

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 11 月 4 日 (2021.11.4)

【公表番号】特表 2020-534872 (P2020-534872A)

【公表日】令和 2 年 12 月 3 日 (2020.12.3)

【年通号数】公開・登録公報 2020-049

【出願番号】特願 2020-538759 (P2020-538759)

【国際特許分類】

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 (2010.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

【F I】

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/6837 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 15/09 2 0 0

C 1 2 N 15/115 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 9 月 24 日 (2021.9.24)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を摂動させ、前記摂動に対する前記細胞の応答を捕捉する方法であって、

(a) ピコウェルのアレイおよび機能化された摂動ビーズのライブラリを提供することであって、前記ピコウェルのそれぞれが、少なくとも 1 個の細胞および単一の機能化された摂動ビーズを収容可能であり、各機能化された摂動ビーズが、異なる複数の実質的に同一の放出可能な化合物および前記化合物をコードする複数のヌクレオチドバーコードを含み、前記ヌクレオチドバーコードが、前記細胞の細胞内容物を捕捉可能な機能化されたバーコードであり、各細胞の前記細胞内容物が、前記機能化された各摂動ビーズに含まれるそれぞれの摂動に対する細胞応答を含む、提供することと、

(b) 前記ピコウェルアレイの各ピコウェルに少なくとも 1 個の細胞を捕捉することと、

(c) 単一の機能化された摂動ビーズを、それぞれのヌクレオチドバーコードを持つ少なくとも 1 個の細胞を含む前記ピコウェルに捕捉することと、

(d) 前記機能化された摂動ビーズから前記化合物の一部を放出し、前記放出された化合物と共に前記細胞をインキュベートし、それによって各細胞にそれぞれの摂動を引き起

こすことであって、前記ピコウェル間の化合物が、最小限の拡散を有する、インキュベートすることと、

(e) 前記細胞を溶解して前記細胞内容物を放出することと、

(f) 前記機能化された摂動ビーズ上の機能化されたそれぞれのオリゴヌクレオチドバーコード上に、それぞれの溶解された細胞の内容物の 1 つ以上の成分を捕捉することであって、前記捕捉することが、それぞれのヌクレオチドバーコードを前記細胞内容物の核酸要素と組み合わせるハイブリダイゼーションおよび酵素的伸長を含み、それにより、前記それぞれのヌクレオチドバーコードおよび前記細胞内容物の前記核酸要素のハイブリッドを形成する、捕捉することと、
を含む、方法。

【請求項 2】

(g) 前記ハイブリッドを放出し、機能化された摂動ビーズの前記ライブラリから前記ハイブリッドを収集し、前記ハイブリッドをシーケンシングし、それにより、前記摂動を、前記摂動に対する前記細胞応答に関連付けることをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ハイブリッドのシーケンシングが、細胞内容物の核酸要素のシーケンシングと、それぞれのヌクレオチドバーコードのシーケンシングを同時に行う、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記シーケンシングが、それぞれのヌクレオチドバーコードを、前記機能化された摂動ビーズに結合された状態でシーケンシングを行うことを含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞内容物の核酸要素が、mRNAを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞応答を、それぞれのヌクレオチドバーコード上にコピーすることをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

複数の実質的に同一の放出可能な化合物をコンビナトリアルケミストリー的に合成することをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ステップ c) の後であって、前記ステップ d) の前に、ピコウェルを油媒体で覆うことをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記機能化された摂動ビーズから化合物の一部を放出する前に、捕捉した細胞及び捕捉した摂動ビーズを、ヒドロゲル中に埋め込むことをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

細胞を溶解する前に、前記機能化された摂動ビーズから前記ヌクレオチドバーコードを放出することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 及び請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

細胞を、放出された化合物と共にインキュベートすることと同時又はその後に、前記ヌクレオチドバーコードを前記細胞の細胞表面に結合させ、それによって、摂動されバーコード化された細胞を創製することをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

細胞を溶解する前に、摂動及びバーコード化された細胞を、前記ピコウェルから放出することをさらに含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

細胞応答は、イメージングまたはゲノム解析により測定される、請求項 1 ~ 12 のい

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

細胞応答は、形態学的応答として、光学的に測定される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記複数のヌクレオチドバーコードは、DNA バーコードである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記摂動ビーズは、それぞれ 1000 万個 ~ 1 億個の実質的に同一の DNA バーコードを含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

(a) 溶解された細胞と、(b) 機能化された摂動ビーズであって、複数の実質的に同一の放出可能な化合物と、該化合物をコードする複数のヌクレオチドバーコードと、RNA 捕捉剤を含む摂動ビーズと、(c) 前記溶解された細胞からの RNA とを含む、アッセイ媒体。

【請求項 18】

前記複数のヌクレオチドバーコードは、それぞれ前記放出可能な化合物の同一性又は合成履歴をコードする、請求項 17 記載のアッセイ媒体。

【請求項 19】

前記 RNA 捕捉剤は、前記ヌクレオチドバーコードの 1 つに結合されている、請求項 17 又は 18 記載のアッセイ媒体。

【請求項 20】

前記複数の実質的に同一の放出可能な化合物は、コンビナトリアルケミストリー的に合成される、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のアッセイ媒体。