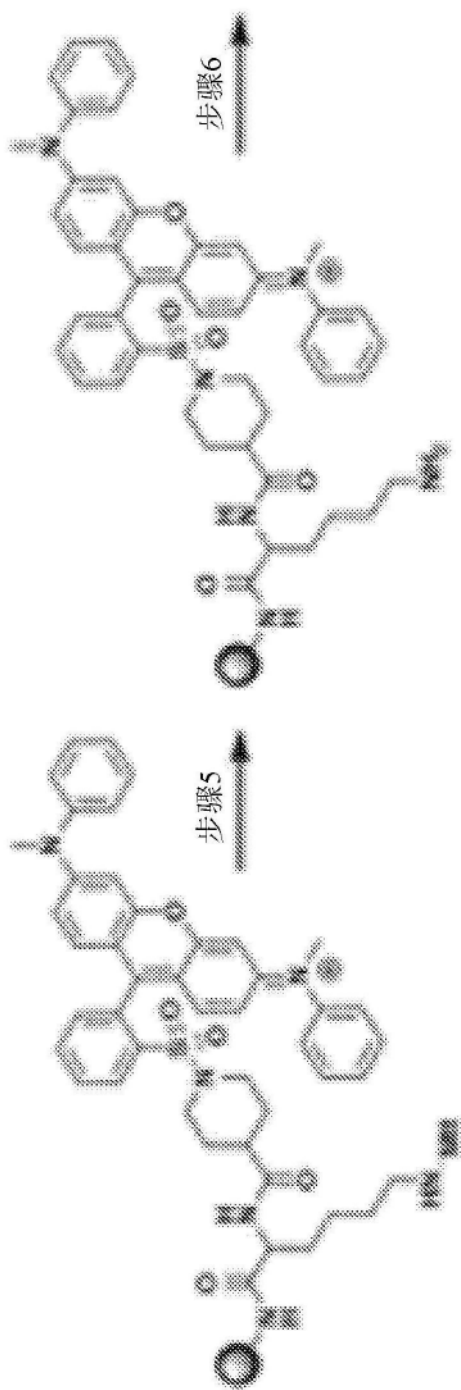


图11 (续)

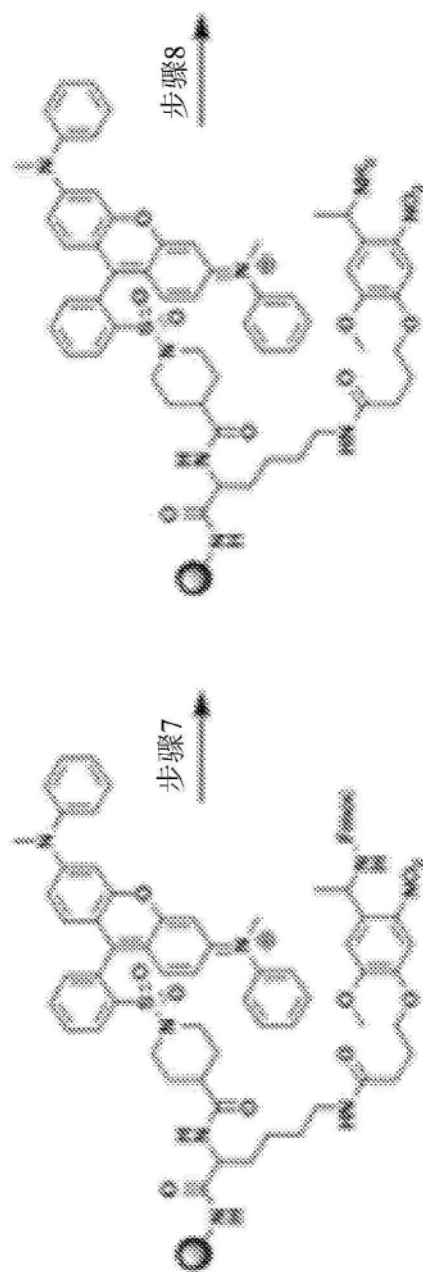


图11 (续)

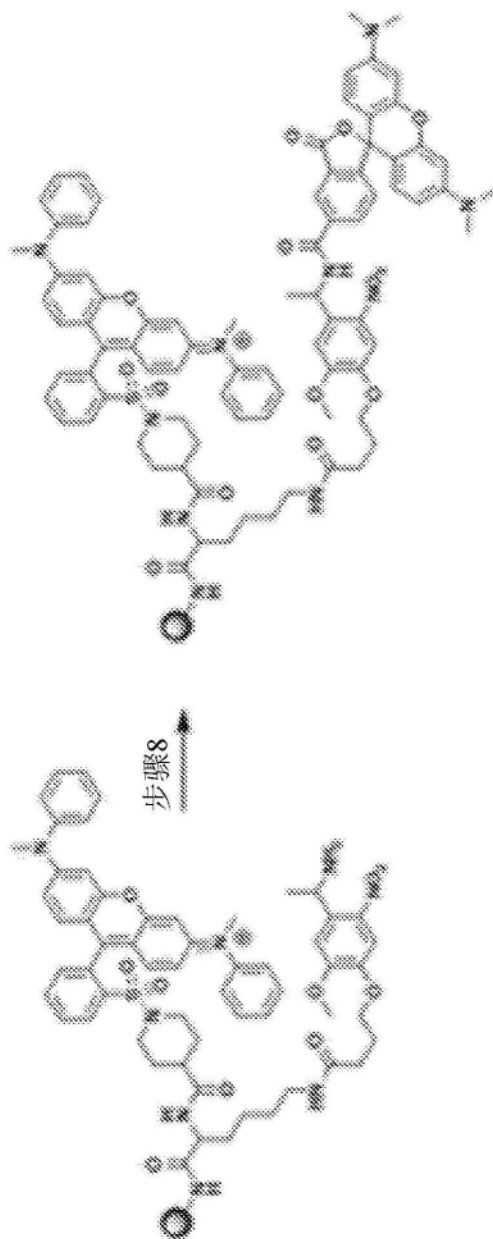


图11 (续)

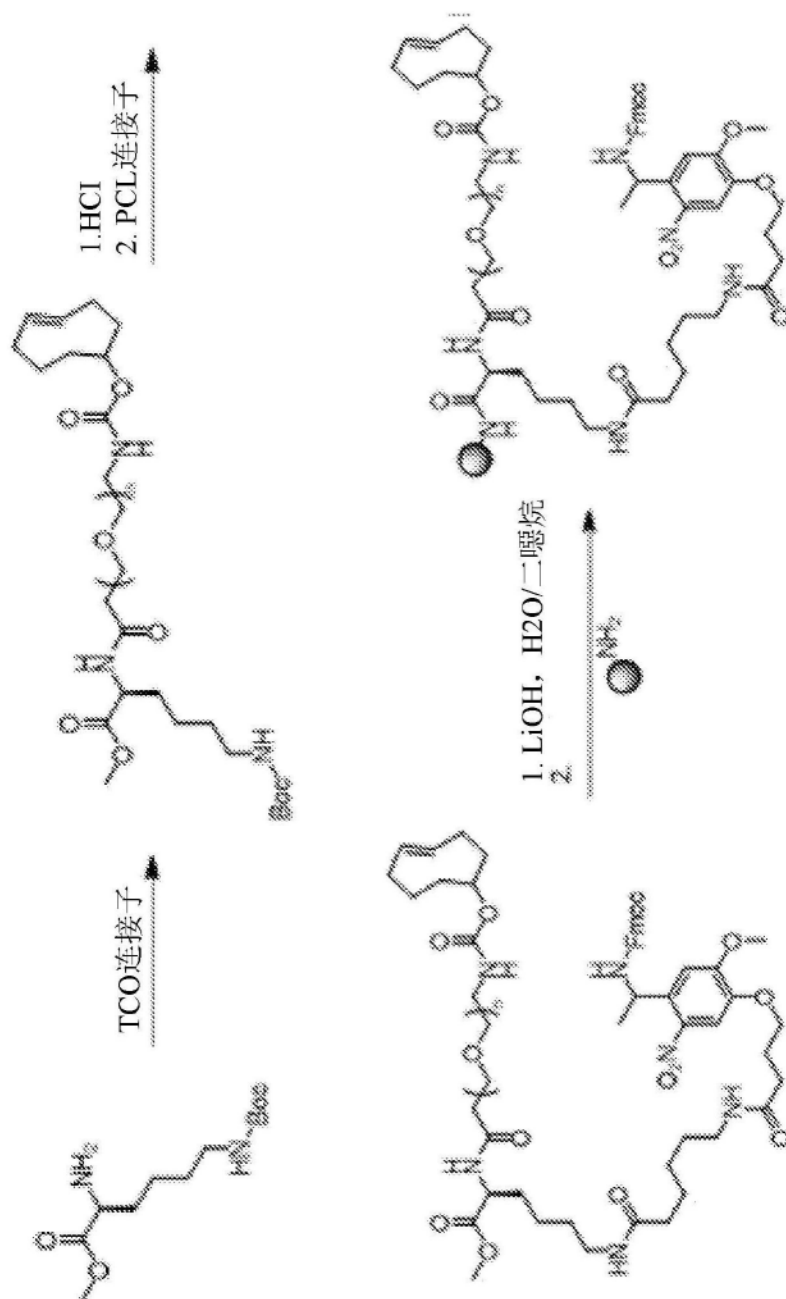


图12

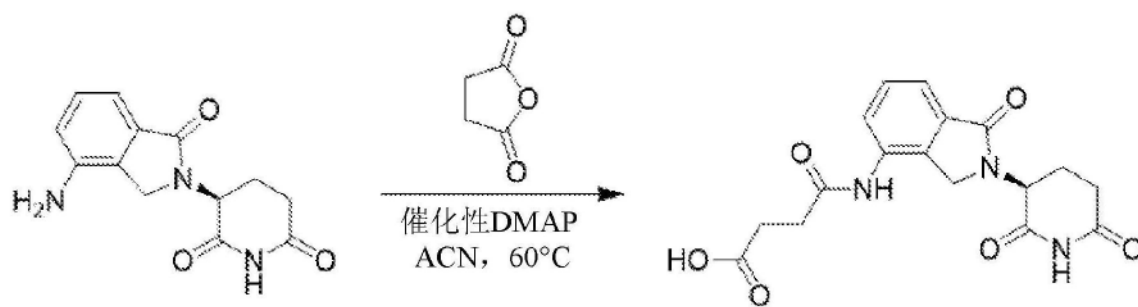


图13

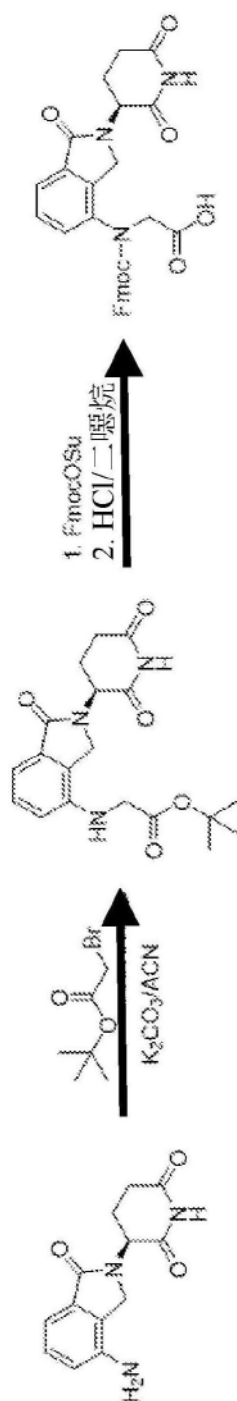


图14

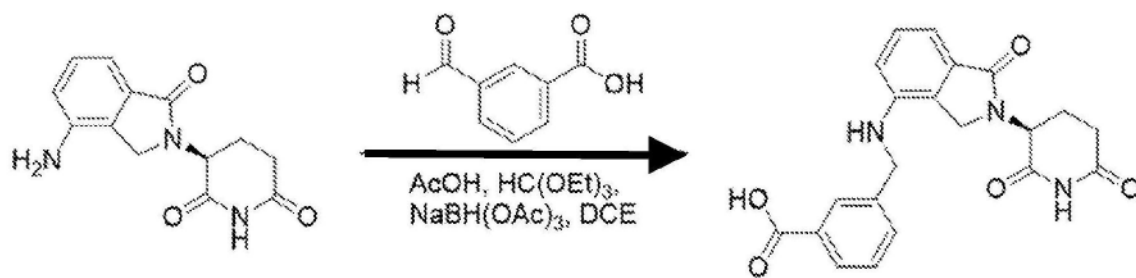


图15

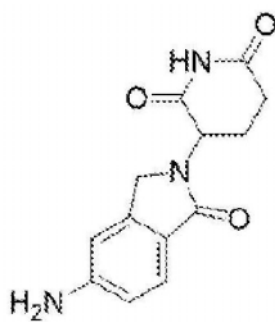


图16A

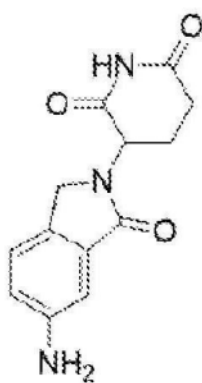


图16B

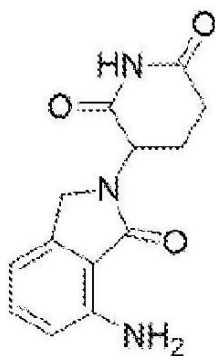


图16C

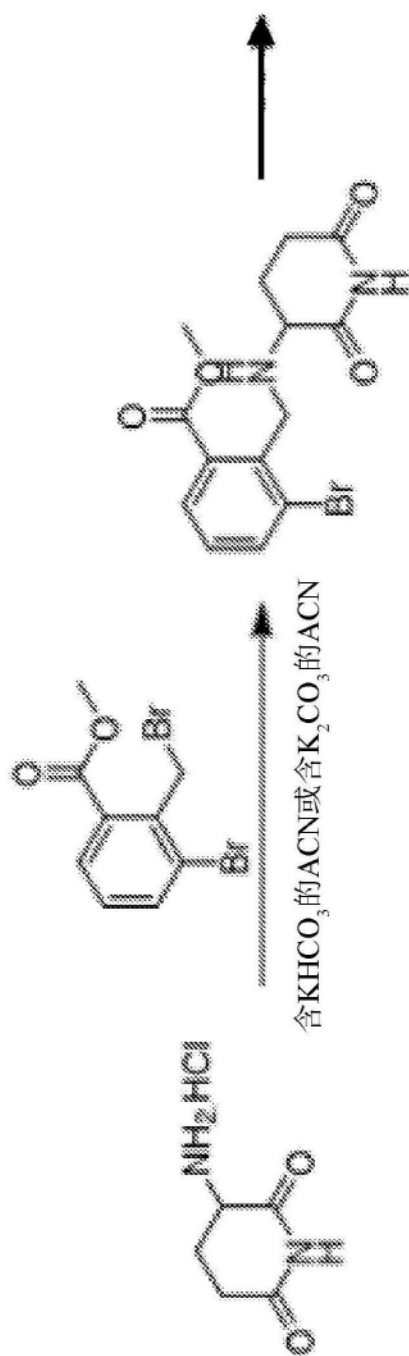


图17

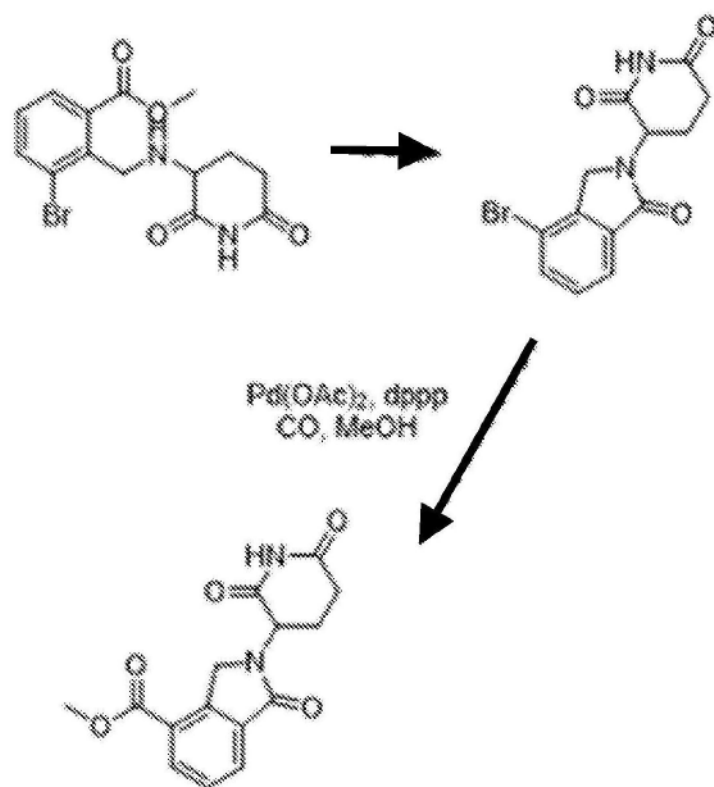


图17 (续)

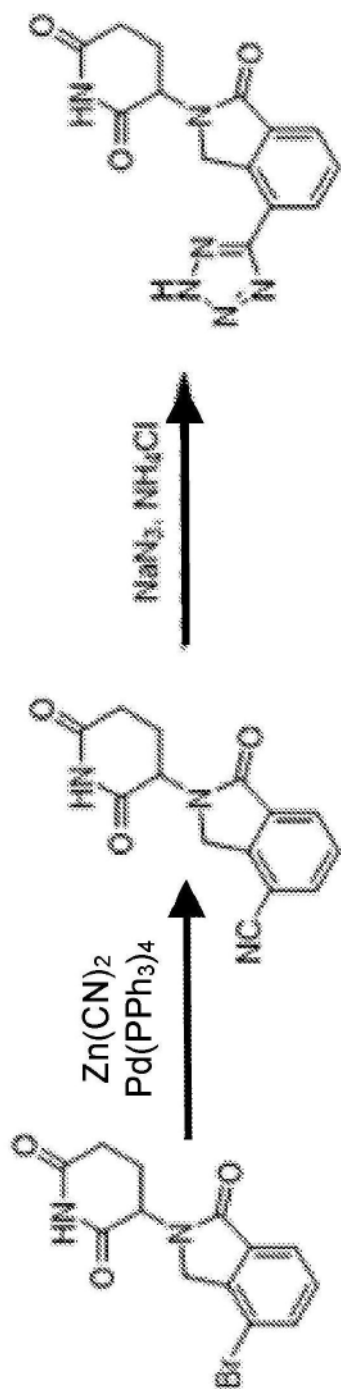


图17 (续)

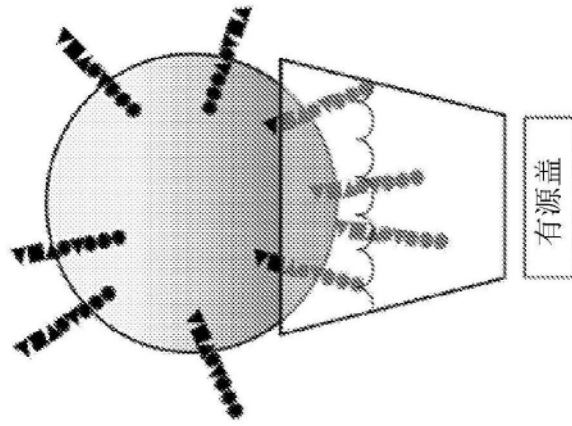


图18A

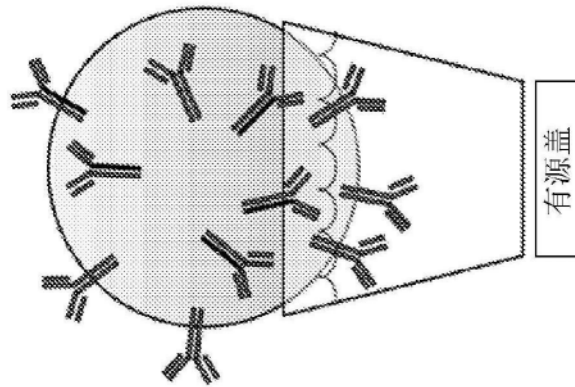


图18B

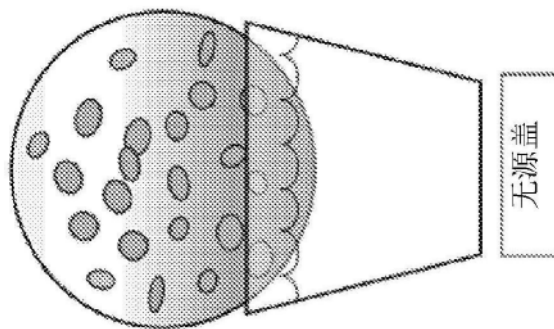


图18C

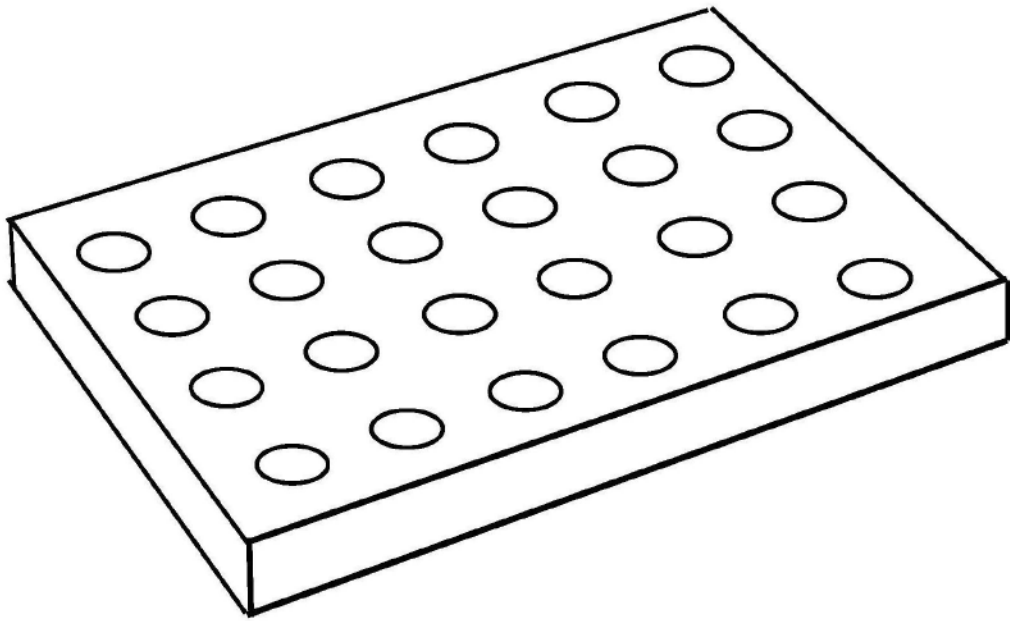


图19A

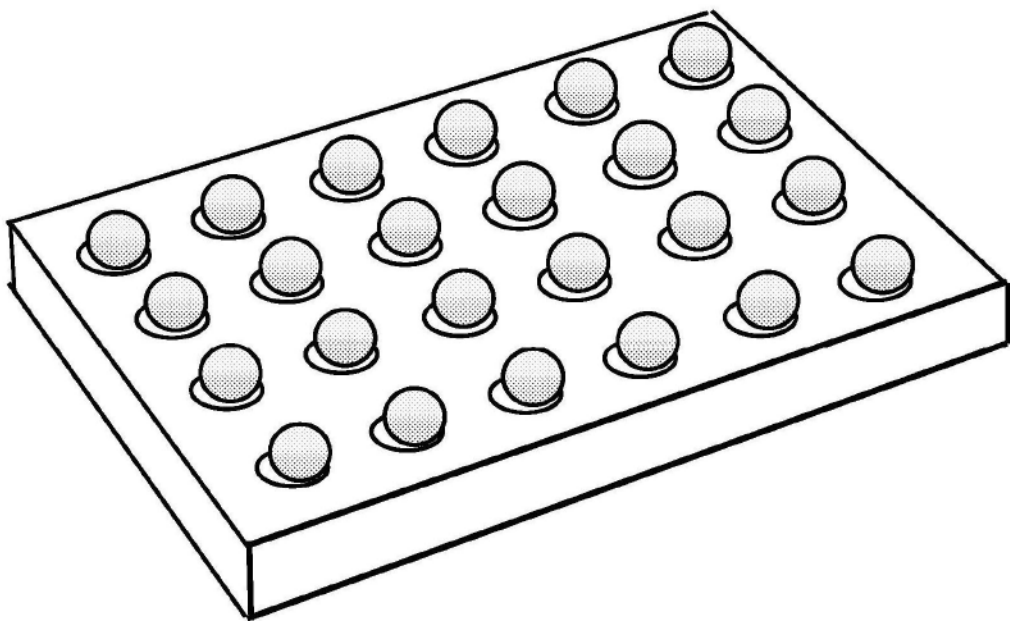


图19B

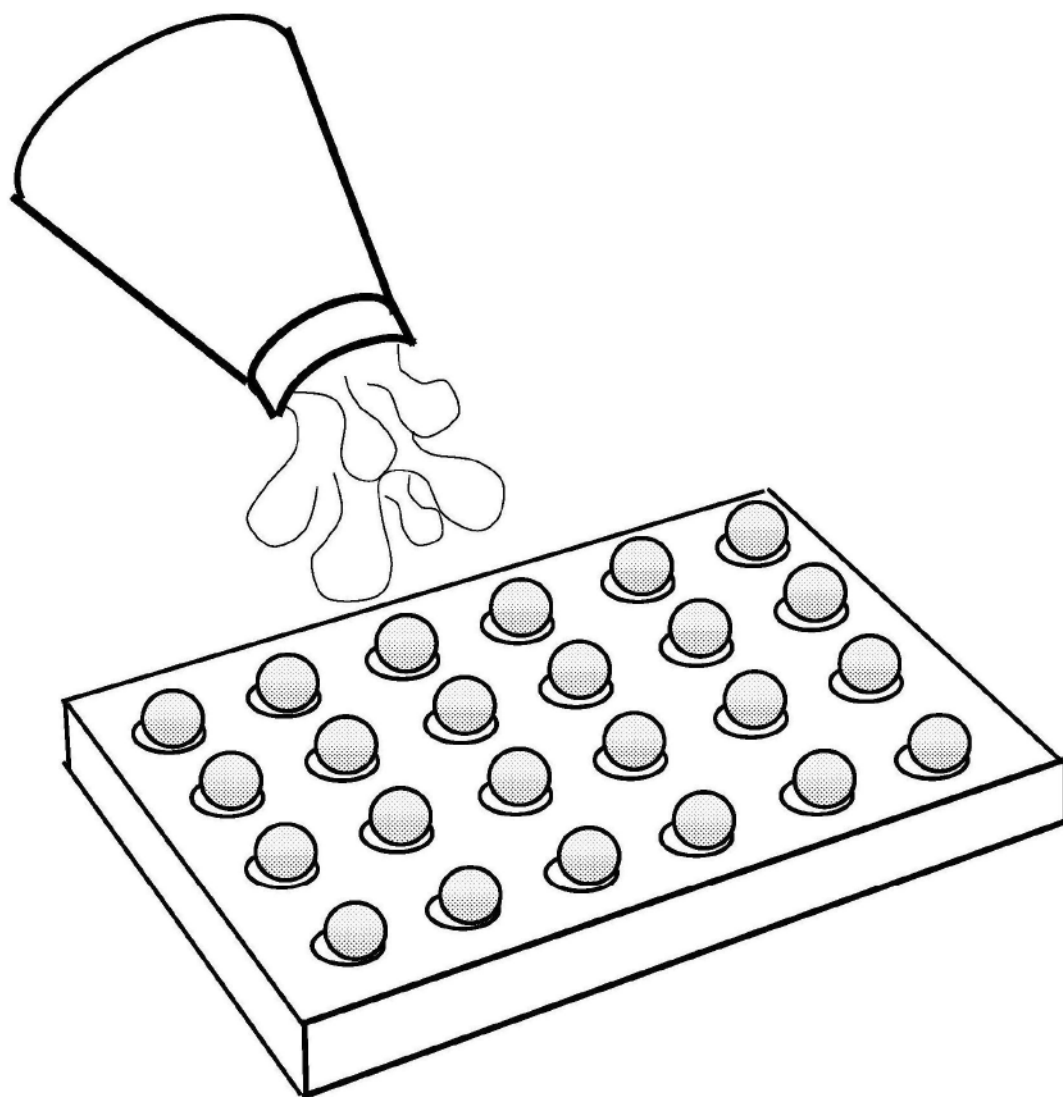


图19C

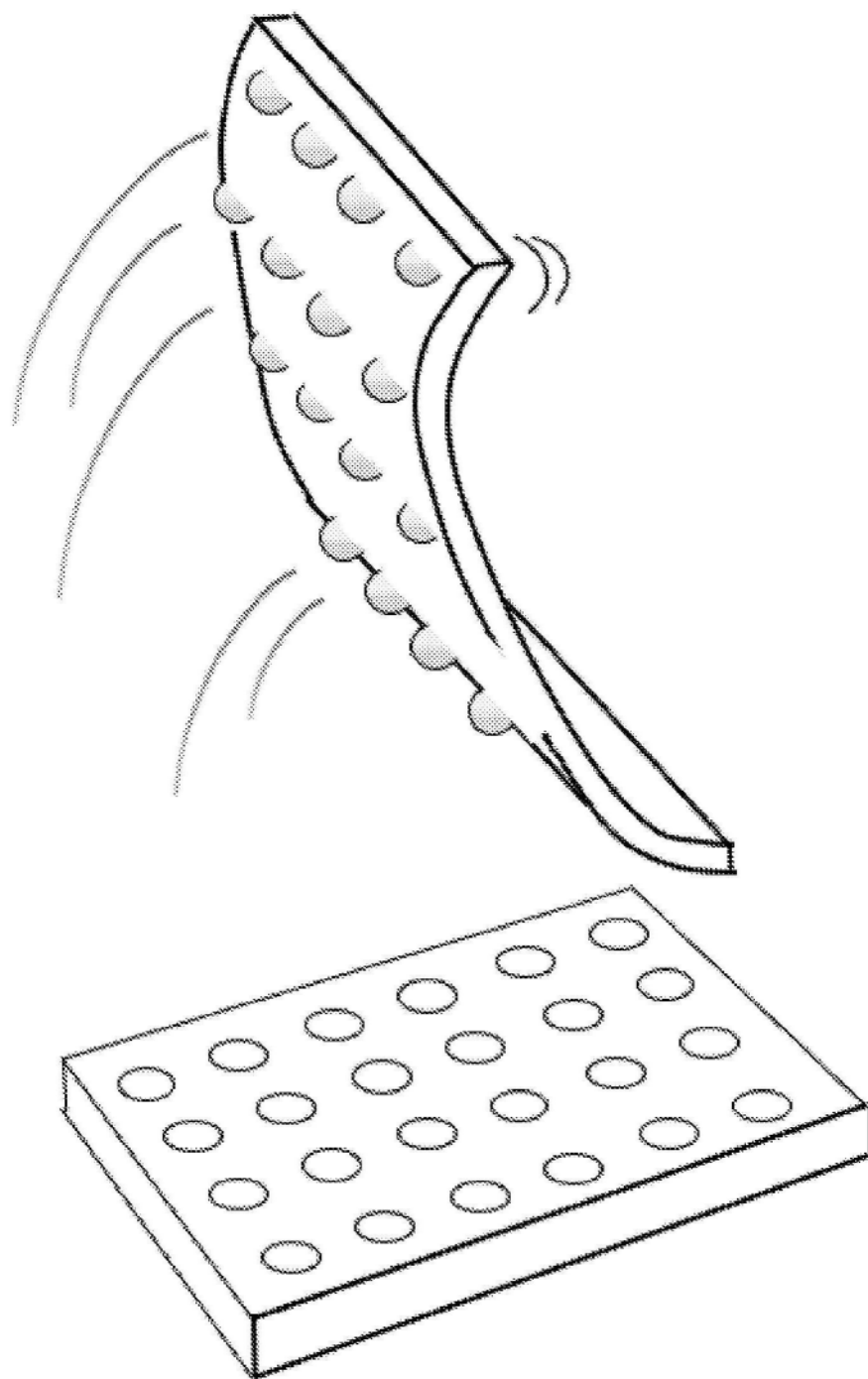


图19D

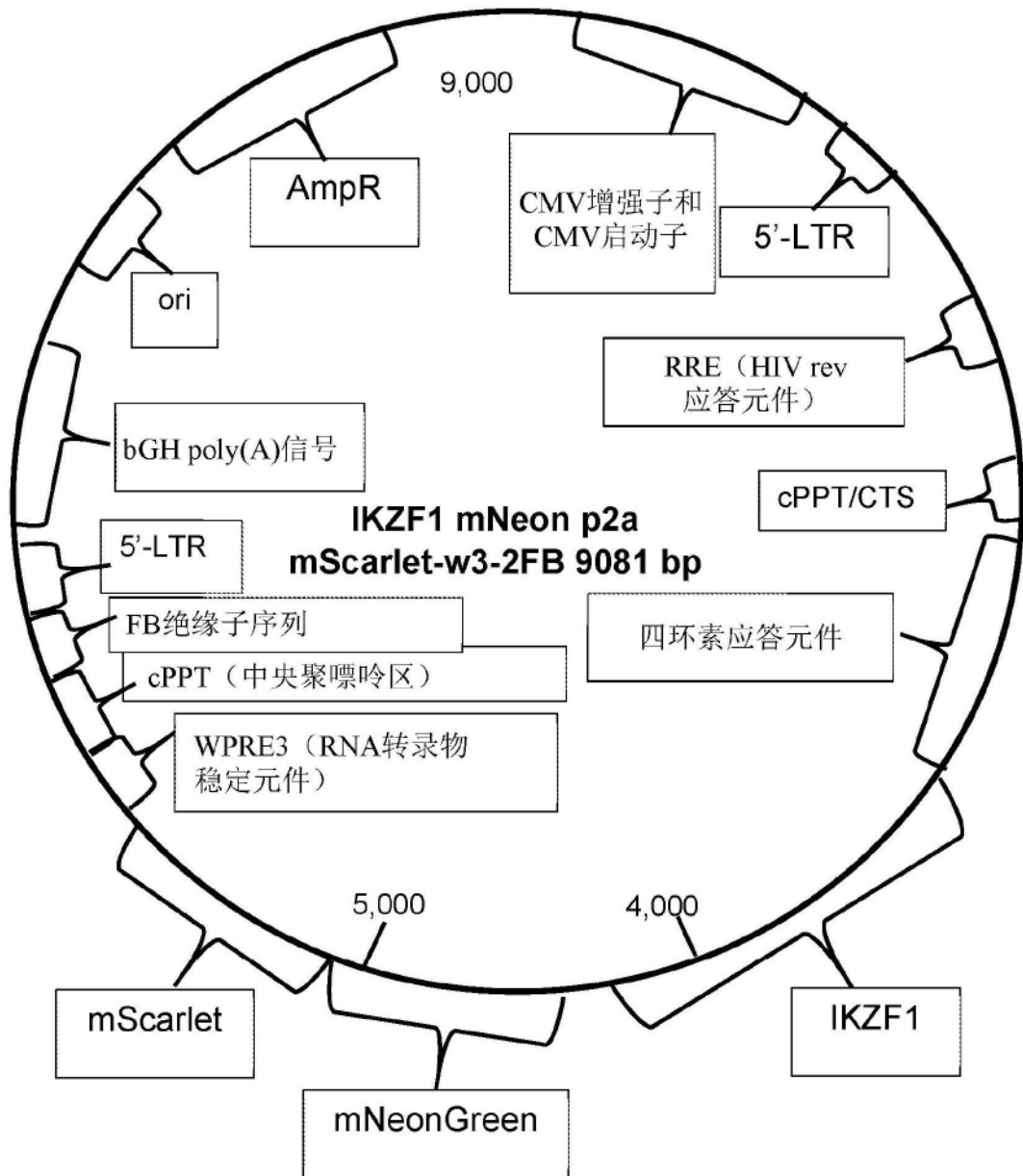


图20

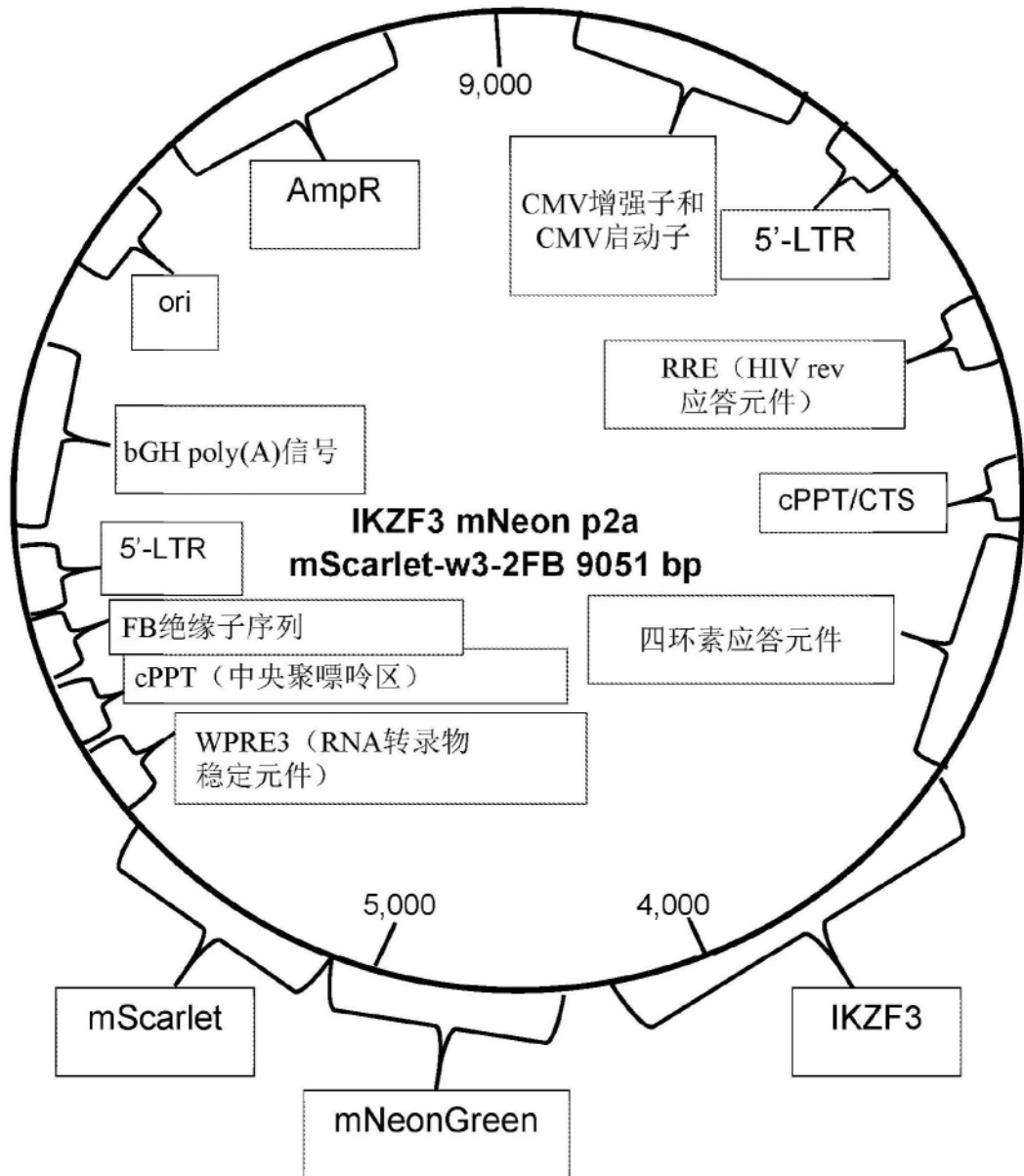


图21

<p>The chemical structure of Fmoc-D-Ile is shown. It consists of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group attached to the nitrogen of an amino acid. The amino acid is D-isoleucine, with a carboxylic acid group (COOH) and a side chain (CH(CH3)CH2CH3). The stereochemistry is D, indicated by the wedge bond to the hydrogen on the chiral center adjacent to the carboxyl group and the dashed bond to the hydrogen on the chiral center adjacent to the Fmoc group.</p> <p>$C_{21}H_{23}NO_4$</p>	Fmoc-D-Ile 条形码: ACGT
<p>The chemical structure of Fmoc-L-Ile is shown. It consists of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group attached to the nitrogen of an amino acid. The amino acid is L-isoleucine, with a carboxylic acid group (COOH) and a side chain (CH(CH3)CH2CH3). The stereochemistry is L, indicated by the wedge bond to the hydrogen on the chiral center adjacent to the carboxyl group and the wedge bond to the hydrogen on the chiral center adjacent to the Fmoc group.</p>	Fmoc-L-Ile 条形码: ACTC
<p>The chemical structure of Fmoc-L-Ala is shown. It consists of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group attached to the nitrogen of an amino acid. The amino acid is L-alanine, with a carboxylic acid group (COOH) and a side chain (CH3). The stereochemistry is L, indicated by the dashed bond to the hydrogen on the chiral center adjacent to the carboxyl group.</p> <p>$C_{18}H_{17}NO_4$</p>	Fmoc-L-Ala 条形码: AGAC

图22

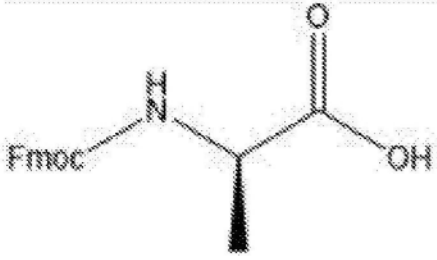
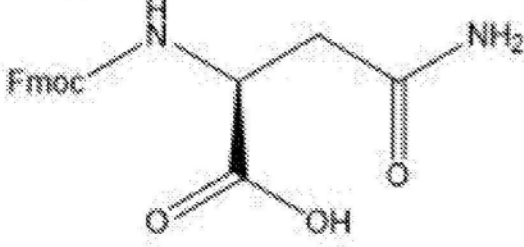
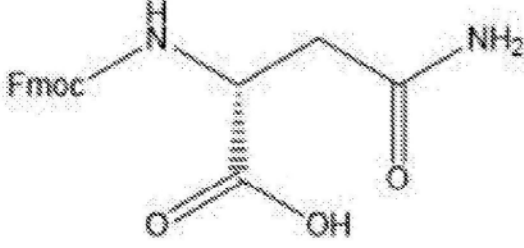
 <p>$C_{15}H_{17}NO_4$</p>	<p>Fmoc-D-Ala</p> <p>条形码: AGCG</p>
 <p>$C_{19}H_{19}N_2O_5$</p>	<p>Fmoc-L-Asn</p> <p>条形码: AGTA</p>
 <p>$C_{19}H_{19}N_2O_5$</p>	<p>Fmoc-D-Asn</p> <p>条形码: ATAT</p>

图22 (续)

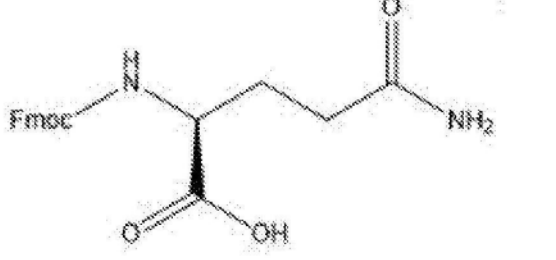
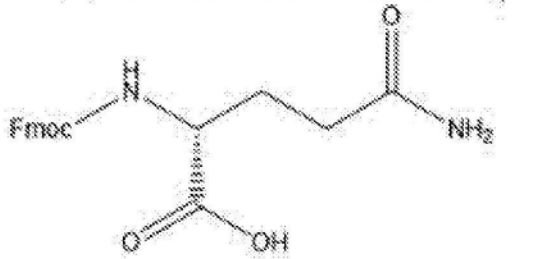
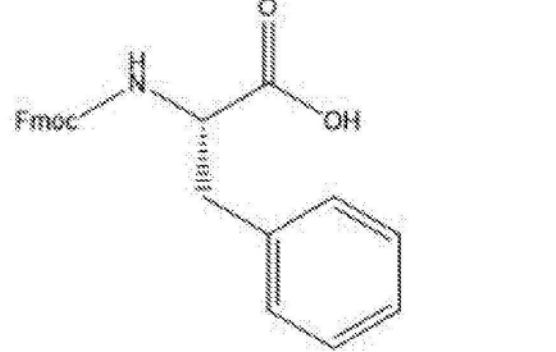
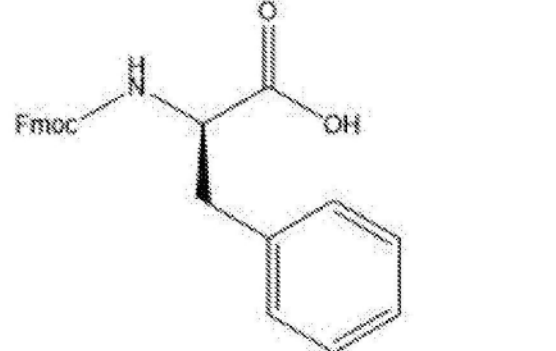
 <p>$C_{20}H_{28}N_2O_5$</p>	<p>Fmoc-L-Gln</p> <p>条形码: ATGA</p>
 <p>$C_{20}H_{28}N_2O_5$</p>	<p>Fmoc-D-Gln</p> <p>条形码: CACG</p>
 <p>$C_{24}H_{27}NO_3$</p>	<p>Fmoc-L-Phe</p> <p>条形码: CAGC</p>
 <p>$C_{24}H_{27}NO_3$</p>	<p>Fmoc-D-Phe</p> <p>条形码: CATA</p>

图23

<p>Chemical structure of Fmoc-L-Thr (N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-threonine). The structure shows a central chiral carbon atom bonded to a hydrogen atom (dashed bond), a carboxylic acid group (COOH), a hydroxyl group (wedged bond), and a side chain consisting of a methylene group and a methyl group. The nitrogen atom is part of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) protecting group.</p> <p>$C_{19}H_{19}NO_5$</p>	Fmoc-L-Thr 条形码: CGAG
<p>Chemical structure of Fmoc-D-Thr (N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-D-threonine). The structure shows a central chiral carbon atom bonded to a hydrogen atom (wedged bond), a carboxylic acid group (COOH), a hydroxyl group (dashed bond), and a side chain consisting of a methylene group and a methyl group. The nitrogen atom is part of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) protecting group.</p> <p>$C_{19}H_{19}NO_5$</p>	Fmoc-D-Thr 条形码: CGCT
<p>Chemical structure of Fmoc-Gly (N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-glycine). The structure shows a central carbon atom bonded to a hydrogen atom, a carboxylic acid group (COOH), and a side chain consisting of a methylene group and a methyl group. The nitrogen atom is part of a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) protecting group.</p> <p>$C_{17}H_{15}NO_4$</p>	Fmoc-Gly 条形码: CGTC

图24

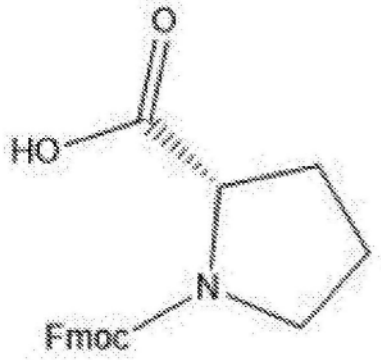
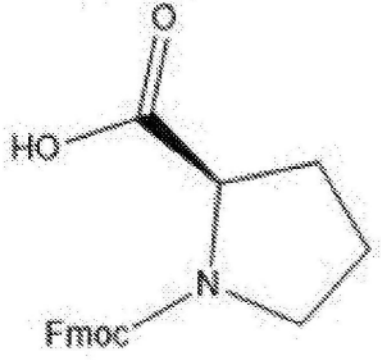
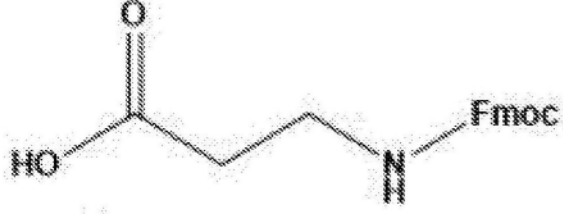
 $C_{20}H_{19}NO_4$	Fmoc-L-Pro 条形码: CTAC
 $C_{20}H_{19}NO_4$	Fmoc-D-Pro 条形码: CTGT
 $C_{18}H_{17}NO_4$	Fmoc-β-Gly 条形码: GACT

图24(续)

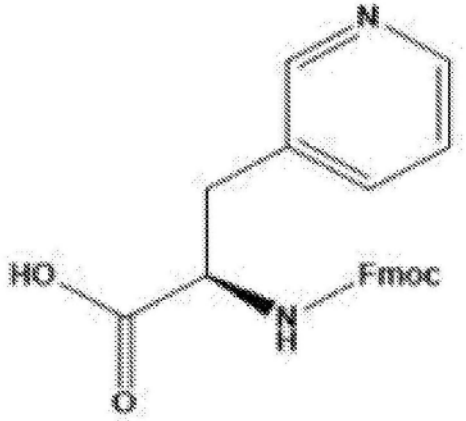
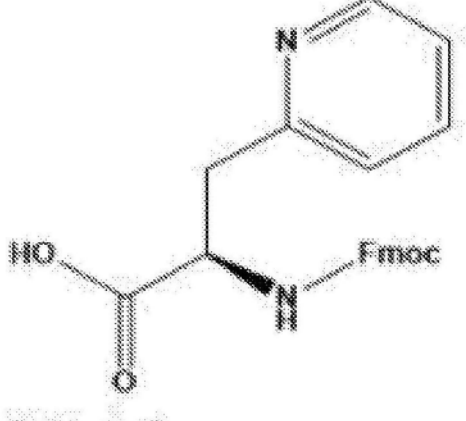
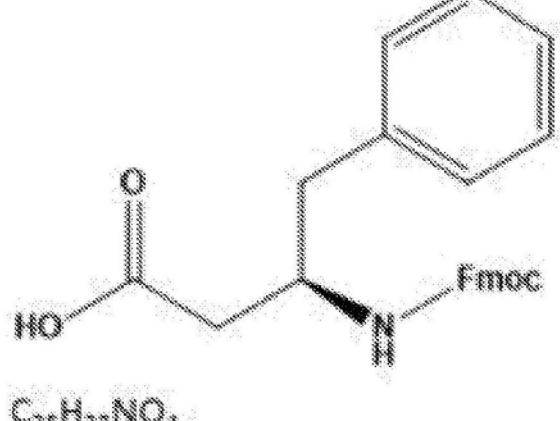
 <p>$C_{23}H_{20}N_2O_4$</p>	<p>Fmoc-L-3-吡啶基丙氨酸</p> <p>条形码: GAGA</p>
 <p>$C_{23}H_{20}N_2O_4$</p>	<p>Fmoc-L-2-吡啶基丙氨酸</p> <p>条形码: GCAC</p>
 <p>$C_{23}H_{23}NO_4$</p>	<p>Fmoc-β-Ala</p> <p>条形码: GCTG</p>

图25

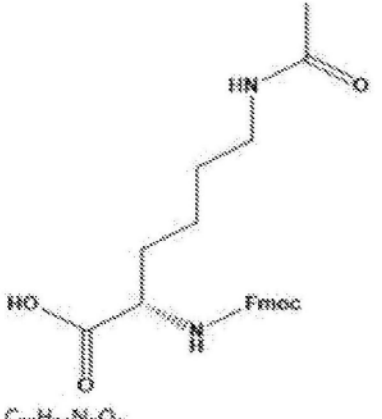
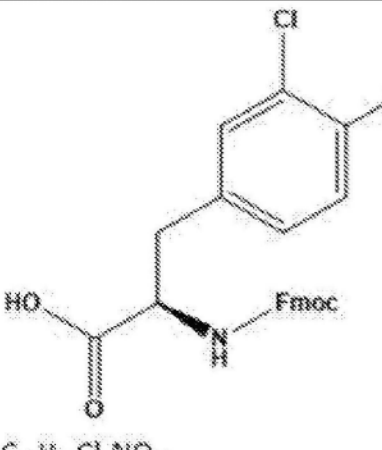
 <p>$C_{23}H_{26}N_2O_5$</p>	<p>Fmoc-Lys(Ac)-OH</p> <p>条形码: GTAG</p>
 <p>$C_{22}H_{19}Cl_2NO_2$</p>	<p>Fmoc-3,4-二氯-L-苯丙氨酸</p> <p>条形码: GTCA</p>

图25 (续)

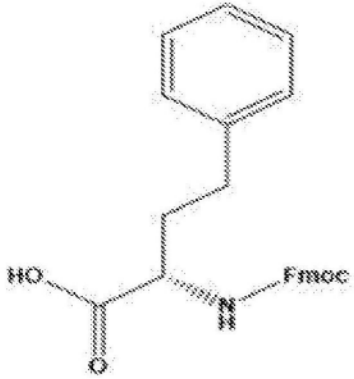
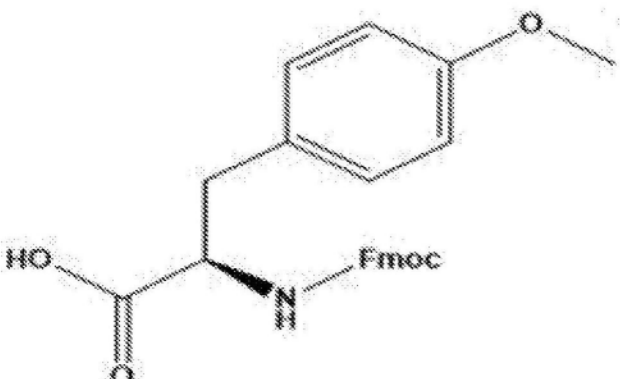
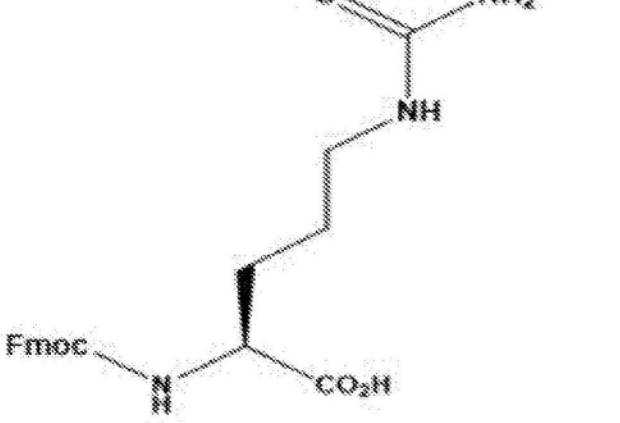
 <p>$C_{25}H_{23}NO_4$</p>	<p>Fmoc-L-高苯丙氨酸</p> <p>条形码: GTGC</p>
 <p>$C_{25}H_{23}NO_5$</p>	<p>Fmoc-O-甲基-L-酪氨酸</p> <p>条形码: TAGT</p>
 <p>$C_{21}H_{23}N_3O_5$</p>	<p>Fmoc-Cit-OH</p> <p>条形码: TATC</p>

图26

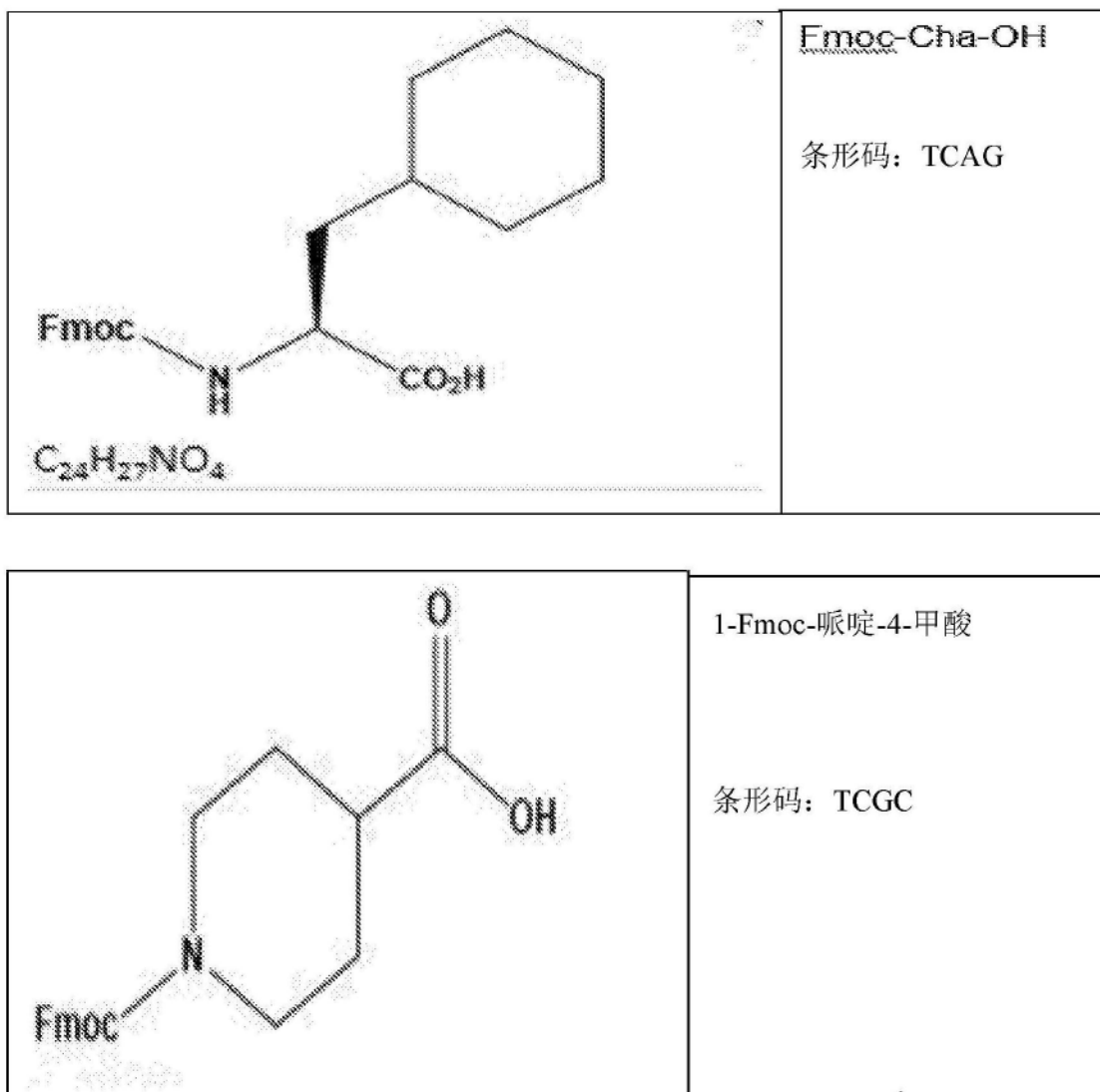


图26 (续)

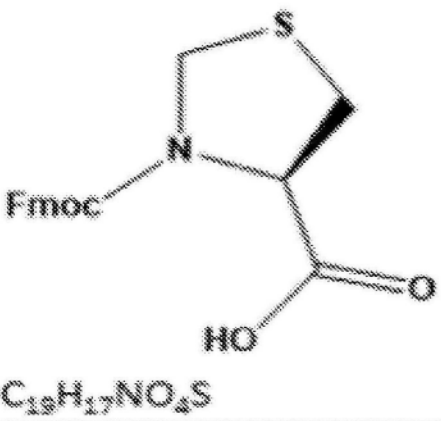
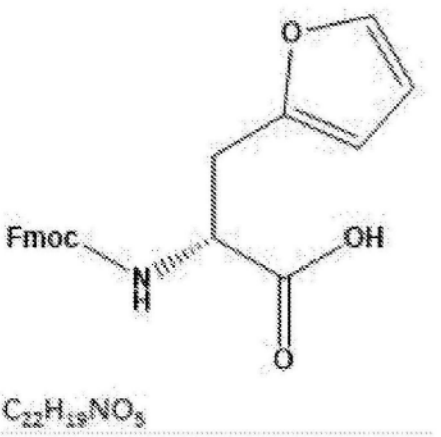
 <p>$C_{19}H_{17}NO_4S$</p>	<p>(R)-3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)噻唑烷-4-甲酸</p> <p>条形码: TCTA</p>
 <p>$C_{22}H_{19}NO_5$</p>	<p>(R)-N-FMOC-(2-呋喃基)丙氨酸</p> <p>条形码: TGAT</p>

图27

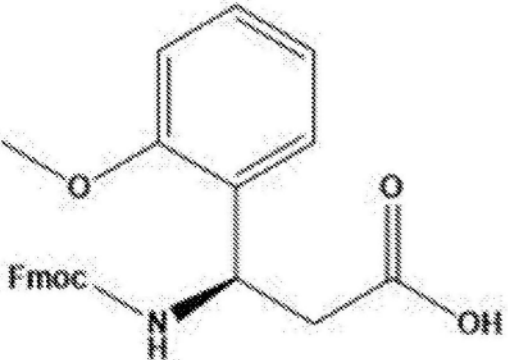
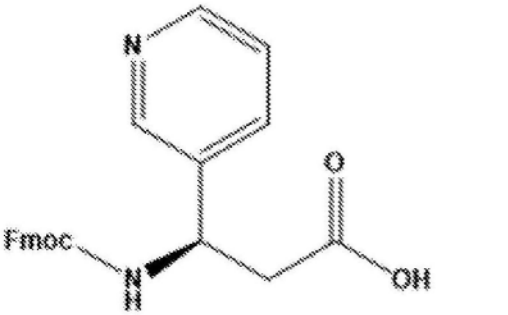
 <p>$C_{25}H_{23}NO_5$</p>	<p>(R)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸</p> <p>条形码: TGCA</p>
 <p>$C_{23}H_{20}N_2O_4$</p>	<p>(R)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸</p> <p>条形码: TGTG</p>

图27 (续)

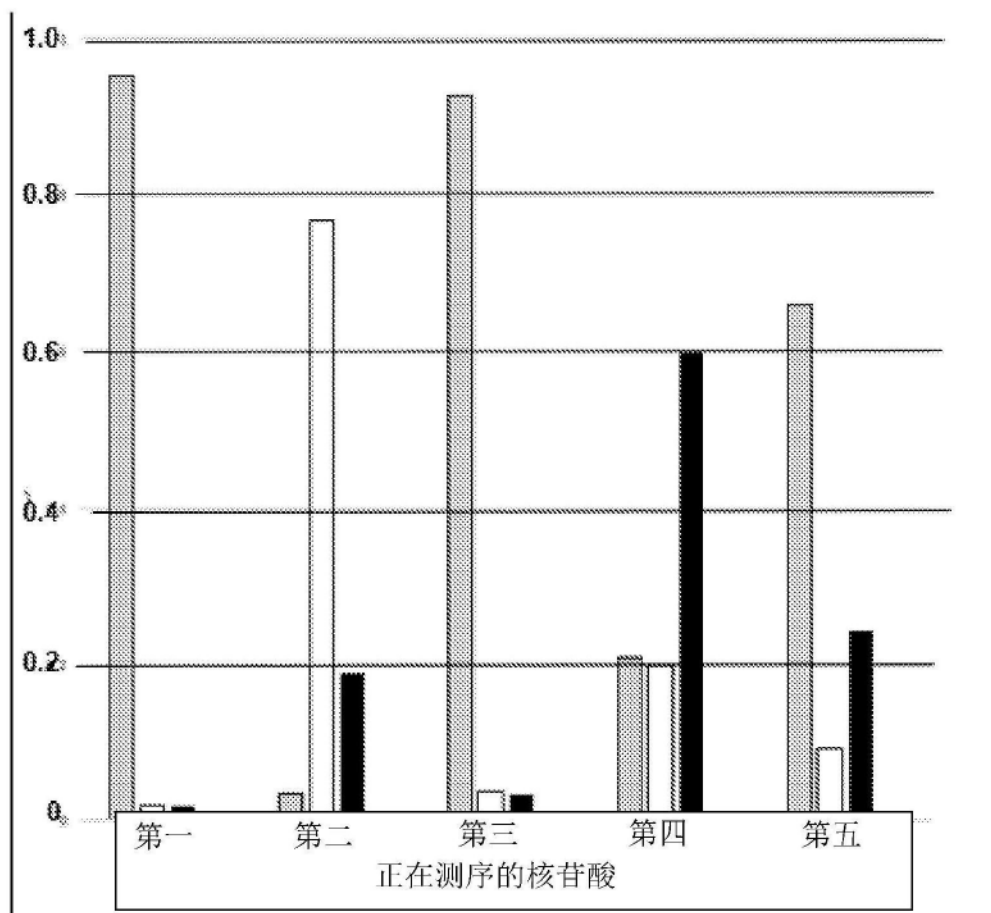


图28

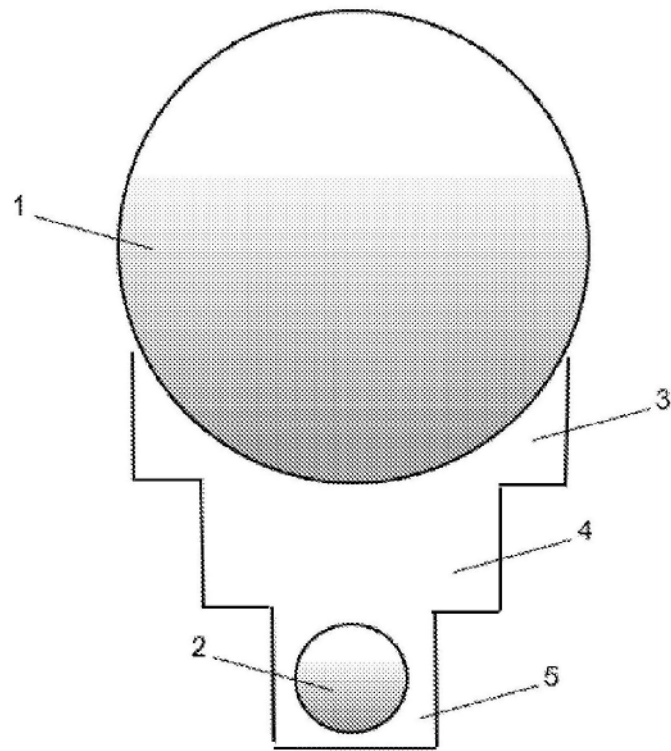


图29

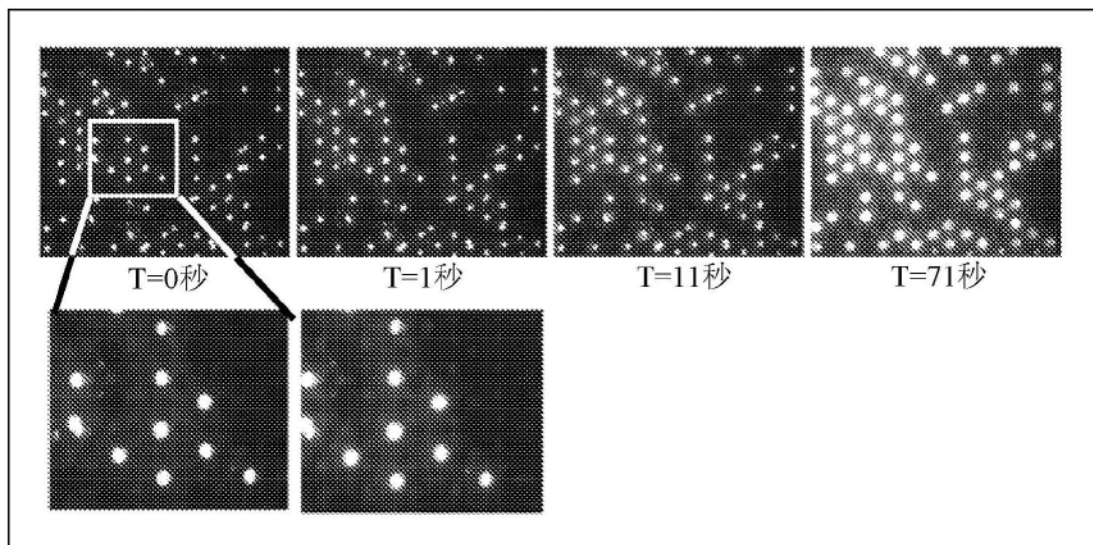


图30

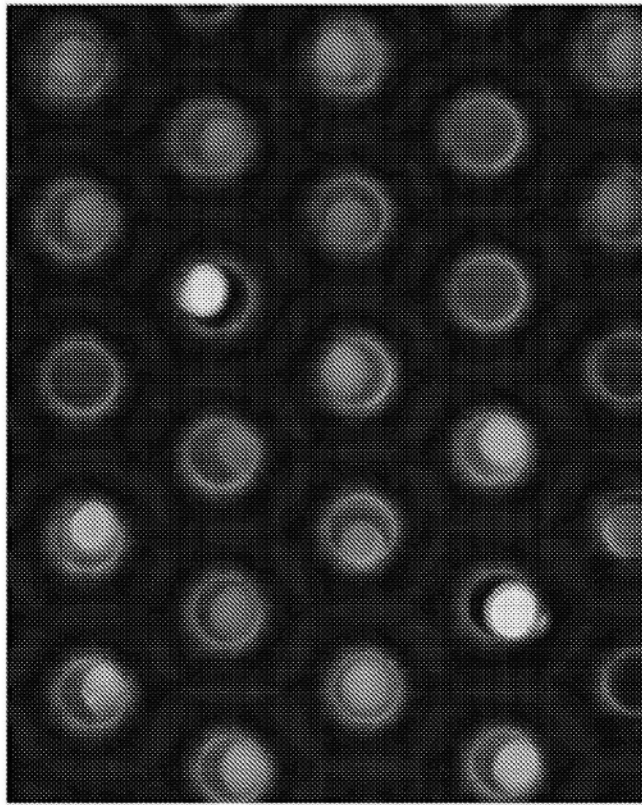


图31A

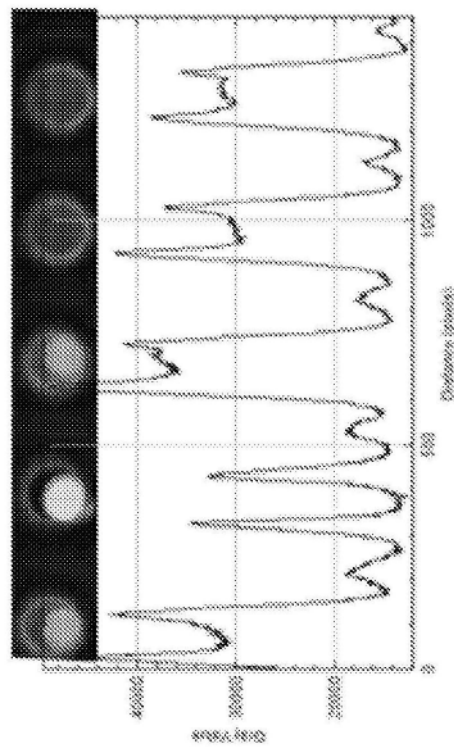


图31B

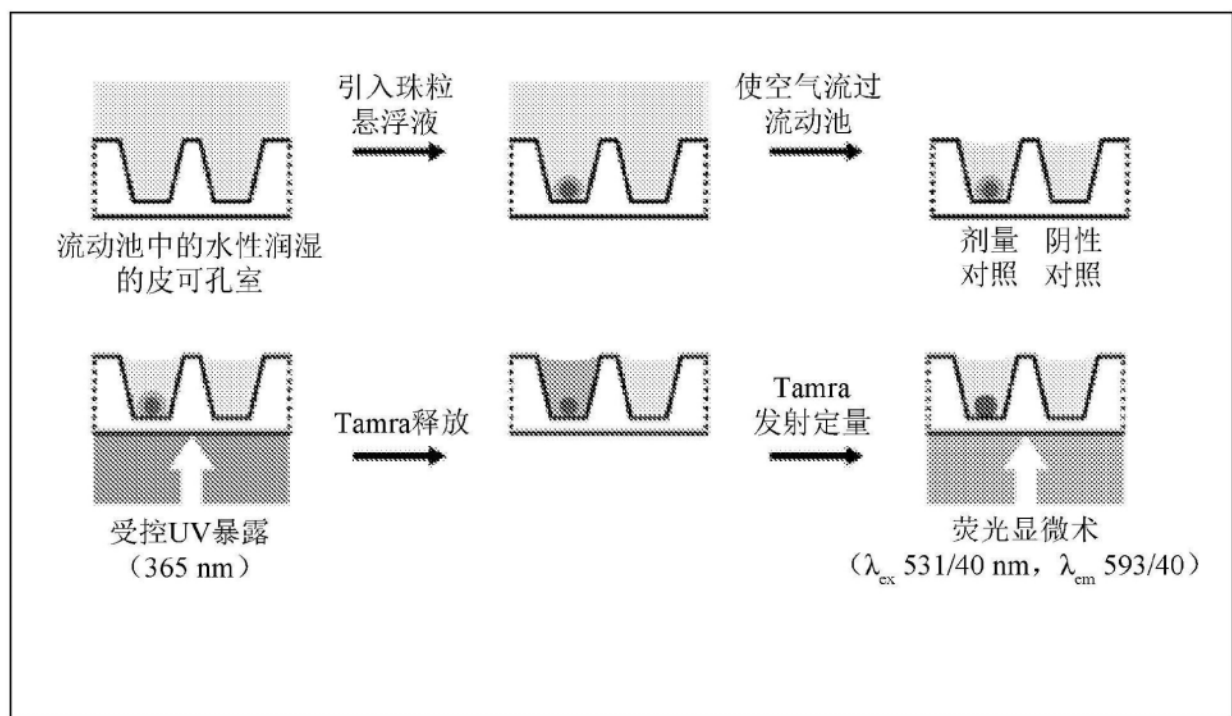


图32

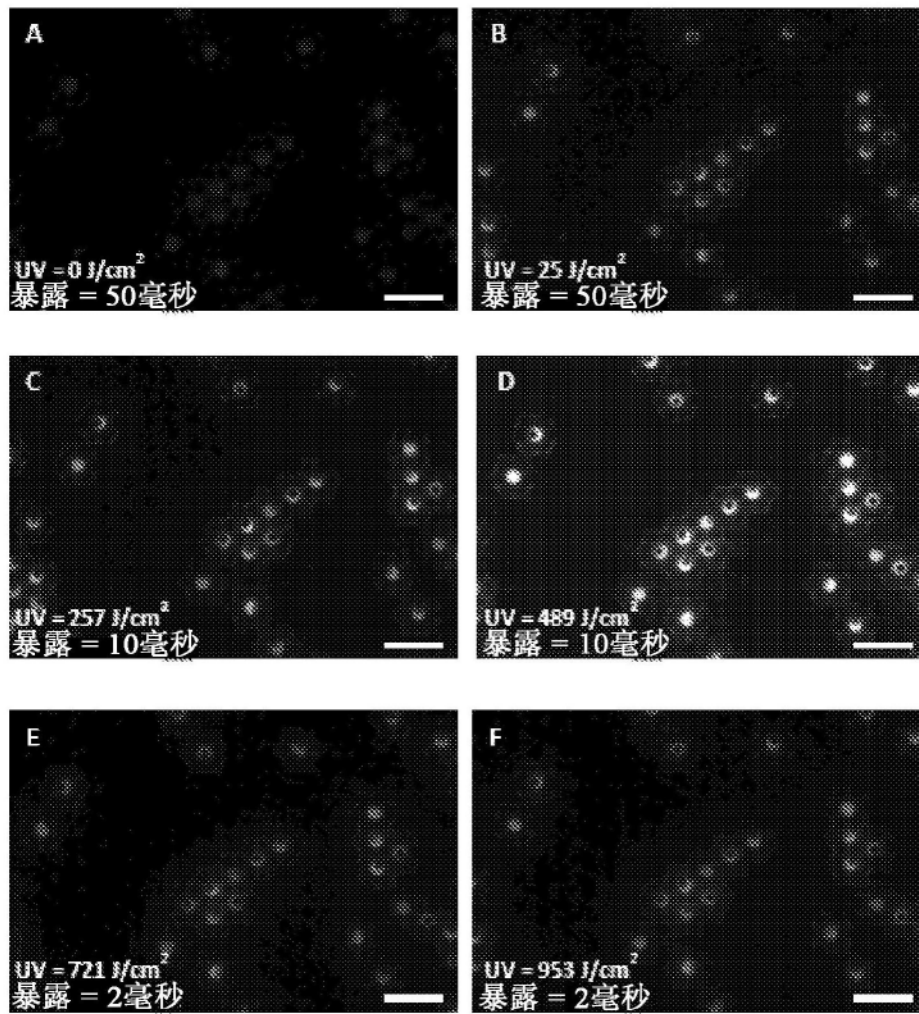


图33

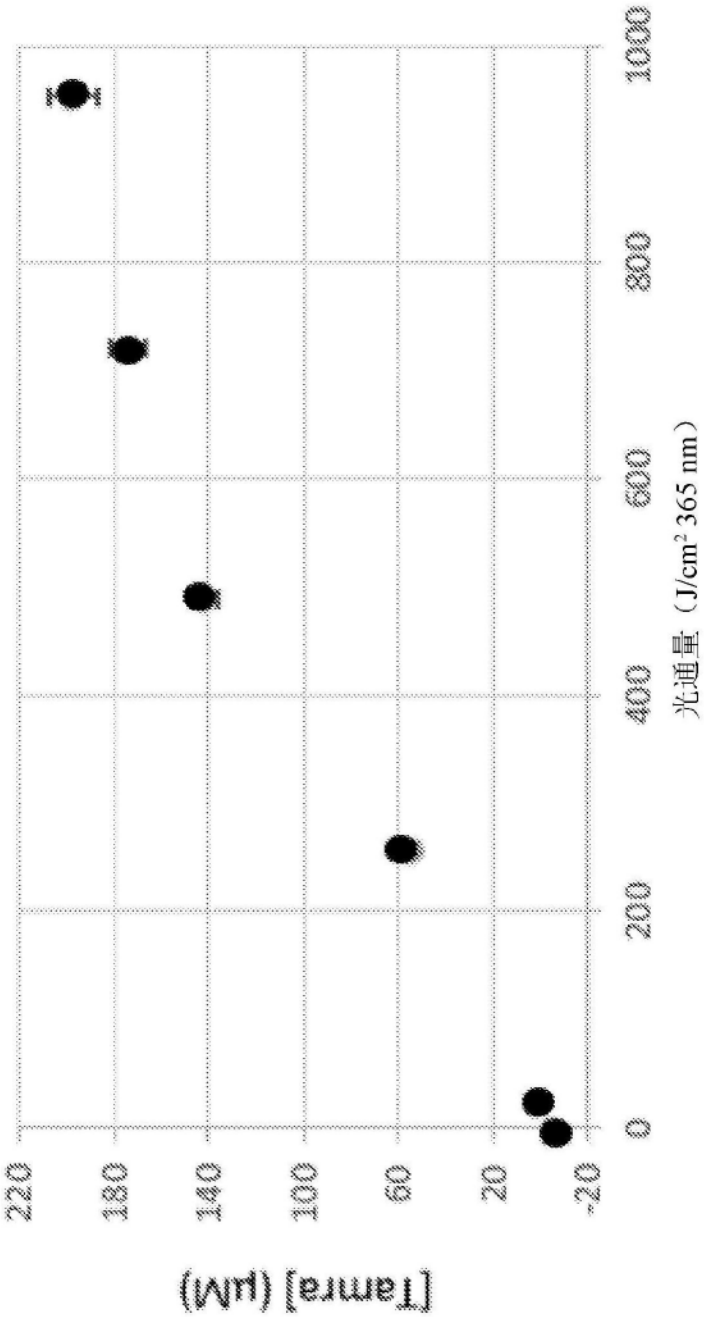


图34

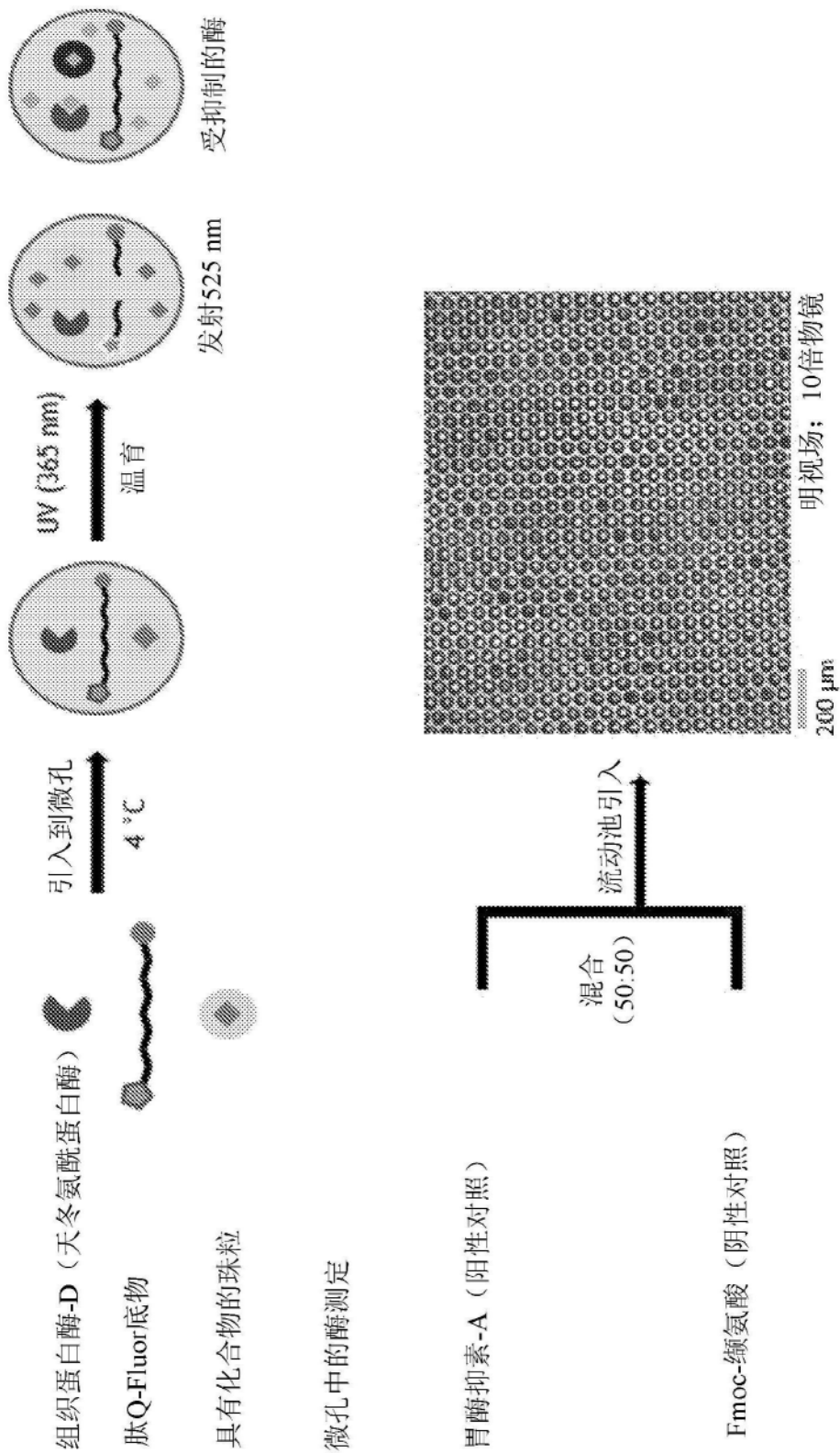


图35

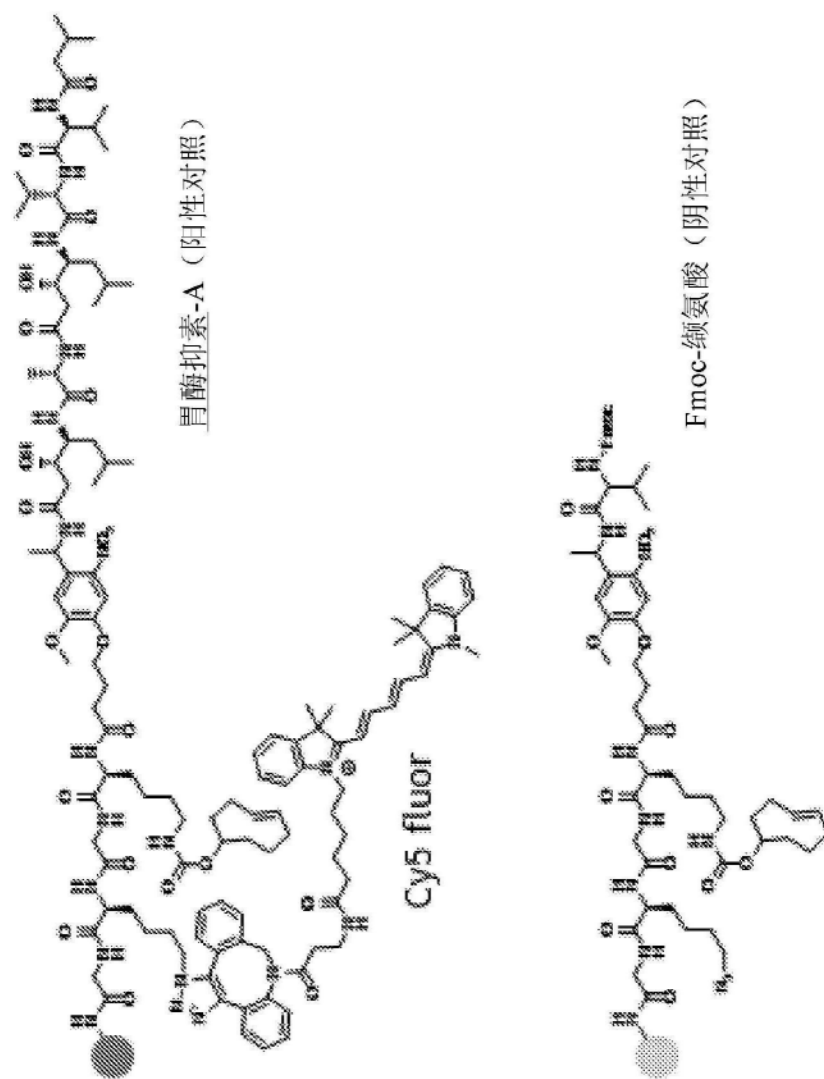


图35 (续)

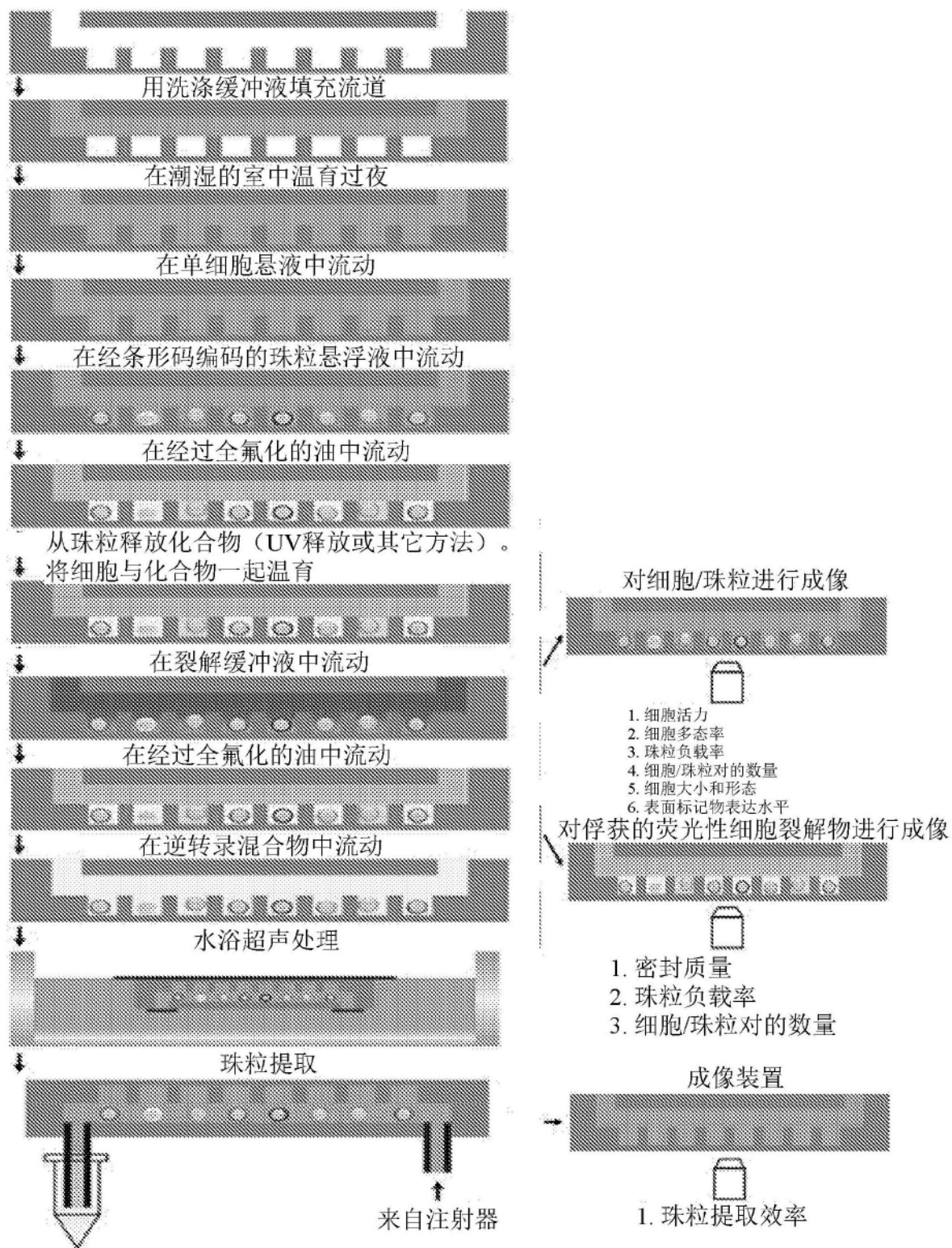


图36

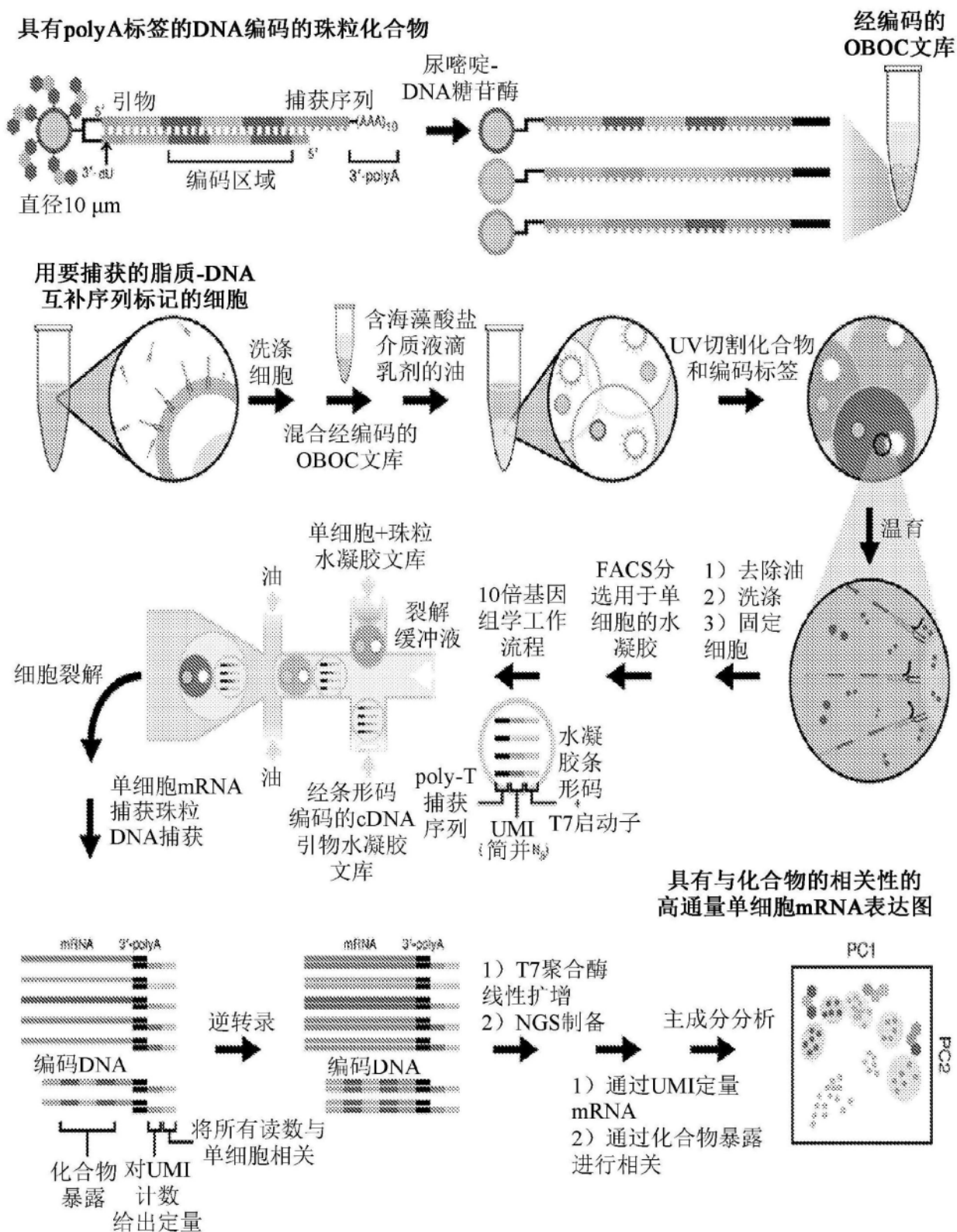


图37