

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-518157  
(P2018-518157A)

(43) 公表日 平成30年7月12日(2018.7.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2018.01)</b>	C12Q 1/68 Z	2G043
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	2G045
<b>C4OB 40/06 (2006.01)</b>	C4OB 40/06	4B033
<b>C4OB 40/10 (2006.01)</b>	C4OB 40/10	4B063
<b>C4OB 40/02 (2006.01)</b>	C4OB 40/02	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-555663 (P2017-555663)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月9日 (2016.5.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月20日 (2017.12.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/031524  
 (87) 国際公開番号 WO2016/183029  
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016.11.17)  
 (31) 優先権主張番号 62/159,710  
 (32) 優先日 平成27年5月11日 (2015.5.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514202402  
 イラミーナ インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 122 サンディエゴ イラミーナ ウェ  
 イ 5200  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 230118913  
 弁護士 杉村 光嗣  
 (74) 代理人 100196298  
 弁理士 井上 高雄  
 (72) 発明者 モリー ヘ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 122 サンディエゴ イラミーナ ウェ  
 イ 5200

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬剤の発見および分析のためのプラットフォーム

(57) 【要約】

候補薬剤の特性評価方法であって、(a) 核酸タグに結合している候補薬剤のライブラリーを提供する工程と；(b) ライブラリーを固体支持体と接触させて候補薬剤を固体支持体に結合させ、それにより候補薬剤アレイを形成する工程と；(c) アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、アレイ中の1つ以上の候補薬剤がスクリーニング剤と反応する工程と；(d) アレイを検出し、アレイ中の少なくとも1つの候補薬剤がスクリーニング剤と反応することを判定する工程と；(e) 核酸タグを配列決定し、アレイ中の候補薬剤に結合したタグ配列を決定する工程と；(f) 少なくとも1つの候補薬剤に結合したタグ配列に基づいて、スクリーニング剤と反応するアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤を同定する工程を含む方法。

Step 1: Synthesize 500,000 29-mer oligos + attachment group (-SH, amine; NHS).  
 1. Synthesizer = 50,000 oligos/day 500,000 oligos in 10 days  
 2. Bar-code = 19-mer; "Primer" = 10-mer

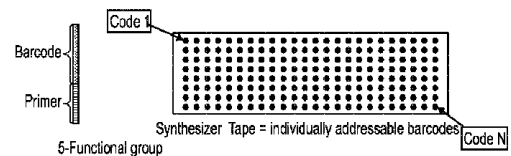


Fig. 1A

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下を含む、候補薬剤の特性評価方法：

- (a) 候補薬剤のライブラリーを提供する工程であって、各候補薬剤が、タグ配列を有する核酸タグに結合している工程と；
- (b) 候補薬剤の前記ライブラリーを固体支持体と接触させて前記候補薬剤を前記固体支持体に結合させ、それにより、前記ライブラリーからの個々の候補薬剤にそれぞれ結合する前記固体支持体上に個々のフィーチャーを含む候補薬剤アレイを形成する工程と；
- (c) 前記候補薬剤アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、前記アレイ中の1つ以上の候補薬剤が前記スクリーニング剤と反応する工程と；
- (d) 前記アレイの前記スクリーニング剤との接触の間または接触の後に前記アレイを検出し、それにより前記アレイ中の少なくとも1つの候補薬剤が前記スクリーニング剤と反応することを判定する工程と；
- (e) 前記アレイ上の前記核酸タグを配列決定し、前記候補薬剤の各々に結合した前記タグ配列を決定する工程と；
- (f) 少なくとも1つの前記候補薬剤に結合した前記タグ配列に基づいて、前記スクリーニング剤と反応する前記アレイ中の少なくとも1つの前記候補薬剤を同定する工程。

10

**【請求項 2】**

前記候補薬剤が、タンパク質、核酸、細胞、および小分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

**【請求項 3】**

前記タンパク質が、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ヒストン修飾酵素および核内ホルモン受容体からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記細胞が、多細胞生物体から単離された遺伝的に天然の細胞、単細胞生物体を含む遺伝的に天然の細胞、遺伝子操作された細胞、および培養細胞からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記細胞が幹細胞または免疫細胞である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

前記小分子が、候補酵素阻害剤、候補抗生物質、候補抗ウイルス剤、候補農薬、候補ホルモン、細胞シグナル伝達の候補活性剤、細胞シグナル伝達の候補阻害剤、および候補酵素活性剤からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 7】**

工程 (a) が、候補薬剤のライブラリーをコンビナトリアル合成することを含み、ここで、各候補薬剤で実施されるコンビナトリアル合成の個々の反応は、1つ上のヌクレオチドの特有のシグネチャーの、前記候補薬剤の各々に結合した核酸タグへの付加によって追跡され、それにより候補薬剤のライブラリーを提供し、ここで各候補薬剤は特有の核酸タグに結合している、請求項 1 に記載の方法。

40

**【請求項 8】**

前記固体支持体が核酸プライマーを含み、前記候補薬剤が、前記核酸タグの前記核酸プライマーへのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記核酸タグがユニバーサルプライマー結合配列を含み、前記核酸プライマーがユニバーサルプライマー配列を含み、前記候補薬剤が、前記ユニバーサルプライマー結合配列の前記ユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

50

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記候補薬剤に結合することによって、または前記候補薬剤と前記候補薬剤に対する親和性を持つ検体間の結合を遮断することによって、1つ以上の前記候補薬剤と反応する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記アレイの検出が、1つ以上の前記候補薬剤に結合している前記スクリーニング剤を検出することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記スクリーニング剤が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記候補薬剤を化学修飾することによって、1つ以上の前記候補薬剤と反応する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記アレイの検出が、1つ以上の修飾された前記候補薬剤を検出することを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

1つ以上の前記修飾された候補薬剤が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記スクリーニング剤が、検体生成物を生成することによって1つ以上の前記候補薬剤と反応する、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記アレイの検出が、前記検体生成物を検出することを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記検体生成物が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記アレイの検出が、複数の時点で前記アレイ上の個々の前記フィーチャーのうちの1つ以上についてシグナルを取得することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記シグナルが光シグナルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記核酸タグを増幅し、個々の前記フィーチャーの前記核酸タグのアンプリコンを生成することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記核酸タグの配列決定が、個々の前記フィーチャーの前記核酸タグの前記アンプリコンを配列決定することを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記核酸タグの配列決定が、前記配列を示す光シグナルを検出することを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記固体支持体がフローセル内に配置される、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

以下を含む、タンパク質アレイの作製方法：

(a) mRNA分子のライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含んでいる工程、

(b) 前記ライブラリーから第1サブライブラリーを得る工程であって、第1サブライブラリーは前記タグ配列またはその相補体を有する核酸を含み、前記核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合している工程、

10

20

30

40

50

(c) 前記ライブラリーから第2サブライブラリーを得る工程であって、第2サブライブラリーは前記標的配列および前記タグ配列またはその相補体を有する核酸を含んでいる工程、

(d) 第2サブライブラリーを第1サブライブラリーと接触させ、それにより第2サブライブラリーの核酸を、前記タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合させる工程と；

(e) 前記固体支持体上の前記標的配列を翻訳し、個々の前記フィーチャーに結合したタンパク質のアレイを作製する工程。

【請求項 26】

前記固体支持体上の前記タグ配列またはその相補体を配列決定し、それにより前記固体支持体上の個々の前記フィーチャーでの前記タグ配列またはその相補体の位置を決定する工程をさらに含む、請求項 25 に記載の方法。

10

【請求項 27】

第1サブライブラリーの前記核酸が前記標的配列をさらに含む、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記固体支持体上の前記標的配列を配列決定する工程をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

以下を含む、タンパク質のスクリーニング方法：

20

(i) 請求項 25 に記載のタンパク質アレイを作製する工程と；

(ii) 前記タンパク質アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、前記アレイ中の1つ以上のタンパク質が前記スクリーニング剤と反応する工程と；

(iii) 前記スクリーニング剤との接触の間または接触の後に前記タンパク質アレイを検出し、それにより前記アレイ中の少なくとも1つのタンパク質が前記スクリーニング剤と反応することを判定する工程。

【請求項 30】

前記固体支持体上の前記タグ配列またはその相補体を配列決定し、それにより前記固体支持体上の個々の前記フィーチャーでの前記タグ配列またはその相補体の位置を決定する工程をさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

30

【請求項 31】

少なくとも1つの前記タンパク質に結合した前記タグ配列に基づいて、前記スクリーニング剤と反応する前記アレイ中の少なくとも1つの前記タンパク質を同定する工程をさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記タンパク質に結合することによって、または1つ以上の前記タンパク質と1つ以上の前記タンパク質に対する親和性を持つ検体間の結合を遮断することによって、1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

40

前記アレイの検出が、1つ以上の前記タンパク質に結合している前記スクリーニング剤を検出することを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記スクリーニング剤が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記タンパク質を化学修飾することによって、1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

前記アレイの検出が、1つ以上の修飾された前記タンパク質を検出することを含む、請

50

求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

1つ以上の修飾された前記タンパク質が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記スクリーニング剤が、検体生成物を生成することによって1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記アレイの検出が、前記検体生成物を検出することを含む、請求項 3 8 に記載の方法。

10

【請求項 4 0】

前記検体生成物が発光性であり、前記検出が前記アレイ上の発光を検出することを含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記アレイの検出が、複数の時点で前記アレイ上の個々の前記フィーチャーのうちの1つ以上についてシグナルを取得することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記シグナルが光シグナルを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

mRNA分子の前記ライブラリーが、複数の同一遺伝子の変異体を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

20

【請求項 4 4】

前記変異体がランダム突然変異誘発によって生成される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

mRNA分子の前記ライブラリーが組み換え生物体由来する、請求項 2 5 または 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記タンパク質が、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ヒストン修飾酵素、および核内ホルモン受容体からなる群より選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

30

【請求項 4 7】

第1サブライブラリーが、前記ライブラリーのmRNA分子を前記固体支持体と接触させ、前記mRNA分子を前記固体支持体に結合させることを含む方法によって得られる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記mRNA分子が前記固体支持体上で増幅され、前記タグ配列の相補体を生成する、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記固体支持体が核酸プライマーを含み、前記mRNA分子が、前記核酸プライマーへのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

前記mRNA分子がユニバーサルプライマー結合配列を含み、前記核酸プライマーがユニバーサルプライマー配列を含み、前記mRNA分子が、前記ユニバーサルプライマー結合配列の前記ユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

第1サブライブラリーが、個々のmRNA分子または前記タグ配列を含む個々のmRNA分子の一部を逆転写することを含む方法によって得られる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 5 2】

逆転写されたmRNA分子、またはその一部が前記固体支持体上で増幅され、前記タグ配列

50

の相補体を生成する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

mRNA分子の前記ライブラリーが流体試料中に提供され、第1サブライブラリーおよび第2サブライブラリーが、前記流体試料の別個の画分に由来する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記固体支持体がフローセル内に配置される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記タンパク質が、前記mRNA分子に共有結合している、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記アレイの1つ以上のフィーチャーに結合した前記mRNA分子またはタンパク質を選択的に除去する工程をさらに含む、請求項 2 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

前記選択的除去が、前記mRNA分子またはタンパク質を前記フィーチャーに結合させている結合のレーザー媒介性切断を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

請求項 2 5 に記載の方法であって、第1サブライブラリーが、前記タグ配列の相補体を有する核酸を含み、第2サブライブラリーが、前記標的配列および前記タグ配列を有するRNA分子を含み、ならびに

(d) が、第2サブライブラリーを第1サブライブラリーと接触させ、それにより第2サブライブラリーのmRNA分子を、前記タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合させることを含む方法。

20

【請求項 5 9】

請求項 2 5 に記載の方法であって、第1サブライブラリーが、前記タグ配列を有する核酸を含み、第2サブライブラリーが、前記標的配列および前記タグ配列の相補体を有するcDNA分子を含み、

(d) が、第2サブライブラリーを第1サブライブラリーと接触させ、それにより第2サブライブラリーのcDNA分子を、前記タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合させることを含む、

30

(e) が、cDNA分子を逆転写してmRNA分子を前記固体支持体上に生成し、mRNA分子を前記固体支持体上で翻訳して個々の前記フィーチャーに結合したタンパク質のアレイを生成することを含む方法。

【請求項 6 0】

前記標的配列を、リボソームで、前記固体支持体上で翻訳し、前記リボソームをピューロマイシンで処理して個々の前記フィーチャーに結合したタンパク質のアレイを生成する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記固体支持体が、少なくとも $1 \times 10^6$ 個の前記フィーチャーを含む、請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

前記固体支持体上の前記フィーチャーの平均ピッチが10ミクロン未満である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記フィーチャーが100平方ミクロン未満の平均面積を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 6 4】

(a) mRNA分子のライブラリーであって、前記ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含むライブラリーと、

(b) 前記タグ配列の相補体を有する核酸を含む固体支持体、

50

を含むアレイであって、

前記核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、

個々の前記mRNA分子の前記タグ配列が、前記固体支持体上の個々の前記フィーチャーのそれぞれの相補的タグ配列にハイブリダイズし、

前記mRNA分子の翻訳によって得られるタンパク質が、それぞれのmRNA分子に結合する、アレイ。

【請求項 6 5】

前記タンパク質が、リボソームを介してそれぞれの前記mRNA分子に結合している、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 6 6】

前記タンパク質が、前記リボソームに共有結合している、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記タンパク質が発光標識されている、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 6 8】

発光標識されたスクリーニング剤が、タンパク質の結合部位に特異的に結合し、それにより前記タンパク質が蛍光標識される、請求項 6 7 に記載のアレイ。

【請求項 6 9】

前記固体支持体が、少なくとも $1 \times 10^6$ 個の前記フィーチャーを含む、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 7 0】

前記固体支持体上の前記フィーチャーの平均ピッチが10ミクロン未満である、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 7 1】

前記フィーチャーが100平方ミクロン未満の平均面積を含む、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 7 2】

mRNA分子の前記ライブラリーが、複数の同一遺伝子の変異体を含む、請求項 6 4 に記載のアレイ。

【請求項 7 3】

前記タンパク質が、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ヒストン修飾酵素および核内ホルモン受容体からなる群より選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記固体支持体がフローセル内に配置される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 5】

以下を含む細胞のスクリーニング方法：

(a) 複数の異種細胞を提供する工程であって、前記異種細胞の各々がタグ配列を有する核酸タグを含んでいる工程と；

(b) 前記異種細胞の混合物を固体支持体と接触させ、前記固体支持体に結合した細胞のアレイを形成する工程と；

(c) 前記固体支持体上の細胞のアレイを、少なくとも1つの光学特性についてスクリーニングする工程であって、前記スクリーニング反応が、前記固体支持体に結合した個々の前記細胞を検出することを含む工程と；

(d) 前記固体支持体に結合した核酸タグの前記タグ配列を配列決定する工程と；

(e) 前記アレイ中の少なくとも1つの細胞を候補細胞として、前記候補細胞の光学特性および前記タグ配列に基づいて同定する工程。

【請求項 7 6】

前記細胞が、多細胞生物体から単離された天然細胞、単細胞生物体を含む天然細胞、遺伝子操作された細胞、および培養細胞からなる群より選択される、請求項 7 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 7 7】  
前記細胞が幹細胞または免疫細胞である、請求項 7 6 に記載の方法。
- 【請求項 7 8】  
工程 (a) が、異種細胞を別個の容器に分離し、タグ配列を有する核酸を容器の各々に添加し、それにより複数の異種細胞を提供することを含み、ここで異種細胞の各々は別個の容器内にあり、特有のタグ配列を有する核酸タグを含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 7 9】  
タグ配列を有する前記核酸がビーズに結合し、前記ビーズが複数の異種細胞の細胞に結合している、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 0】 10  
前記ビーズが特異的結合親和性を有する抗体または前記細胞を含む、請求項 7 9 に記載の方法。
- 【請求項 8 1】  
タグ配列を有する前記核酸が、原形質膜脂質または脂肪酸への共有結合によって複数の異種細胞の細胞に結合している、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 2】  
タグ配列を有する前記核酸が、原形質膜脂質中のタンパク質への共有結合によって複数の異種細胞の細胞に結合している、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 3】  
前記固体支持体が核酸プライマーを含み、前記細胞が、前記核酸タグの前記核酸プライマーへのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 7 5 に記載の方法。 20
- 【請求項 8 4】  
前記核酸タグがユニバーサルプライマー結合配列を含み、前記核酸プライマーがユニバーサルプライマー配列を含み、前記候補薬剤が、ユニバーサルプライマー結合配列のユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項 8 3 に記載の方法。
- 【請求項 8 5】  
前記アレイの検出が、複数の時点で前記アレイ上の個々の前記フィーチャーのうちの 1 つ以上についてシグナルを取得することを含む、請求項 7 5 に記載の方法。 30
- 【請求項 8 6】  
前記シグナルが光シグナルを含む、請求項 8 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 7】  
前記核酸タグを増幅し、前記固体支持体上の前記核酸タグのアンプリコンを生成することをさらに含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】  
前記核酸タグの配列決定が、前記核酸タグの前記アンプリコンを配列決定することを含む、請求項 8 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 9】  
前記核酸タグの配列決定が、前記配列を示す光シグナルを検出することを含む、請求項 8 8 に記載の方法。 40
- 【請求項 9 0】  
前記固体支持体がフローセル内に配置される、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 9 1】  
前記細胞が生存細胞である、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 9 2】  
前記固体支持体から少なくとも 1 つの前記候補細胞を除去することをさらに含む、請求項 9 0 に記載の方法。
- 【請求項 9 3】  
少なくとも 1 つの前記候補細胞を前記固体支持体からの除去後に培養し、それにより少 50

なくとも1つの前記細胞を複製することをさらに含む、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

前記異種細胞が遺伝子組み換え細胞を含む、請求項75に記載の方法。

【請求項95】

前記遺伝子組み換え細胞が、非天然組み換えタンパク質のコード化、突然変異組み換えタンパク質のコード化、天然に存在するタンパク質の欠失を有すること、天然に存在するタンパク質の発現を阻害すること、天然に存在するタンパク質の発現を増強すること、非天然検体の生成および天然検体の生成を阻害することからなる群より選択される遺伝子組み換えを含む、請求項94に記載の方法。

【請求項96】

前記細胞アレイのスクリーニングが、前記細胞をスクリーニング剤で処理することを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項97】

前記スクリーニング剤が、少なくとも1つの前記候補細胞に結合する、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

前記スクリーニング剤が発光性であり、前記スクリーニング反応が少なくとも1つの前記候補細胞の発光を検出することを含む、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

前記スクリーニング剤が、少なくとも1つの前記候補細胞を改変する、請求項96に記載の方法。

【請求項100】

前記スクリーニング剤が、少なくとも1つの前記候補細胞を刺激する、請求項96に記載の方法。

【請求項101】

前記スクリーニング剤が少なくとも1つの前記候補細胞の発光を増加または減少させ、前記スクリーニング反応が少なくとも1つの前記候補細胞の発光を検出することを含む、請求項99または100に記載の方法。

【請求項102】

タグ配列を有する核酸タグを増幅し、前記核酸タグの複数のコピーを前記異種細胞の各々に結合させることをさらに含む、請求項75に記載の方法。

【請求項103】

(d)が、前記核酸タグは前記固体支持体に結合しているという条件下で、前記固体支持体から個々の前記細胞を除去することと、次いで前記固体支持体に結合した核酸タグの前記タグ配列を配列決定することを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項104】

(d)が、前記核酸タグをコピーして、前記固体支持体に結合した核酸タグコピーを生成することと、次いで前記固体支持体に結合した核酸タグコピーのタグ配列を配列決定することを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項105】

(d)が、前記核酸タグをコピーして、前記固体支持体に結合した核酸タグコピーを生成することと、次いで、前記核酸タグコピーが前記固体支持体に結合しているという条件下で、前記固体支持体から個々の前記細胞を除去することと、次いで前記固体支持体に結合した核酸タグの前記タグ配列を配列決定することを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項106】

以下を含む、タンパク質アレイの作製方法：

- (a) 固体支持体に結合したcDNA分子のライブラリーを提供する工程と；
- (b) 前記固体支持体上の前記cDNA分子を増幅してクラスターを形成する工程であって、各クラスターが前記ライブラリーからの特定のcDNA分子の複数のコピーを含む工程と；
- (c) 前記クラスターの複数の前記コピーを転写し、前記クラスターの各々に結合した複

10

20

30

40

50

数のmRNA分子を生成する工程と；

(d) 前記クラスターの前記mRNA分子を翻訳し、前記クラスターの各々に結合した複数のタンパク質を生成する工程。

【請求項107】

前記固体支持体上の前記mRNA分子の各々の少なくとも一部を配列決定する工程をさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

以下を含む、タンパク質のスクリーニング方法：

(i) 請求項106に記載のタンパク質アレイを作製する工程と；

(ii) 前記固体支持体上の前記タンパク質をスクリーニング剤と接触させる工程であって、1つ以上の前記タンパク質が前記スクリーニング剤と反応する工程と；

(iii) 前記スクリーニング剤との接触の間または接触の後に前記固体支持体上の前記タンパク質を検出し、それにより前記スクリーニング剤と反応する少なくとも1つのタンパク質が存在することを判定する工程。

【請求項109】

前記固体支持体上の前記mRNA分子の各々の少なくとも一部を配列決定する工程をさらに含む、請求項108に記載の方法。

【請求項110】

少なくとも1つの前記タンパク質に結合している前記mRNA分子の少なくとも一部の前記配列に基づいて、前記スクリーニング剤と反応する前記アレイ中の少なくとも1つの前記タンパク質を同定する工程をさらに含む、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記タンパク質に結合することによって、または1つ以上の前記タンパク質と1つ以上の前記タンパク質に対する親和性を持つ検体との間の結合を遮断することによって、1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項108に記載の方法。

【請求項112】

前記検出が、1つ以上の前記タンパク質に結合している前記スクリーニング剤を検出することを含む、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

前記スクリーニング剤が発光性であり、前記検出が発光を検出することを含む、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

前記スクリーニング剤が、1つ以上の前記タンパク質を化学修飾することによって、1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項108に記載の方法。

【請求項115】

前記検出が、1つ以上の修飾された前記タンパク質を検出することを含む、請求項114に記載の方法。

【請求項116】

1つ以上の修飾された前記タンパク質が発光性であり、前記検出が発光を検出することを含む、請求項115に記載の方法。

【請求項117】

前記スクリーニング剤が、検体生成物を生成することによって1つ以上の前記タンパク質と反応する、請求項108に記載の方法。

【請求項118】

前記検出が、前記検体生成物を検出することを含む、請求項117に記載の方法。

【請求項119】

前記検体生成物が発光性であり、前記検出が発光を検出することを含む、請求項118に記載の方法。

【請求項120】

10

20

30

40

50

前記アレイの検出が、複数の時点で個々の前記クラスターのうちの1つ以上についてシグナルを取得することを含む、請求項108に記載の方法。

【請求項121】

前記シグナルが光シグナルを含む、請求項120に記載の方法。

【請求項122】

mRNA分子の前記ライブラリーが、複数の同一遺伝子の変異体を含む、請求項106に記載の方法。

【請求項123】

前記変異体がランダム突然変異誘発によって生成される、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

cDNA分子の前記ライブラリーが組み換え生物体由来する、請求項106または122に記載の方法。

【請求項125】

前記タンパク質が、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ヒストン修飾酵素、および核内ホルモン受容体からなる群より選択される、請求項106に記載の方法。

【請求項126】

前記固体支持体が核酸プライマーを含み、前記cDNA分子が、前記核酸プライマーへのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項106に記載の方法。

【請求項127】

前記cDNA分子がユニバーサルプライマー結合配列を含み、前記核酸プライマーがユニバーサルプライマー配列を含み、前記cDNA分子が、前記ユニバーサルプライマー結合配列の前記ユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して前記固体支持体に結合する、請求項126に記載の方法。

【請求項128】

前記固体支持体がフローセル内に配置される、請求項106に記載の方法。

【請求項129】

1つ以上のクラスターに結合した前記タンパク質を選択的に除去する工程をさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項130】

前記選択的除去が、前記タンパク質分子を前記固体支持体に結合させている結合のレーザー媒介性切断を含む、請求項129に記載の方法。

【請求項131】

前記mRNA分子を、リボソームで、前記固体支持体上で翻訳し、前記リボソームをピュロマイシンで処理して前記タンパク質を前記mRNA分子に結合させる、請求項106に記載の方法。

【請求項132】

前記固体支持体が、少なくとも $1 \times 10^6$ 個の前記クラスターを含む、請求項106に記載の方法。

【請求項133】

前記固体支持体上の前記クラスターの平均ピッチが10ミクロン未満である、請求項106に記載の方法。

【請求項134】

前記クラスターが100平方ミクロン未満の平均面積を含む、請求項106に記載の方法。

【請求項135】

以下を含むアレイ：

(a) 固体支持体と；

(b) 前記固体支持体に結合した異種cDNA分子のライブラリーであって、各異種cDNA分子が前記固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、各フィーチャーが特定のcDNA

10

20

30

40

50

分子の複数のコピーを含むライブラリーと；

(c) 前記cDNA分子に結合したmRNA分子であって、前記cDNA分子の各々が、それぞれの結合した前記mRNA分子に相補的であるmRNA分子と；

(d) 前記mRNA分子に結合したタンパク質分子であって、前記タンパク質分子の各々が、それぞれの結合した前記mRNA分子によってコードされているタンパク質分子。

【請求項136】

前記タンパク質が、リボソームを介してそれぞれの前記mRNA分子に結合している、請求項135に記載のアレイ。

【請求項137】

前記タンパク質が、前記リボソームに共有結合している、請求項136に記載の方法。

10

【請求項138】

前記RNA分子が、RNAポリメラーゼを介してそれぞれの前記cDNA分子に結合している、請求項135に記載のアレイ。

【請求項139】

前記mRNA分子が、前記cDNA分子に共有結合している、請求項138に記載の方法。

【請求項140】

前記タンパク質が発光標識されている、請求項135に記載のアレイ。

【請求項141】

発光標識されたスクリーニング剤が、タンパク質の結合部位に特異的に結合し、それにより前記タンパク質が蛍光標識される、請求項140に記載のアレイ。

20

【請求項142】

前記固体支持体が、少なくとも $1 \times 10^6$ 個の前記フィーチャーを含む、請求項135に記載のアレイ。

【請求項143】

前記固体支持体上の前記フィーチャーの平均ピッチが10ミクロン未満である、請求項135に記載のアレイ。

【請求項144】

前記フィーチャーが100平方ミクロン未満の平均面積を含む、請求項135に記載のアレイ。

【請求項145】

cDNA分子の前記ライブラリーが、複数の同一遺伝子の変異体を含む、請求項135に記載のアレイ。

30

【請求項146】

前記タンパク質が、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ヒストン修飾酵素および核内ホルモン受容体からなる群より選択される、請求項135に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、全体的に、医学的、農業的および工業的用途を有する薬剤（例えば、小分子、タンパク質または細胞）の発見に関し、より具体的にはそのような用途のための候補薬剤をスクリーニングするためのプラットフォームに関する。

40

【背景技術】

【0002】

現在、ハイスループットスクリーニング創薬では、複数の工程とプラットフォームとを利用して、特定の標的に対する有効性および効力、ならびに分子標的のパネルに対する良好な毒性プロファイルを示す「リード物質」または「ヒット物質」にふさわしい小分子の大量のライブラリーをスクリーニングする。

【0003】

50

この過程の第1工程では、小分子ライブラリーを、ハイスループット様式で所定の標的に対してスクリーニングする。これらのライブラリーは、典型的には、数十万のオーダーの化合物である。現在のハイスループット方法論は自動化することができる。ロボット工学の発展および自動化の結果、高価な機器は、低マイクロリットル範囲の投入試薬の量を用いて、100,000分子/日をスクリーニングすることができる。アッセイは、均一系または不均一系のいずれかであってよく、前者は比較的単純で安価であり、後者はより複雑で、時間がかかり高価であるが、より精度が高い。

#### 【0004】

最初の小分子スクリーニングアッセイは「ヒット物質」または「リード物質」を同定するのに有効であるが、これらのアッセイは通常ほんの第一歩にすぎない。これらのリード物質またはヒット物質は、典型的には、遺伝毒性、薬理学的毒性、細胞毒性、および生物細胞毒性に関して、明確な標的に対するプロファイリングアッセイを用いてさらにスクリーニングされ、有害な臨床効果を有し得る候補を排除する。これらのアッセイの各々は、キュレーションおよびデータマイニングされた独立したワークフローを採用する様々なプラットフォームおよびキットアッセイを用いて独立して行われ、ヒット物質またはリード物質の有用性についてのコンセンサスを作り出す。

10

#### 【0005】

タンパク質進化法は、別のタイプのスクリーニングを構成する。これらの方法論は、膨大な順列のアレイを扱ってきた。これらの方法論の処理量、速さ、およびコストの低さは、それらを迅速なタンパク質進化の主要な選択肢にしようとする傾向があったが、その方法はしばしば複雑であり、困難と共になされる。例えば、エマルジョンベースのスクリーニングは、液滴の合流/混合（多重スクリーニング用）の困難、エマルジョンの破壊（目的の成分の回収）の困難、液滴サイズの変化による濃度変動から生じる複雑化、および液滴の交差汚染を生じる。

20

#### 【0006】

細胞ベースの治療法は、小分子ベースの治療法またはタンパク質ベースの治療法と比較して潜在的に有利な治療能力を有する。細胞が外部シグナルを感知し、身体内の特定の部位に移動し、複数の刺激を統合し、複雑な挙動（特定のエフェクター分子の放出など）で応答することができるという重要な利点がある。細胞ベースの治療法の可能性を完全に達成するには、治療細胞を、空間と時間の両方においてその「挙動」を制御できるように正確に設計することが有効である。

30

#### 【0007】

細胞工学における現在のワークフローは、典型的には以下の工程を含む：(i) 刺激の感知、統合および応答に関する細胞内シグナル伝達回路の設計；(ii) 細胞内でのそれらの機能の媒介に関する遺伝子を組み込む複雑な遺伝子工学；ならびに(iii) ライブラリー中の全ての細胞の中から、所望の機能を良好に発揮する遺伝子相補体を有するものを同定するスクリーニング方法。所望の細胞挙動の複雑さのため、現在のスクリーニング方法は理想的ではない。例えば：蛍光活性化細胞選別（FACS）ベースの方法は処理量が多いが、細胞挙動のスナップ写真のみを見る。一方、蛍光顕微鏡法は細胞挙動の動態を詳細に追従することができるが、処理量が少ない。

40

#### 【0008】

したがって、小分子、タンパク質、細胞およびその他の薬剤を、有益な特性についてスクリーニングするためのプラットフォームおよび方法が必要とされている。本開示は、この必要性に対処し、他の利点も有する。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0009】

【特許文献1】国際公開第2014/142841 A1号パンフレット

【特許文献2】米国特許出願公開第2010/0111768 A1号明細書

【特許文献3】米国特許第8,951,781号明細書

50

【特許文献 4】	米国特許第5,565,324号明細書	
【特許文献 5】	米国特許第5,573,905号明細書	
【特許文献 6】	米国特許第6,060,596号明細書	
【特許文献 7】	米国特許第6,737,236号明細書	
【特許文献 8】	米国特許第7,427,678号明細書	
【特許文献 9】	米国特許第7,375,234号明細書	
【特許文献 10】	米国特許第7,763,736号明細書	
【特許文献 11】	米国特許第8,129,542号明細書	
【特許文献 12】	米国特許第7,259,258号明細書	
【特許文献 13】	米国特許第7,504,499号明細書	10
【特許文献 14】	米国特許出願公開第2014/0342921A1号明細書	
【特許文献 15】	米国特許第8,460,865号明細書	
【特許文献 16】	米国特許出願公開第2011/0059865 A1号明細書	
【特許文献 17】	米国特許出願公開第2014/0079923 A1号明細書	
【特許文献 18】	米国特許出願公開第2015/0005447 A1号明細書	
【特許文献 19】	国際公開第2008/093098号パンフレット	
【特許文献 20】	米国特許第6,266,459号明細書	
【特許文献 21】	米国特許第6,355,431号明細書	
【特許文献 22】	米国特許第6,770,441号明細書	
【特許文献 23】	米国特許第6,859,570号明細書	20
【特許文献 24】	米国特許第6,210,891号明細書	
【特許文献 25】	米国特許第6,258,568号明細書	
【特許文献 26】	米国特許第6,274,320号明細書	
【特許文献 27】	米国特許出願公開第2009/0026082 A1号明細書	
【特許文献 28】	米国特許出願公開第2009/0127589 A1号明細書	
【特許文献 29】	米国特許出願公開第2010/0137143 A1号明細書	
【特許文献 30】	米国特許出願公開第2010/0282617 A1号明細書	
【特許文献 31】	国際公開第00/63437号パンフレット	
【特許文献 32】	米国特許出願公開第2014/0243224 A1号明細書	
【特許文献 33】	米国特許第8,895,249号明細書	30
【特許文献 34】	米国特許第8,778,849号明細書	
【特許文献 35】	米国特許第5,641,658号明細書	
【特許文献 36】	米国特許第7,115,400号明細書	
【特許文献 37】	米国特許出願公開第2002/0055100 A1号明細書	
【特許文献 38】	米国特許出願公開第2004/0096853 A1号明細書	
【特許文献 39】	米国特許出願公開第2004/0002090 A1号明細書	
【特許文献 40】	米国特許出願公開第2007/0128624 A1号明細書	
【特許文献 41】	米国特許出願公開第2008/0009420 A1号明細書	
【特許文献 42】	国際公開第05/010145号パンフレット	
【特許文献 43】	米国特許出願公開第2005/0130173 A1号明細書	40
【特許文献 44】	米国特許出願公開第2005/0064460 A1号明細書	
【特許文献 45】	米国特許出願公開第2007/0099208 A1号明細書	
【特許文献 46】	米国特許第5,455,166号明細書	
【特許文献 47】	米国特許第5,130,238号明細書	
【特許文献 48】	米国特許第6,214,587号明細書	
【特許文献 49】	国際公開第91/06678号パンフレット	
【特許文献 50】	国際公開第04/018497号パンフレット	
【特許文献 51】	国際公開第07/123744号パンフレット	
【特許文献 52】	米国特許第7,057,026号明細書	
【特許文献 53】	米国特許第7,329,492号明細書	50

- 【特許文献 5 4】米国特許第7,211,414号明細書
- 【特許文献 5 5】米国特許第7,315,019号明細書
- 【特許文献 5 6】米国特許第7,405,281号明細書
- 【特許文献 5 7】米国特許出願公開第2008/0108082号明細書
- 【特許文献 5 8】国際公開第2012/058096号パンフレット
- 【特許文献 5 9】米国特許出願公開第2005/0191698 A1号明細書
- 【特許文献 6 0】米国特許第7,595,883号明細書
- 【特許文献 6 1】米国特許第7,244,559号明細書
- 【特許文献 6 2】米国特許第5,599,675号明細書
- 【特許文献 6 3】米国特許第5,750,341号 10
- 【特許文献 6 4】国際公開第1989/10977号パンフレット
- 【特許文献 6 5】米国特許出願公開第2010/0092957 A1号明細書
- 【特許文献 6 6】米国特許第7,960,120号明細書
- 【特許文献 6 7】米国特許第9,017,623号明細書
- 【特許文献 6 8】米国特許第8,857,462号明細書
- 【特許文献 6 9】米国特許出願公開第2014/0155295 A1号明細書
- 【特許文献 7 0】米国特許出願公開第2014/0206554 A1号明細書
- 【特許文献 7 1】米国特許出願公開第2014/0227684 A1号明細書
- 【特許文献 7 2】米国特許出願公開第2014/0378322 A1号明細書
- 【特許文献 7 3】米国特許第8,637,242号明細書 20
- 【特許文献 7 4】米国特許第6,911,132号明細書
- 【特許文献 7 5】米国特許出願公開第2006/0194331号明細書
- 【特許文献 7 6】国際公開第2007/120241号パンフレット
- 【特許文献 7 7】米国特許第6,773,566号明細書
- 【特許文献 7 8】米国特許第6,565,727号明細書
- 【特許文献 7 9】米国特許出願公開第2003/0205632号明細書
- 【特許文献 8 0】米国特許出願公開第2006/0164490号明細書
- 【特許文献 8 1】米国特許出願公開第2007/0023292号明細書
- 【特許文献 8 2】米国特許出願公開第2009/0283407号明細書
- 【特許文献 8 3】米国特許出願公開第2010/0096266号明細書 30
- 【特許文献 8 4】米国特許第7,547,380号明細書
- 【特許文献 8 5】米国特許第7,163,612号明細書
- 【特許文献 8 6】米国特許第7,641,779号明細書
- 【特許文献 8 7】米国特許第6,977,033号明細書
- 【特許文献 8 8】米国特許第7,328,979号明細書
- 【特許文献 8 9】米国特許出願公開第2006/0039823号明細書
- 【特許文献 9 0】米国特許出願公開第2011/0048951号明細書
- 【特許文献 9 1】米国特許出願公開第2009/0192044号明細書
- 【特許文献 9 2】米国特許第7,052,244号明細書
- 【特許文献 9 3】米国特許出願公開第2008/0124252号明細書 40
- 【特許文献 9 4】米国特許出願公開第2009/0321262号明細書
- 【特許文献 9 5】米国特許出願公開第2005/0179746号明細書
- 【特許文献 9 6】米国特許出願公開第2005/0037393 A1号明細書
- 【特許文献 9 7】米国特許第8,288,103号明細書
- 【特許文献 9 8】米国特許第8,486,625号明細書
- 【特許文献 9 9】米国特許出願公開第2011/0178285 A1号明細書
- 【特許文献 1 0 0】米国特許第9,012,022号明細書
- 【特許文献 1 0 1】米国特許第7,741,463号明細書
- 【特許文献 1 0 2】米国特許第7,622,294号明細書
- 【特許文献 1 0 3】米国特許第8,741,630号明細書 50

## 【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008)

【非特許文献2】Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8817-8822 (2003)

【非特許文献3】Lizardi et al., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)

【非特許文献4】Dean et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002)

【非特許文献5】Lage et al., Genome Research 13:294-307 (2003)

【非特許文献6】Walker et al., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995

【非特許文献7】Walker et al., Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992) 10

【非特許文献8】Ronaghi, et al., Analytical Biochemistry 242(1), 84-9 (1996)

【非特許文献9】Ronaghi, Genome Res. 11(1), 3-11 (2001)

【非特許文献10】Ronaghi et al. Science 281(5375), 363 (1998)

【非特許文献11】Shendure et al. Science 309:1728-1732 (2005)

【非特許文献12】Bains et al., Journal of Theoretical Biology 135(3), 303-7 (1988)

【非特許文献13】Drmanac et al., Nature Biotechnology 16, 54-58 (1998)

【非特許文献14】Fodor et al., Science 251(4995), 767-773 (1995)

【非特許文献15】Levene et al. Science 299, 682-686 (2003)

【非特許文献16】Lundquist et al. Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008) 20

【非特許文献17】Korlach et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008)

【非特許文献18】Meth. Enzymol. 291:307-347 (1998)

【非特許文献19】Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)

【非特許文献20】Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1999)

【非特許文献21】Dhindsa et al., "Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality," Lab Chip, 10:832-836 (2010) 30

【非特許文献22】Gunderson et al., Genome Research 14:870-877 (2004)

【非特許文献23】Sleden et al., J Am Chem Soc 134: 765-8 (2012)

## 【発明の概要】

【0011】

本開示は、候補薬剤の特性評価方法を提供する。本方法は、以下の工程を含むことができる：(a) 候補薬剤のライブラリーを提供する工程であって、各候補薬剤が、タグ配列を有する核酸タグに結合している工程と；(b) 候補薬剤のライブラリーを固体支持体と接触させて候補薬剤を固体支持体に結合させ、それにより、ライブラリーからの個々の候補薬剤にそれぞれ結合する個々のフィーチャーを固体支持体上に含む候補薬剤アレイを形成する工程と；(c) 候補薬剤アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、アレイ中の1つ以上の候補薬剤がスクリーニング剤と反応する工程と；(d) アレイのスクリーニング剤との接触の間または接触の後にアレイを検出し、それによりアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤がスクリーニング剤と反応することを判定する工程と；(e) アレイ上の核酸タグを配列決定し、候補薬剤の各々に結合したタグ配列を決定する工程と；(f) 少なくとも1つの候補薬剤に結合したタグ配列に基づいて、スクリーニング剤と反応するアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤を同定する工程。

【0012】

本開示は、タンパク質アレイの作製方法をさらに提供する。本方法は、以下の工程を含むことができる：(a) 固体支持体に結合したcDNA分子のライブラリーを提供する工程と；(b) 固体支持体上のcDNA分子を増幅してクラスターを形成する工程であって、各クラ

10

20

30

40

50

スターがライブラリーからの特定のcDNA分子の複数のコピーを含む工程と；(c) クラスターの複数のコピーを転写し、クラスターの各々に結合した複数のmRNA分子を生成する工程と；(d) クラスターのmRNA分子を翻訳し、クラスターの各々に結合した複数のタンパク質を生成する工程。

【0013】

この開示は、以下の工程を含むタンパク質アレイの作製方法も提供する：(a) mRNA分子のライブラリーを提供する工程であって、ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含んでいる工程、(b) ライブラリーから第1サブライブラリーを得る工程であって、第1サブライブラリーはタグ配列またはその相補体を有する核酸を含み、核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合している工程、(c) ライブラリーから第2サブライブラリーを得る工程であって、第2サブライブラリーは標的配列およびタグ配列またはその相補体を有する核酸を含んでいる工程、(d) 第2サブライブラリーを第1サブライブラリーと接触させ、それにより第2サブライブラリーの核酸を、タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合させる工程と；(e) 固体支持体上の標的配列を翻訳し、個々のフィーチャーに結合したタンパク質のアレイを作製する工程。

10

【0014】

この開示によって、細胞のスクリーニング方法も提供される。本方法は、以下の工程を含むことができる：(a) 複数の異種細胞を提供する工程であって、異種細胞の各々がタグ配列を有する核酸タグを含んでいる工程と；(b) 異種細胞の混合物を固体支持体と接触させ、固体支持体に結合した細胞のアレイを形成する工程と；(c) 固体支持体上の細胞のアレイを、少なくとも1つの光学特性についてスクリーニングする工程であって、スクリーニング反応が、固体支持体に結合した個々の細胞を検出することを含む工程と；(d) 固体支持体に結合した核酸タグのタグ配列を配列決定する工程と；(e) アレイ中の少なくとも1つの細胞を候補細胞として、候補細胞の光学特性およびタグ配列に基づいて同定する工程。

20

【0015】

本開示は、(a) 固体支持体と；(b) 固体支持体に結合した異種cDNA分子のライブラリーであって、各異種cDNA分子が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、各フィーチャーが特定のcDNA分子の複数のコピーを含むライブラリーと(c) cDNA分子に結合したmRNA分子であって、cDNA分子の各々が、それぞれの結合したmRNA分子に相補的であるmRNA分子と；(d) mRNA分子に結合したタンパク質分子であって、タンパク質分子の各々が、それぞれの結合したmRNA分子によってコードされているタンパク質分子を含むアレイを提供する。

30

【0016】

本開示は、(a) mRNA分子のライブラリーであって、ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含むライブラリーと、(b) タグ配列の相補体を有する核酸を含む固体支持体を含み、核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、個々のmRNA分子のタグ配列が、固体支持体上の個々のフィーチャーのそれぞれの相補的タグ配列にハイブリダイズし、mRNA分子の翻訳によって得られるタンパク質が、それぞれのmRNA分子に結合するアレイをさらに提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～Fは、候補薬剤のハイスループットスクリーニング過程の工程を示す図である。

【図2】候補タンパク質薬剤のハイスループット合成およびスクリーニング過程を示す図である。

【図3】図3A及び3Bは、候補タンパク質薬剤のハイスループットタグ付け、合成およびスクリーニング過程を示す図である。

【図4】スクリーニング剤の、フローセルに結合した細胞へのばく露およびスクリーニン

50

グ剤に対する様々な細胞応答から予想される蛍光対時間のプロットを示す図である。

【図5】個々のマイクロウェルに分けられ、次いでマイクロウェル特異的タグでタグ付けされた細胞を示す図である。

【図6】コード化されたビーズを用いる固体支持体上の細胞位置の解読を示す図である。

【図7】核酸タグを用いる固体支持体上の細胞位置の解読を示す図である。

【図8】細胞から固体支持体上の部位への核酸タグの転移と、固体支持体上の核酸タグの配列決定とを示す図である。

【図9】細胞膜内の脂肪酸に一对の核酸が結合することによってタグ付けされた細胞を示す図である。

【図10】フローセル表面上の核酸タグ付き細胞の捕捉を示す図である。

10

【図11】核酸タグの制限エンドヌクレアーゼ切断によるフローセル表面からの細胞の分離を示す図である。

【図12】細胞が得られた容器内の解読されたタグの位置に基づき、フローセル表面上の細胞の同定を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

この開示は、治療的使用の候補などの、候補薬剤のハイスループットスクリーニングのための装置および方法を提供する。本明細書に記載の特定の実施形態は、核酸配列決定技法および装置を有効に使用する。本明細書に記載の配列決定技法および装置を用いる利点は、各候補薬剤に会合する核酸を識別することができるように、ならびに、各候補薬剤の特定の刺激剤に対する応答を固体支持体上で個々に検出することができるように、多数の異種候補薬剤を空間的に配列できることである。

20

【0019】

特定の実施形態では、複数の異種候補薬剤がライブラリーに提供され、各候補薬剤は特有の核酸タグに結合（または別の方法で会合）する。候補薬剤は、限定されないが、核酸、タンパク質、細胞および小分子を含む任意の様々な単位体であり得る。これらのタグ付けされた候補薬剤は、個々の成員が、空間分離された候補薬剤のアレイを形成するように、固体支持体に結合することができる。次いで、候補薬剤アレイを、スクリーニング剤（または他の刺激剤）に晒すことによってスクリーニングし、候補薬剤の反応を、固体支持体上の空間分解された位置で検出することができる。1つ以上の「ヒット物質」の位置は、予想される、所望のまたは特有のシグナルのアレイ上での空間分解検出に基づいて同定することができる。各タグをアレイ内のその位置に関して同定するために、配列決定反応をアレイ上で（スクリーニング工程の前後いずれかに）行うこともできる。候補薬剤は、「ヒット物質」の位置をその位置のタグの同定と関連させることによって同定することができる。

30

【0020】

本明細書に記載の方法または装置において使用されるいくつかの候補薬剤は核酸ベースであり、例えば、タンパク質および細胞が挙げられる。タンパク質を使用するいくつかの実施形態では、タンパク質をコードするDNAまたはRNA分子の配列を決定して、あるタンパク質を別のタンパク質と識別することができる。さらに、個々のタンパク質のアミノ酸配列は、既知の遺伝コードに基づいてRNA配列から推論することができる。しかし、いくつかの実施形態では、タンパク質も、タンパク質をコードする核酸も配列決定する必要はない。むしろ、各タンパク質は、タンパク質の配列とa prioriに相関しているタグと結合（または別の方法で会合）することができる。したがって、タグを配列決定することは、あるタンパク質を別のタンパク質と識別するのに十分であり得る。同様に、細胞ベースの候補薬剤は、配列決定されて集団中の個々の細胞を同定することができる核酸を含有する。さらに、核酸配列を評価し、個々の細胞の有用な特性を決定することができる。ここでもまた、使用タグまたはa prioriに割り当てられたタグは、他の細胞内容物を配列決定する必要なしに、細胞特性が識別されるのを可能にすることができる。

40

【0021】

50

本開示の方法および装置は、候補薬剤の治療的機能についてのスクリーニングに関して例示されているが、他の機能的または構造的特性をスクリーニングできることが理解されるであろう。例えば、本方法および装置を使用して、毒性、農業利用（例えば、農薬、成長因子、ホルモンなど）、工業利用（例えば、触媒、染料、プラスチックなど）、栄養学（例えば、香料、防腐剤など）、環境浄化についてスクリーニングすることができる。一般に、本方法および装置を使用して、生物学的機能または非生物学的機能をスクリーニングすることができる。

#### 【0022】

本明細書に記載の方法および装置は、ハイスループットスクリーニングの間に定量的な測定を行うことができるという利点を有する。例えば、市販の配列決定プラットフォーム、例えばIllumina社（サンディエゴ、カリフォルニア州）によって商品化されているものなどは、蛍光シグナルを定量するための比較的広いダイナミックレンジを有する精密光学部品を含む。さらなる利点は、候補薬剤アレイ中の複数の位置でのスクリーニング反応の時間的動態を追跡できるということである。対照的に、多くの従来スクリーニングで使用される流体選別方法は、通過する候補薬剤のスナップ写真のみを提供し、それにより測定を単一時点に限定する。本明細書に記載の方法および装置は、流体選別技法と同等か、場合によってはそれよりも優れている処理量を提供するが、スクリーニング結果の時間ベースの測定という付加価値がある。本明細書に記載の装置および方法のさらなる利点は、スクリーニング結果を検出できることと、スクリーニングからの「ヒット物質」を同定するために、タグとスクリーニング結果との空間的相関を与える方法でタグを検出できることである。

10

20

#### 【0023】

本明細書で使用される用語は、別段の指定がない限り、関連技術におけるそれらの通常の意味を持つと理解される。本明細書で使用されるいくつかの用語およびそれらの意味を、以下に記載する。

#### 【0024】

本明細書で使用される用語「アンプリコン」は、核酸に関連して使用される場合、核酸のコピーの産物を意味し、産物は、核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部と同じかまたは相補的なヌクレオチド配列を有する。アンプリコンは、核酸またはそのアンプリコンを鋳型として使用する任意の様々な増幅方法によって生成することができ、例えば、ポリメラーゼ伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、多置換増幅（MDA）、ライゲーション伸長、またはライゲーション連鎖反応が挙げられる。アンプリコンは、特定のヌクレオチド配列の単一コピー（例えば、PCR産物）またはヌクレオチド配列の複数のコピー（例えば、RCAのコンカテマー産物）を有する核酸分子であり得る。標的核酸の第1アンプリコンは、典型的には相補的コピーである。続くアンプリコンは、第1アンプリコンの生成後に、標的核酸からまたはアンプリコンから作製されるコピーである。それに続くアンプリコンは、標的核酸と実質的に相補的であるか、または標的核酸と実質的に同一である配列を有することができる。

30

#### 【0025】

本明細書で使用される用語「アレイ」は、相対的位置に応じて互いに区別され得るフィーチャーまたは部位の集団を指す。アレイの異なる部位にある異種分子または他の単位体は、アレイ内の部位の位置に応じて互いに区別することができる。アレイの個々の部位は、特定のタイプの1つ以上の分子（または他の単位体）を含むことができる。例えば、一部位は、特定の配列を有する単一核酸分子を含むことができるか、または一部位は、同じ配列（および/もしくはその相補的な配列）を有するいくつかの核酸分子を含むことができる。アレイの部位は、同じ基質上に位置する異なるフィーチャーであり得る。例示的なフィーチャーには、限定されないが、基質内のウェル、基質内もしくは基質上のビーズ（もしくは他の粒子）、基質からの突起、基質上のリッジまたは基質内のチャンネルが挙げられる。アレイの部位は、それぞれが異種分子（または他の単位体）を持つ別々の基質であり得る。別個の基質に結合した異種単位体は、基質が会合している固体支持体上の基質の

40

50

位置に応じて、または液体もしくはゲル中の基質の位置に応じて同定され得る。別個の基質が固体支持体上に位置する例示的なアレイには、限定されないが、ウェル中にビーズを有するものが挙げられる。

**【0026】**

本明細書で使用される用語「結合している」は、2つの物が互いに接合、固定、接着、接続、または結合している状態を指す。例えば、核酸などの検体は、共有結合または非共有結合によって、ゲルもしくは固体支持体などの物質に結合することができる。共有結合は、原子間での電子対の共有を特徴とする。非共有結合は、電子対の共有を伴わない化学結合であり、例えば水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、親水性相互作用および疎水性相互作用を挙げることができる。いくつかの実施形態では、捕捉剤を介して結合が起り得る。捕捉剤には、例えば、抗体、受容体、核酸、リガンド、レクチン、炭水化物、アビジン、ビオチン、またはそれらの類似体を挙げることができる。

10

**【0027】**

本明細書で使用される用語「候補薬剤」は、特定の構造または機能を有すると推測される単位体を意味することを意図している。例示的な単位体には、限定されないが、分子、細胞および細胞成分が挙げられる。分子は、タンパク質、アミノ酸、核酸（例えば、DNAまたはRNA）、ヌクレオチド、多糖類、糖類、代謝産物、ビタミン、酵素補因子などの生物活性分子であってもよい。他の候補薬剤には、大環状分子、環状ペプチド、融合分子（例えば、核酸-タンパク質融合物）、または提示構築物（例えば、フェージ上のペプチド）が挙げられる。候補薬剤が保持すると推測される例示的な機能には、限定されないが、別の薬剤の活性化、別の薬剤の阻害、別の薬剤の化学修飾、別の薬剤の分解、別の薬剤の合成が挙げられ、ここで、他の薬剤は、候補薬剤であるとして上記に例示した単位体のうちの任意の1つ以上であってもよい。候補薬剤の構造は、上記の単位体もしくは当該技術分野で知られている他の単位体についての、任意の既知構造または推測される構造であり得る。

20

**【0028】**

本明細書で使用される用語「異種」は、核酸に関連して使用される場合、核酸が互いに同じでないヌクレオチド配列を有することを意味する。2つ以上の核酸は、それらの全長に沿って異なるヌクレオチド配列を有することができる。あるいは、2つ以上の核酸は、それらの全長の実質的な部分に沿って異なるヌクレオチド配列を有することができる。例えば、2つ以上の核酸は、2つ以上の分子に対して異なる標的ヌクレオチド配列部分を有することができる。一方で、2つ以上の分子で同じであるユニバーサル配列部分も有することができる。本用語は、アミノ酸配列の相違に基づいて互いに異なるとして識別可能なタンパク質にも同様に適用することができる。

30

**【0029】**

本明細書で使用される用語「各」は、単位体のコレクションに関連して使用される場合、コレクション内の個々の単位体を識別することを意図しているが、コレクション内の全ての単位体を必ずしも指すものではない。明示的な開示または文脈がはっきりと別段に指示している場合は、例外が生じることがある。

**【0030】**

本明細書で使用される用語「伸長」は、核酸に関連して使用される場合、少なくとも1つのヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの核酸への付加を意味することを意図している。特定の実施形態では、1つ以上のヌクレオチドを、核酸の3'末端に、例えばポリメラーゼ触媒作用（例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼもしくは逆転写酵素）を介して付加することができる。化学的または酵素的方法を使用して、1つ以上のヌクレオチドを核酸の3'もしくは5'末端に付加することができる。1つ以上のオリゴヌクレオチドを、核酸の3'もしくは5'末端に、例えば化学的または酵素的（例えば、リガーゼ触媒作用）方法を介して付加することができる。核酸は鑄型指向様式で伸長ことができ、それにより伸長産物は、伸長される核酸にハイブリダイズする鑄型核酸に相補的である。

40

**【0031】**

50

本明細書で使用される用語「フィーチャー」は、特定の種類の分子または細胞のアレイにおける位置を意味する。フィーチャーは、単一分子（または細胞）のみを含有することができるか、または同種のいくつかの分子（もしくは細胞）の集団を含有することができる。いくつかの実施形態では、フィーチャーは、分子または細胞を結合させる前に固体支持体上に存在する。他の実施形態では、分子または細胞の固体支持体への結合によってフィーチャーが作製される。アレイのフィーチャーは、典型的には離散的である。離散的フィーチャーは連続していてもよく、または互いに離間していてもよい。フィーチャーのサイズおよび/またはフィーチャー間の間隔は、アレイが高密度、中密度または低密度となるように変化させることができる。高密度アレイは、約15 μm未満で離間した部位を有することを特徴とする。中密度アレイは、約15~30 μmで離間した部位を有し、一方で低密度アレイは、30 μmを超えて離間した部位を有する。本明細書で有用なアレイは、例えば、100 μm、50 μm、10 μm、5 μm、1 μm、または0.5 μm未満で離間した部位を有することができる。本開示の装置または方法を使用して、上記の密度または密度範囲の部位を識別するのに十分な解像度でアレイを検出することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0032】

本明細書で使用される用語「フローセル」は、反応が実施され得るチャンパー、試薬をチャンパーに送達するための注入口、およびチャンパーから試薬を除去するための排出口を有する容器を意味することを意図している。いくつかの実施形態では、チャンパーは、チャンパー内で生じる反応を検出するように構成される。例えば、チャンパーは、アレイ、光標識された分子などのチャンパー内での光学的検出を可能にする1つ以上の透明な面を備えることができる。例示的なフローセルには、限定されないが、核酸配列決定装置で使用されるフローセルが挙げられ、例えば、Illumina社（サンディエゴ、カリフォルニア州）によって市販されているGenome Analyzer（登録商標）、MiSeq（登録商標）、NextSeq（登録商標）もしくはHiSeq（登録商標）プラットフォーム用の；またはLife Technologies（カールズバッド、カリフォルニア州）によって市販されているSOLiD（商標）もしくはIon Torrent（商標）配列決定プラットフォーム用のフローセルなどが挙げられる。例示的なフローセルならびにそれらの製造方法および使用方法は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献1、特許文献2および特許文献3にも記載されている。

#### 【0033】

本明細書で使用される用語「ライブラリー」は、いくつかの異種単位体を含むコレクションを意味することを意図している。コレクション内の単位体は、構造および/または機能が異なる場合がある。例えば、コレクションは、異なるヌクレオチド配列を有する核酸を含み得るか、またはコレクションは、異なる一次構造（すなわち、アミノ酸配列）、二次構造、三次構造または四次構造を有するタンパク質を含み得る。しかし、ライブラリー内には単位体のいくつかの冗長性が存在し得ることが理解されるであろう。例えば、多種多様な異種核酸またはタンパク質を含むライブラリーであっても、特定の核酸またはタンパク質の複数のコピーが存在し得る。ライブラリーに存在し得る例示的な単位体のタイプには、候補薬剤またはスクリーニング剤に関して本明細書に記載されるものを挙げるることができる。

#### 【0034】

本明細書で使用される用語「発光性」は、コールド体放射線を放出することを意味する。本用語は、加熱の結果として物質から放出される放射線である白熱とは区別されることを意図する。一般に発光は、エネルギー源が、原子の電子を、その最も低いエネルギーの基底状態からより高いエネルギーの励起状態に移して；その後その電子が、基底状態に戻れるように放射線の形でエネルギーを返したときに生じる。特に有用な発光単位体のタイプは、エネルギーが励起放射線によって提供された際にコールド体放射線を放出するものである。そのような単位体は、「蛍光性」または「光輝性」と称される。蛍光またはフォトルミネッセンスは、別の波長で単位体を照射した結果である波長の単位体による放射線の放出として知覚され得る。

#### 【0035】

本明細書で使用される用語「核酸」および「ヌクレオチド」は、当該技術分野でのそれらの使用と一致することと、天然に存在する種またはそれらの機能的類似体を含むことを意図している。特に有用な核酸の機能的類似体は、配列特異的な様式で核酸にハイブリダイズすることができるか、または特定のヌクレオチド配列の複製の鑄型として使用することができる。天然に存在する核酸は、一般に、ホスホジエステル結合を含有する主鎖を有する。類似構造は、代替の主鎖連鎖を有することができ、当該技術分野で知られている任意の様々なものが挙げられる。天然に存在する核酸は、一般にデオキシリボース糖（例えばデオキシリボ核酸（DNA）に見られる）またはリボース糖（例えばリボ核酸（RNA）に見られる）を有する。核酸は、当該技術分野で知られているこれらの糖成分の任意の様々な類似体を含むヌクレオチドを含有することができる。核酸は、天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドを含み得る。これに関して、天然デオキシリボ核酸は、アデニン、チミン、シトシンまたはグアニンからなる群より選択される1つ以上の塩基を有することができ、リボ核酸は、ウラシル、アデニン、シトシンまたはグアニンからなる群より選択される1つ以上の塩基を有することができる。核酸またはヌクレオチドに含めることができる有用な非天然塩基は、当該技術分野で知られている。

10

20

30

40

50

#### 【0036】

本明細書で使用される用語「ピッチ」は、アレイのフィーチャーに関連して使用される場合、隣接するフィーチャーの中心間距離を指すことを意図している。フィーチャーのパターンは、平均ピッチの観点から特徴付けることができる。パターンは、平均ピッチの周りの変動係数が小さくなるように並べることができるか、またはパターンをランダムにすることができ、その場合変動係数は比較的大きくなり得る。いずれの場合でも、平均ピッチは、例えば、少なくとも約10nm、0.1 μm、0.5 μm、1 μm、5 μm、10 μm、100 μmまたはそれ以上であり得る。その代わりに、またはそれに加えて、平均ピッチは、例えば、最大で約100 μm、10 μm、5 μm、1 μm、0.5 μm、0.1 μmまたはそれ以下であり得る。当然ながら、特定のフィーチャーのパターンの平均ピッチは、上記範囲から選択された下限値のうちの1つと上限値のうちの1つの間にあり得る。

#### 【0037】

本明細書で使用される用語「タンパク質」または「アミノ酸」は、当該技術分野でのそれらの使用と一致することと、天然に存在する種またはそれらの機能的類似体を含むことを意図している。天然に存在するタンパク質は、一般に、ペプチド結合を含有する主鎖を有する。類似構造は、代替の主鎖連鎖を有することができ、当該技術分野で知られている任意の種々のものが挙げられる。天然に存在するタンパク質は、一般に、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンから選択される天然アミノ酸、および天然に存在するそれらの修飾を有する。いくつかの天然に起こる修飾には、（例えば、セリン、スレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸の）リン酸化、プレニル化、イソプレニル化、アシル化、アルキル化、グリコシル化、ピオチン化、ユビキチン化などが挙げられる。タンパク質は、非天然成分を有する天然アミノ酸を含むことができる。タンパク質は、天然または非天然アミノ酸を含むことができる。

#### 【0038】

本明細書で使用される用語「反応する」は、第1薬剤および第2薬剤に関連して使用される場合、薬剤の一方または両方の化学構造を修飾する作用、2つの薬剤間に1つ以上の共有結合を作り出す作用、試薬の一方がもう一方の薬剤の化学構造の修飾を触媒することを可能にする作用、または2つの薬剤を特異的に結合させる作用（例えば、非共有結合性相互作用を介して）を指す。例示的な反応には、限定されないが、還元、酸化、付加、脱離、転位、エステル化、アミド化、エーテル化、環化、もしくは置換などの化学反応；第1薬剤が第2薬剤に特異的親和性で結合する結合性相互作用；2つ以上の薬剤が互いから離れる解離反応；蛍光；発光；化学発光；および核酸複製、核酸増幅、核酸ハイブリダイゼーション、核酸ライゲーション、リン酸化、酵素触媒、受容体結合、またはリガンド結合など

の生物学的反応が挙げられる。

【0039】

本明細書で使用される用語「組み換え」は、天然に存在しない遺伝子構築物を指すことを意図している。一例は、1つより多い起源由来の遺伝物質を組み合わせた産物である。例示的な組み換え分子には、限定されないが、DNA、RNAおよびタンパク質が挙げられる。組み換え分子が由来し得る起源には、例えば、異なる生物体由来の類似の遺伝要素、同じ生物体由来の異なる遺伝要素、異なる生物体由来の異なる遺伝要素、合成遺伝要素、または合成および天然遺伝要素の組み合わせが挙げられる。

【0040】

本明細書で使用される用語「スクリーニング剤」は、第2候補薬剤と比較して第1候補薬剤に対して選択的な構造または機能を有する単位体を意味することを意図している。多くの実施形態では、スクリーニング剤の構造または機能は、本開示の方法または組成物におけるその使用の前に知られている。例示的な単位体には、限定されないが、分子、細胞および細胞成分が挙げられる。分子は、タンパク質、アミノ酸、核酸（例えば、DNAまたはRNA）、ヌクレオチド、多糖類、糖類、代謝産物、ビタミン、酵素補因子などの生物活性分子であってもよい。例示的な選択的機能には、限定されないが、別の薬剤の活性化、別の薬剤の阻害、別の薬剤の化学修飾、別の薬剤の分解、別の薬剤の合成が挙げられる；ここで他の薬剤は、候補薬剤であるとして上記で例示した単位体のうちの任意の1つ以上であり得る。スクリーニング剤の構造は、上記の単位体または当該技術分野で知られている他の単位体として任意の既知構造もしくは推測される構造であり得る。

10

20

【0041】

本明細書で使用される、第2の物と比較して第1の物を「選択的に」操作すること（または、その「選択的」操作）への言及は、操作が第2の物に対する影響と比較して第1の物に対してより大きな影響を及ぼすことを意味することを意図している。操作は、第2の物に何ら影響を与える必要はない。操作は、第1の物に対して、第2の物に対する影響よりも少なくとも1%、10%、50%、90%、または99%大きい影響を及ぼし得る。操作は、第1の物に対して、第2の物に対する影響よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、100倍、 $1 \times 10^3$ 倍、 $1 \times 10^4$ 倍または $1 \times 10^6$ 倍大きい影響を及ぼし得る。操作には、例えば、修飾、接触、処理、変換、（例えば化学結合の）開裂、（例えば、化学結合の）光化学的開裂、（例えば化学結合の）形成、（例えば、化学結合の）光化学形成、共有結合性修飾、非共有結合性修飾、破壊、光剥離、除去、合成、重合、光重合、（例えば、核酸の）増幅、（例えば、核酸の）コピー、（例えば、核酸の）伸長、（例えば、核酸の）ライゲーション、または本明細書に記載されているか、そうでなければ当該技術分野で知られている他の操作を挙げることができる。

30

【0042】

本明細書で使用される用語「小分子」は、約1000ダルトン未満の分子量を有する化合物を意味することを意図している。特定の実施形態では、小分子は非重合性である。しかし、小分子は、他の実施形態では、二量体または三量体であり得る。小分子は、重合体に取り込まれることができる単量体であり得ることも理解されるであろう。特に有用な小分子は有機化合物である。有用な小分子は、900、800、600、400、200または100ダルトン未満の分子量を有することができる。

40

【0043】

本明細書で使用される用語「固体支持体」は、水性液体に不溶である硬質基質を指す。基質は、非多孔質または多孔質であり得る。基質は、場合によっては（例えば多孔性のために）液体を吸収することができ得るが、典型的には、液体を吸収した際に基質が実質的に膨潤せず、乾燥によって液体が除去された際に実質的に収縮しない程度に十分に硬い。非多孔性固体支持体は、一般に、液体または気体に対して不透過性である。例示的な固体支持体には、限定されないが、ガラスおよび変性もしくは官能化ガラス、プラスチック（例えば、アクリル、ポリスチレンおよびスチレンと他の物質の共重合体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、Teflon（商標）、環状オレフィン、ポリ

50

イミドなど)、ナイロン、セラミック、樹脂、Zeonor、シリカもしくはケイ素および変性ケイ素を含むシリカベースの物質、炭素、金属、無機ガラス、光ファイバー束ならびにポリマーが挙げられる。いくつかの実施形態に特に有用な固体支持体は、フローセルの構成要素であるか、またはフローセル装置内に配置される。例示的なフローセルを、本明細書においてさらに詳細に記載する。

【0044】

本明細書で使用される用語「サブライブラリー」は、ライブラリーからの単位体またはライブラリーからの単位体のコピーを含む表現を有するコレクションを意味することを意図している。サブライブラリー内の表現は、ライブラリー内の表現と比べて、完全であっても部分的であってもよい。サブライブラリーは、ライブラリーから単位体の少なくとも一部を分離することによって、またはライブラリー内の単位体の少なくともいくつかのコピーを作ることによって得ることができる。

10

【0045】

本明細書中で使用される用語「タグ配列」は、核酸に結合した(または会合した)薬剤を同定または特性評価するために使用され得る核酸中の一連のヌクレオチドを意味することを意図している。タグ配列は、天然に存在する配列、またはその核酸が得られた生物体において天然に存在しない配列であり得る。特定の実施形態では、生体試料と共に使用される1つ以上のタグ配列は、その生体試料のゲノム、トランスクリプトームまたは他の核酸において天然には存在しない。例えば、タグ配列は、特定の生体試料中の核酸配列に対して80%、70%、60%、50%または40%未満の配列同一性を有することができる。

20

【0046】

本明細書で使用される用語「ユニバーサル配列」は、2つ以上の核酸分子について、分子が互いに異なる配列領域を有する場合であっても、共通している一連のヌクレオチドを指す。分子のコレクションの異なる成員において存在するユニバーサル配列は、ユニバーサル配列に相補的なユニバーサル捕捉核酸の集団を用いて、複数の異種核酸の捕捉を可能にすることができる。同様に、分子のコレクションの異なる成員において存在するユニバーサル配列は、ユニバーサル配列に相補的なユニバーサルプライマーの集団を用いて、複数の異種核酸の複製または増幅を可能にすることができる。したがって、ユニバーサル捕捉核酸またはユニバーサルプライマーは、ユニバーサル配列に特異的にハイブリダイズすることができる配列を含む。

30

【0047】

以下に記載され、特許請求の範囲に列挙される実施形態は、上記の定義を考慮して理解され得る。

【0048】

本開示は、候補薬剤の特性評価方法を提供する。本方法は、以下の工程を含むことができる：(a) 候補薬剤のライブラリーを提供する工程であって、各候補薬剤が、タグ配列を有する核酸タグに結合している工程と；(b) 候補薬剤のライブラリーを固体支持体と接触させて候補薬剤を固体支持体に結合させ、それにより、ライブラリーからの個々の候補薬剤にそれぞれ結合する個々のフィーチャーを固体支持体上に含む候補薬剤アレイを形成する工程と；(c) 候補薬剤アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、アレイ中の1つ以上の候補薬剤がスクリーニング剤と反応する工程と；(d) アレイのスクリーニング剤との接触の間または接触の後にアレイを検出し、それによりアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤がスクリーニング剤と反応することを判定する工程と；(e) アレイ上の核酸タグを配列決定し、候補薬剤の各々に結合したタグ配列を決定する工程と；(f) 少なくとも1つの候補薬剤に結合したタグ配列に基づいて、スクリーニング剤と反応するアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤を同定する工程。

40

【0049】

任意の様々な候補薬剤を、本明細書に記載の方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、候補薬剤は、タンパク質、核酸、細胞または小分子からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、使用される候補薬剤は、タンパク質、核酸、細胞または

50

小分子などの単位体の1つ以上のタイプを除外することが理解されるであろう。方法または組成物に含めることができるか、またはそれらから除外することができるこれらのタイプの単位体の例を、本開示を通じて記載する。

#### 【0050】

有用な候補薬剤は、生物活性を有する分子か、または有すると推測される分子であり得る。例示的な生物活性には、限定されないが、治療活性、毒性、ホルモン活性、生体分子または細胞の活性化、生体分子または細胞の阻害、抗生物質活性、抗ウイルス活性、農薬活性、精神薬理作用もしくは免疫作用などの生物体またはその器官への作用が挙げられる。特に有用な種類の候補薬剤は、酵素阻害剤または酵素活性剤であり、例えば、本明細書に記載の酵素を標的とするものが挙げられる。また、細胞シグナル伝達の候補活性剤、または細胞シグナル伝達の候補阻害剤も有用である。しかし、いくつかの実施形態では、候補薬剤は、生物活性を有する必要はなく、生物活性を有すると推測される必要もない。場合によっては、候補薬剤は非生物活性を有するか、または有すると推測されることになる。非生物的であり得る活性の例には、限定されないが、工業的触媒、食品保存、石油処理、ポリマー合成などが挙げられる。

10

#### 【0051】

候補薬剤は、重合性であっても非重合性であってもよい。特に有用な重合体には、限定されないが、タンパク質、核酸、多糖類、タンパク質核酸(PNA)およびプラスチックが挙げられる。有用な非重合性分子には、例えば、脂質、アミノ酸、ヌクレオチド、酵素補因子、代謝産物、単糖類および他の小分子が挙げられる。

20

#### 【0052】

候補薬剤として有用なタンパク質の例には、限定されないが、抗体；オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、マンナーゼ、アミラーゼ、グルカナーゼ、パピイン、レニン、ヒストン修飾酵素もしくはエステラーゼなどの酵素；またはG-共役受容体、細胞表面受容体、免疫受容体、感覚受容体および核内ホルモン受容体などの受容体が挙げられる。

#### 【0053】

別の特に有用な種類の候補薬剤は、例えば、限定されないが、以下を含む生物体に由来する細胞が挙げられる細胞である：齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、有蹄類、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ネコ、イヌ、霊長類（すなわち、ヒトもしくは非ヒト霊長類）などの哺乳類；シロイヌナズナ、トウモロコシ、モロコシ、オートムギ、コムギ、イネ、アブラナ、もしくはダイズなどの植物；緑藻クラミドモナスなどの藻類；エレガンス線虫などの線虫；キイロショウジョウバエ、蚊、ミバエ、ミツバチもしくはクモなどの昆虫；ゼブラフィッシュなどの魚類；爬虫類；カエルもしくはアフリカツメガエルなどの両生類；キイロタマホコリカビ；ニューモシスチス・カリニ、トラフグ、酵母、サッカラモナス・セレピシエもしくはシゾサッカロマイセス・ボンベなどの真菌；または熱帯熱マラリア原虫。他の生物体には、細菌、大腸菌、ブドウ球菌もしくは肺炎マイコプラズマなどの原核生物；古細菌；C型肝炎ウイルスもしくはヒト免疫不全ウイルスなどのウイルス；またはウイロイドが挙げられる。細胞は、上記の生物体の均質培養物もしくは集団、あるいはいくつかの異種生物体のコレクション、例えば混合培養物、共同体もしくは生態系に由来し得る。

30

40

#### 【0054】

本明細書で使用される候補薬剤は天然に存在するものであってよく、例えば、天然の集団から収穫されるものであってよい。例えば、候補薬剤は、多細胞生物または共同体から単離された遺伝的に天然の細胞であり得る。同様に、1つ以上の遺伝的に天然の細胞または生物体から得られたタンパク質、核酸または他の生体分子を使用することができる。あるいは、候補薬剤は合成されてもよく、または天然薬剤の改変された変異体であってもよい。例えば、遺伝子操作された細胞、タンパク質または核酸が、本明細書に記載の方法に

50

において使用され得る。候補薬剤として使用される細胞または細胞成分は、単細胞生物または多細胞生物に由来し得る。特定の実施形態では、幹細胞、免疫細胞またはこれらの細胞型の1つ以上に由来する生体成分を、候補薬剤として本明細書で使用することができる。

【0055】

いくつかの実施形態では、候補薬剤の合成と並行して核酸タグを合成することができる。例えば、コンビナトリアルケミストリー手法を用いて候補薬剤のライブラリーを合成することができる。特定のヌクレオチド（またはヌクレオチド配列）を加えて、多くの異種化学成分のいずれがライブラリーの各成員に付加されるかを示すことができる。したがって、特定の候補薬剤に結合したタグ中のヌクレオチド配列は、特定の候補薬剤の合成履歴、その特定の候補薬剤の化学構造を決定するために任意に使用され得る情報を提供する。結合およびコンビナトリアル合成方法に使用される化学物質は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献4；特許文献5または特許文献6に記載されている。

10

【0056】

本明細書に記載の方法の特定の実施形態は、候補薬剤のライブラリーをコンビナトリアル合成する工程を含み、ここで、各候補薬剤で実施されるコンビナトリアル合成の個々の反応は、1つ上のヌクレオチドの特有のシグネチャーの、上記候補薬剤の各々に結合した核酸タグへの付加によって追跡され、それにより候補薬剤のライブラリーを提供し、ここで各候補薬剤は特有の核酸タグに結合している。

【0057】

核酸タグを候補薬剤に、核酸および使用中の特定のタイプの候補薬剤との使用に適した当該技術者分野で知られている任意の様々な化学物質を用いて結合させることができる。特定の実施形態では、核酸タグは候補薬剤に共有結合する。候補薬剤が核酸であるか、または核酸によってコードされる場合、連続核酸は、タグ配列および候補薬剤配列を含むことができる。化学的方法を用いて、核酸タグを、候補薬剤として働くか、または候補薬剤をコードする別の核酸に共有結合させることも可能である。核酸タグを候補薬剤に（候補薬剤が核酸または他の種であろうとなかろうと）結合させるのに適した化学物質には、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHSエステル）、イミドエステル、ヒドラジン、カルボジイミド、マレイミド、ハロアセチル、ピリジニルジスルフィド、ジアジリン、クリック化学物質（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献7；特許文献8；特許文献9；特許文献10；または特許文献11を参照）またはスルフヒドリルが挙げられる。他の有用な化学物質には、核酸をビーズまたは他の固体支持体に結合させるために使用されているものが挙げられ、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献12または特許文献13に記載されている通りである。

20

30

【0058】

タグ配列は、任意の様々な長さであり得る。より長い配列は、一般に、集団に対してより多くのおよび多様なタグを収容することができる。一般に、複数の全プローブは（異なる配列ではあるが）同じ長さのタグを有することになるが、異なる長さのタグを異なるプローブに使用することも可能である。タグ配列は、少なくとも2、4、6、8、10、12、15、20またはそれ以上の長さのヌクレオチドであり得る。その代わりに、またはそれに加えて、タグ配列の長さは、最大で20、15、12、10、8、6、4またはそれ以下のヌクレオチド

40

【0059】

本開示の方法は、候補薬剤のライブラリーを固体支持体と接触させ、候補薬剤を固体支持体に結合させる工程を含むことができる。その結果、候補薬剤のアレイを支持体上に形成することができる。そのアレイは、それぞれがライブラリーからの個々の候補薬剤に結合する個々のフィーチャーを含んでいる。

【0060】

任意の様々な固体支持体を使用することができる。特に有用な固体支持体は、核酸アレイに使用されるものである。例としては、ガラス、変性ガラス、官能化ガラス、無機ガラ

50

ス、マイクロスフェア（例えば不活性および/または磁性粒子）、プラスチック、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、セラミック、樹脂、シリカ、シリカベースの物質、炭素、金属、光ファイバーまたは光ファイバー束、重合体およびマルチウェル（例えば、マイクロタイター）プレートが挙げられる。例示的なプラスチックには、アクリル、ポリスチレン、スチレンと他の物質の共重合体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタンおよびTeflon（商標）が挙げられる。例示的なシリカベースの物質には、ケイ素および様々な形態の変性ケイ素が挙げられる。

#### 【0061】

特定の実施形態では、固体支持体は、ウェル、チューブ、チャンネル、キュベット、ペトリ皿、ボトルなどの容器内にあり得るか、またはその一部であり得る。特に有用な容器は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献1；特許文献2および特許文献3、または非特許文献1に記載のようなフローセルである。例示的なフローセルは、Illumina社（サンディエゴ、カリフォルニア州）によって市販されているGenome Analyzer（登録商標）、MiSeq（登録商標）、NextSeq（登録商標）もしくはHiSeq（登録商標）プラットフォームなどの配列決定プラットフォームでの使用のためのフローセルである。別の特に有用な容器は、マルチウェルプレートまたはマイクロタイタープレート中のウェルである。

10

#### 【0062】

任意に、固体支持体はゲルコーティングを含むことができる。核酸の固体支持体へのゲルを介した結合は、Illumina社（サンディエゴ、カリフォルニア州）から市販されているフローセルによって例示されるか、または、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献16、特許文献17、特許文献18もしくは特許文献19に記載されている。本明細書に記載の方法および装置において使用され得る例示的なゲルには、限定されないが、アガロースなどのコロイド構造；ゼラチンなどのポリマーメッシュ構造；またはポリアクリルアミド、SFA（例えば、参照により本明細書に組み込まれる特許文献16を参照）もしくはPAZAM（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献17、もしくは特許文献18を参照）などの架橋ポリマー構造を有するものが挙げられる。ゲルを使用して、候補薬剤に直接（例えば、ゲルと候補薬剤との間の共有結合を介して）結合させるか、または、候補薬剤に既に結合している相補的核酸へのゲル結合核酸のハイブリダイゼーションを介して結合させることができる。

20

30

#### 【0063】

いくつかの実施形態では、固体支持体は、核酸および/または候補薬剤を結合させることができるフィーチャーのレイとして構成され得る。特定の実施形態では、各フィーチャーは、1つだけの候補薬剤を収容することになるか、さもなければ候補薬剤の特定の混合物の単一種を含有するように構成されることになる。フィーチャーは、任意の様々な所望の形式で存在することができる。例えば、フィーチャーは、ウェル、ピット、チャンネル、リッジ、隆起領域、ペグ、ポストなどであり得る。いくつかの実施形態では、フィーチャーはビーズを含有することができる。しかし、特定の実施形態では、フィーチャーはビーズまたは粒子を含む必要はない。例示的なフィーチャーには、454 LifeSciences（Rocheの子会社、バーゼル、スイス）またはIon Torrent（Life Technologiesの子会社、カー

40

#### 【0064】

固体支持体上のフィーチャーは、上記で例示したガラス、プラスチックまたは他の物質

50

などの非金属表面上の金属フィーチャーであり得る。金属フィーチャーを有する例示的な固体支持体およびその製造方法は、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献 3 3 または特許文献 3 2 に記載されている。

【0065】

フィーチャーは、スポットまたはパッチの格子として固体支持体に表示される。フィーチャーは、反復パターンまたは不規則な非反復パターンで配置され得る。特に有用な反復パターンは、六角形パターン、直線パターン、格子パターン、鏡映対称性を有するパターン、回転対称性を有するパターンなどである。非対称パターンも有用であり得る。ピッチは、最も近い隣接フィーチャーの異なる対の間で同じであってもよく、またはピッチは、最も近い隣接フィーチャーの異なる対の間で変化してもよい。

10

【0066】

高密度アレイは、約 $15\mu\text{m}$ 未満の平均ピッチ（隣接フィーチャーについて）を有することを特徴とする。中密度アレイは約 $15\sim 30\mu\text{m}$ の平均ピッチを有し、低密度アレイは $30\mu\text{m}$ を超える平均ピッチを有する。本発明に有用なアレイは、 $100\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ または $0.5\mu\text{m}$ 未満の平均ピッチを有し得る。上記または本明細書の他の場所に記載の平均ピッチ値および範囲は、秩序アレイまたはランダムアレイに適用可能であることを意図している。

【0067】

特定の実施形態では、固体支持体上のフィーチャーは、各々が約 $100\text{nm}^2$ 、 $250\text{nm}^2$ 、 $500\text{nm}^2$ 、 $1\mu\text{m}^2$ 、 $2.5\mu\text{m}^2$ 、 $5\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、または $500\mu\text{m}^2$ 以上の面積を有し得る。その代わりに、またはそれに加えて、フィーチャーは、各々が約 $1\text{mm}^2$ 、 $500\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $25\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $5\mu\text{m}^2$ 、 $1\mu\text{m}^2$ 、 $500\text{nm}^2$ 、または $100\text{nm}^2$ 以下の面積を有し得る。上記範囲は、上から見た際または上から撮像した際の固体支持体上のビーズまたは他の粒子の見掛け領域を表すことができる。

20

【0068】

特定の実施形態では、固体支持体は、ビーズまたは他の粒子のコレクションを含むことができる。表面上に配置されたビーズを有するアレイの例には、BeadChip（商標）アレイ（Illumina社、サンディエゴ、カリフォルニア州）などのビーズがウェルに位置するもの、454 LifeSciences（Rocheの子会社、バーゼル、スイス）からの配列決定プラットフォームで使用される基質、またはIon Torrent（Life Technologiesの子会社、カールズバッド、カリフォルニア州）の配列決定プラットフォームで使用されている基質が挙げられる。ビーズを表面上に有する他の固体支持体は、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献 2 0；特許文献 2 1；特許文献 2 2；特許文献 2 3；特許文献 2 4；特許文献 2 5；特許文献 2 6；特許文献 2 7；特許文献 2 8；特許文献 2 9；特許文献 3 0または特許文献 3 1に記載されている。上記参考文献のいくつかは、ビーズを固体支持体の中または上に充填する前に、核酸をビーズに結合させる方法を記載している。このように、ビーズのコレクションは、各々が結合した特有の核酸を有する異種ビーズを含むことができる。しかし、ユニバーサルプライマーを含むようにビーズを作製することができ、次いでビーズをアレイ上に充填することができ、それにより本明細書に記載の方法で使用するユニバーサルアレイを形成できることが理解されるであろう。候補薬剤を、ビーズが固体支持体に充填される前または後に、ビーズに結合させることができる。先に述べたように、ビーズアレイに典型的に使用される固体支持体は、ビーズなしで使用することができる。例えば、核酸（プローブもしくはプライマーなど）または候補薬剤は、ウェルに直接結合させることができるか、またはウェル中のゲル物質に結合させることができる。したがって、上記参考文献は、本明細書に記載の方法および組成物における使用のために改変することができる物質、組成物または装置の実例である。

30

40

【0069】

したがって、本明細書に記載の方法で使用される固体支持体は、異種候補薬剤または異種核酸がアレイ中の異種ビーズに結合されているビーズアレイを含むことができる。この実施形態では、各ビーズを異種候補薬剤または核酸に結合させることができ、異種核酸を

50

固体支持体に効果的に結合させるために、ビーズを固体支持体上にランダムに分布させることができる。任意に、固体支持体は、単一ビーズまたは単一候補薬剤だけを収容する寸法を有するウェルを含むことができる。そのような構成では、ビーズは、ウェル内にビーズがはめ込まれることによって生じる力のために、ウェルに結合することがある。また、結合性化学物質または接着剤を使用して、ビーズをウェル内に保持することも可能である。

#### 【0070】

固体支持体は、複数の核酸または候補薬剤を含むことができるか、または固体支持体を本明細書に記載の方法により作製し、複数の核酸または候補薬剤を結合させることができる。例えば、固体支持体は、少なくとも10、100、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ もしくはそれ以上の異種核酸または候補薬剤を含み得る。その代わりに、またはそれに加えて、固体支持体は、最大で $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、100、10もしくはそれ以下の異種核酸または候補薬剤を含み得る。異種核酸または候補薬剤の各々は、例えば、候補薬剤の核酸成分が増幅されてクラスターを形成する場合、いくつかのコピーで存在し得ることが理解されるであろう。したがって、上記範囲は、固体支持体上の異種候補薬剤または核酸クラスターの数を表すことができる。また、上記範囲は、特定の核酸または候補薬剤に特有のものとして、本明細書に記載される異種タグ、または他の配列要素の数を表せることも理解されるであろう。その代わりに、またはそれに加えて、その範囲は、本明細書に記載の方法を用いて固体支持体上に作製された伸長核酸または修飾候補薬剤の数を表すことができる。

10

20

#### 【0071】

フィーチャーは、固体支持体を核酸または候補薬剤と接触させる前に、固体支持体上に存在し得る。例えば、核酸または候補薬剤がプライマーへのハイブリダイゼーションを介して支持体に結合する実施形態では、フィーチャーの外側の間質領域は実質的にいずれのプライマーも欠くのに対して、プライマーをフィーチャーに結合させることができる。核酸または候補薬剤を、固体支持体上の予め形成されたフィーチャーで捕捉することができ、場合によっては、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献33、特許文献34、または特許文献32に記載の方法を使用して固体支持体上で増幅させることができる。

#### 【0072】

いくつかの実施形態では、核酸タグおよび/または候補薬剤の固体支持体への結合の間または結合の後にフィーチャーが形成される。例えば、固体支持体はプライマーのローンを有していてもよく、そうでなければフィーチャーを欠いていてもよい。この場合、核酸または候補薬剤を固体支持体上に結合させることによってフィーチャーを形成することができる。任意に、得られたクラスターがフィーチャーとなるように、捕捉された核酸を固体支持体上で増幅することができる。結合は、プライマーと別の核酸の相補的部分との間の捕捉として上記で例示されているが、プライマー以外の捕捉成分は、予め形成されたフィーチャーにまたはローンとして存在し得ることが理解されるであろう。他の例示的な捕捉成分には、限定されないが、核酸もしくは候補薬剤と反応して共有結合を生成することができる化学成分、または核酸もしくは候補薬剤上のリガンドに非共有結合することができる受容体が挙げられる。

30

40

#### 【0073】

特定の実施形態では、核酸プライマーは固体支持体に結合することになる。結合した核酸タグを有する候補薬剤ライブラリーは、結合した核酸プライマーへの核酸タグのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。例えば、核酸タグはユニバーサルプライマー結合配列を含むことができ、核酸プライマーはユニバーサルプライマー配列を含むことができ、候補薬剤は、ユニバーサルプライマー結合配列のユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。ユニバーサルプライマーの代替として、固体支持体は、特定のタグ配列にハイブリダイズする標的特異的プライマーを含むことができる。

50

## 【0074】

フィーチャー当たり単一の候補薬剤のアレイは、候補薬剤の固体支持体への結合によって形成することができる。したがって、固体支持体上の1つ以上のフィーチャーは、それぞれが単一の候補薬剤（例えば、単一分子、単一細胞または他の単一単位体）を含むことができる。フィーチャーは、いくつかの実施形態では、特定のタイプの単一候補薬剤だけを収容するように構成され得る。しかし、フィーチャーが1つより多い候補薬剤を収容することができるか否かにかかわらず、フィーチャーはそれでもなお、単一候補薬剤だけ、b個だけの単一核酸タグ、または単一候補薬剤および単一核酸タグの両方だけを含んでよい。あるいは、個々のフィーチャーは、複数の候補薬剤および/または核酸タグを含むことができる。例えば、個々のフィーチャーは、互いに同じ配列を有する核酸分子の集合体および/またはタンパク質の集合体を含むことができる。特定の実施形態では、集合体は単一の核酸鋳型からの増幅によって生成され、例えば各フィーチャーに結合したクラスターとしてアンプリコンを生成する。

10

## 【0075】

本明細書に記載の方法は、任意の様々な増幅技法を使用することができる。使用され得る例示的な技法には、限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、多置換増幅（MDA）、またはランダムプライム増幅（RPA）が挙げられる。いくつかの実施形態では、増幅を溶液中で行うことができる。好ましくは、本開示の方法で使用される増幅技法は固相上で行われることになる。特に、固体支持体に結合し、核酸タグにハイブリダイズする1つ以上のプライマー種（例えば、核酸タグ中に存在する1つ以上のユニバーサルプライマー結合部位に対するユニバーサルプライマー）を、増幅技法で伸長することができる。固相PCRの実施態様を例にとると、増幅に使用されるプライマーの一方または両方を固体支持体に（例えばゲルを介して）結合させることができる。固体支持体に結合した2種のプライマーを利用する形式は、二本鎖アンプリコンが、コピーされた鋳型配列に隣接する2つの固体支持体結合プライマー間にブリッジ様構造を形成するため、ブリッジ増幅と称されることが多い。ブリッジ増幅に使用され得る例示的な試薬および条件は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献35、特許文献36、特許文献33、特許文献37、特許文献38、特許文献39、特許文献40または特許文献41に記載されている。固体支持体に結合した増幅プライマーの1つと、溶液中の第2プライマーを用いて、固相PCR増幅を行うこともできる。固体支持体結合プライマーと可溶性プライマーとの組合せを使用する例示的な形式は、エマルジョンPCRにおいて使用される形式であり、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献2、特許文献42、または特許文献43または特許文献44に記載の通りである。エマルジョンPCRはその形式の例証であり、本明細書に記載の方法の目的については、エマルジョンの使用は任意であり、実際にいくつかの実施形態ではエマルジョンを使用しないことが理解されるであろう。

20

30

## 【0076】

RCA技法を、本開示の方法での使用のために改変することができる。RCA反応に使用され得る例示的な成分およびRCAがアンプリコンを生成する原理は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献3および特許文献45に記載されている。RCAに使用されるプライマーは、溶液中に存在していてもよく、または固体支持体に結合していてもよい。プライマーは、本明細書に記載のユニバーサルプライマーのうちの1つ以上であり得る。

40

## 【0077】

MDA技法を、本開示の方法での使用のために改変することができる。MDAのいくつかの基本原理および有用な条件は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；特許文献46；特許文献47；特許文献48に記載されている。MDAに使用されるプライマーは、溶液中に存在していてもよく、または増幅部位で固体支持体に結合していてもよい。この場合も、プライマーは、本明細書に記載のユニバーサルプライマーのうちの1つ以上であり得る。

50

## 【0078】

特定の実施形態では、上に例示した増幅技法の組み合わせを使用することができる。例えば、RCAおよびMDAを組み合わせて使用することができ、ここでRCAを使用してコンカテマーアンプリコンを溶液中に生成する（例えば溶液相プライマーを使用して）。次いで、アンプリコンを、固体支持体に結合したプライマー（例えば、ユニバーサルプライマー）を用いるMDAの鋳型として使用することができる。この例では、RCAとMDAを組み合わせた工程の後に生成されるアンプリコンが固体支持体に結合することになる。

## 【0079】

本開示の方法は、候補薬剤アレイをスクリーニング剤または刺激剤と接触させる工程を含むことができる。アレイ中の1つ以上の候補薬剤は、場合によってはスクリーニング剤と反応してもよく、または刺激剤に反応してもよい。その結果、1つ以上の候補薬剤をヒット物質として分類することができる。

10

## 【0080】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、1つ以上の候補薬剤に結合することによって、または候補薬剤と候補薬剤に対する親和性を有する検体との間の結合を遮断することによって、アレイ中の1つ以上の候補薬剤と反応することになる。アレイを検出し、スクリーニング剤が結合しているフィーチャーを同定することができる。例えば、スクリーニング剤は、例えばスクリーニング剤上に存在する標識のために検出可能なシグナルを生成することができる。

## 【0081】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、候補薬剤が存在するアレイ上の1つ以上のフィーチャーを修飾することになる。例えば、スクリーニング剤は、候補薬剤、スクリーニング剤またはその両方を化学修飾することによって、候補薬剤と反応することができる。アレイを検出し、修飾が加えられたフィーチャーを同定することができる。特に、修飾は、例えば候補薬剤が存在するフィーチャーに結合している標識のために検出可能なシグナルを生成することができる。例示的な修飾には、以下が挙げられる：候補薬剤が存在するフィーチャーへの標識成分の付加；候補薬剤が存在するフィーチャーへの親和性成分の付加であって、親和性成分を標識に結合させること；候補薬剤が存在するフィーチャーにおける蛍光消光剤の除去であって、消光剤の除去により発光シグナルを生じさせること；候補物質が存在するフィーチャーへの蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）ドナーまたはアクセプター成分の添加であって、その添加でフィーチャーから放出される見掛けの発光波長を変化させること；候補薬剤が存在するフィーチャーからの標識成分の除去；候補薬剤が存在するフィーチャーからの親和性成分の除去であって、親和性成分を標識に結合させること；候補薬剤が存在するフィーチャーからの蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）ドナーまたはアクセプター成分の除去であって、その除去でフィーチャーから放出される見掛けの発光波長を変化させることなど。

20

30

## 【0082】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、アレイ中の1つ以上の候補薬剤と反応して検体を生成することになる。アレイを検出し、検体が生成されたフィーチャーを同定することができる。例えば、検体は、検出可能なシグナルを生成することができる。生成され得る例示的な検体には、発光標識、検出可能な受容体のリガンド、酵素により使用されて検出可能な生成物を生成する基質などが挙げられる。

40

## 【0083】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、候補薬剤のライブラリーと直接接触する必要はない。むしろ、捕捉剤をスクリーニング剤と接触させて捕捉生成物を生成し、次いで捕捉生成物を候補捕捉剤のコレクションと接触させることができる。別の実施形態では、捕捉剤を候補薬剤のコレクションと接触させて捕捉生成物を生成し、次いで捕捉生成物をスクリーニング剤と接触させることができる。捕捉生成物を使用する実施形態によって例示されるように、スクリーニング剤を候補薬剤について所望のもしくは推測される構造または機能を示すのに有用なものとするために、スクリーニング剤を候補薬剤と直接接

50

触させる必要はない。

【0084】

本明細書に記載の方法は、アレイをスクリーニング剤と接触させる間またはその後に、候補薬剤アレイを検出する工程をさらに含み、それによりアレイ中の少なくとも1つの候補薬剤がスクリーニング剤と反応することを判定することができる。アレイが結合される固体支持体は、本明細書に記載の任意の様々な状態であり得る。例えば、固体支持体は候補薬剤を、それに結合した核酸タグと共に含むことができる。あるいは、固体支持体は、核酸タグを含まなくてもよく、代わりに候補薬剤から核酸タグを除去した後の状態にある。核酸（例えば、タグおよび/または核酸ベースの候補薬剤）は、検出工程中は単一分子形態または集合体形態であり得る。さらなる実施形態では、固体支持体は候補薬剤を含まなくてもよく、代わりに候補薬剤を除去した後の状態にある。したがって、検出は、本明細書に記載の方法の任意の様々な時点で行うことができる。

10

【0085】

任意の様々なシグナルを、本明細書に記載のスクリーニング工程で検出することができ、例えば、放射線の吸光度、発光、発光寿命、発光偏光などの光シグナル；レーザおよび/またはミュー散乱；磁気特性；電気特性；電荷；質量；放射能などが挙げられる。本明細書に記載の方法で検出され得る例示的な標識には、限定されないが、フルオロフォア、発光団、発色団、ナノ粒子（例えば、金、銀、カーボンナノチューブ）、重原子、放射性同位元素、質量標識、電荷標識、スピン標識、受容体、リガンドなどが挙げられる。

20

【0086】

特定の実施形態は画像技術を使用する。当該技術分野で知られている検出装置を用いて画像を得ることができる。例としては、光、明視野、暗視野、位相コントラスト、蛍光、反射、干渉、または共焦点画像化用に構成された顕微鏡が挙げられる。特定の実施形態では、蛍光顕微鏡（例えば、共焦点蛍光顕微鏡）を用いて、例えば蛍光標識によって蛍光を発するスクリーニング剤（または他の検体）を検出することができる。蛍光標本はまた、Illumina社（サンディエゴ、カリフォルニア州）によって市販されているGenome Analyzer（登録商標）、MiSeq（登録商標）、NextSeq（登録商標）もしくはHiSeq（登録商標）プラットフォーム装置；またはLife Technologies（カールズバッド、カリフォルニア州）によって市販されているSOLiD（商標）配列決定プラットフォームなどの蛍光検出用の光学部品を有する核酸配列決定装置を用いて、画像化され得る。使用され得る他の結像光学系には、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献1、特許文献49、特許文献50または特許文献51；特許文献52、特許文献53、特許文献54、特許文献55または特許文献56、および特許文献57に記載の検出装置において見られるものが挙げられる。

30

【0087】

固体支持体の画像を所望の分解能で得て、例えば、固体支持体上のアレイ中の候補薬剤を識別することができる。したがって、分解能は、少なくとも0.5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$ 、1mmまたはそれ以上で離間したアレイのフィーチャーを識別するのに十分なものであり得る。その代わりに、またはそれに加えて、分解能は、最大で1mm、500  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$ 、0.5  $\mu\text{m}$ またはそれ以下で離間したアレイのフィーチャーを識別するように設定することができる。

40

【0088】

本開示の方法は、核酸タグを配列決定して、固体支持体（例えば、アレイ）上の候補薬剤に結合したタグ配列を決定する工程を含むことができる。多くの実施形態では、候補薬剤はアレイ中にランダムに配置され、配列決定反応は、異種候補薬剤の各々を特定する情報を提供する。配列決定は、候補薬剤およびその核酸タグが結合している固体支持体上で行うことができる。したがって、核酸タグは、その配列を決定するために固体支持体から除去される必要はない。場合によっては、核酸タグで配列決定反応を行う前に、候補薬剤を固体支持体から除去してもよい。

【0089】

50

いくつかの実施形態では、候補薬剤は核酸であるか、または候補薬剤をコードする核酸に結合している。そのような実施形態では、配列決定技術を用いて候補薬剤の配列を決定することができる。配列決定は、候補薬剤が結合している固体支持体上で行うことができる。候補薬剤およびその核酸タグを、一緒に配列決定する（例えば、連続配列決定読み取りにおいて）、または別々に配列決定することができる（例えば、タグの配列決定と候補薬剤の配列決定との間で非配列決定工程を実施することができる）。

#### 【0090】

本開示の方法は、時間ベースの検出または候補薬剤アレイの反応速度測定を採用することができる。したがって、アレイの検出は、複数の時点でアレイ上の個々のフィーチャーのうちの一つ以上についてシグナルを取得することを含むことができる。本明細書に記載の任意の様々なシグナルおよび標識は、時間ベースの分析または反応速度分析で検出することができる。

10

#### 【0091】

本開示の方法は、核酸タグを配列決定して、アレイ中の候補薬剤に結合したタグ配列を決定する工程を含むことができる。いくつかの実施形態では、候補薬剤は核酸であり、候補薬剤はそれが結合する核酸によってコードされる（例えば、mRNAまたはcDNAに結合したタンパク質候補薬剤）か、または候補薬剤は核酸を含有する（例えば、核酸を含有する細胞）。合成時配列決定（SBS）技法などの配列決定技法は、特に有用な方法である。

#### 【0092】

SBSは、以下のようにして行うことができる。第1SBSサイクルを開始するために、一つ以上の標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼ、SBSプライマーなどを、固体支持体上の一つ以上のフィーチャー（例えば、核酸が固体支持体に結合しているフィーチャー（単数または複数））と接触させることができる。SBSプライマー伸長が標識ヌクレオチドの組み込みをもたらしたフィーチャーを検出することができる。任意に、ヌクレオチドは、ヌクレオチドがSBSプライマーに添加された時点でさらなるプライマー伸長を終結させる可逆的終結成分を含むことができる。例えば、可逆的終結成分を有するヌクレオチド類似体をプライマーに添加し、非ブロック化剤が送達されてその成分を除去するまで、その後の伸長が起こらないようにすることができる。したがって、可逆的終結を使用する実施形態では、非ブロック化剤を固体支持体に送達することができる（検出が起こる前または後に）。様々な送達工程の間に洗浄を行うことができる。次いで、このサイクルをn回繰り返してプライマーをnヌクレオチド伸長させ、それにより長さnの配列を検出することができる。本開示の組成物、装置または方法での使用に容易に適用することができる例示的なSBS手順、流体システムおよび検出プラットフォームは、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献1、特許文献49、特許文献50または特許文献51；特許文献52、特許文献53、特許文献54、特許文献55または特許文献56、および特許文献57に記載されている。

20

30

#### 【0093】

パイロ配列決定などの、環状反応を使用する他の配列決定法を使用することができる。パイロ配列決定は、特定のヌクレオチドが新生核酸鎖に組み込まれる際の無機ピロリン酸（PPi）の放出を検出する（各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10；または特許文献24、特許文献25もしくは特許文献26）。パイロ配列決定では、放出されたPPiは、ATPスルフィラーゼによってアデノシン三リン酸（ATP）に直ちに交換されることによって検出することができ、生成されたATPのレベルはルシフェラーゼ産生光子を介して検出することができる。したがって、配列決定反応は、発光検出システムを介して観察することができる。蛍光ベースの検出システムに使用される励起放射線源は、必ずしもパイロ配列決定手順に必要ではない。パイロ配列決定を本開示の装置、組成物または方法に適用する際に使用され得る有用な流体システム、検出器および手順は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献58、特許文献59、特許文献60または特許文献61に記載されている。

40

#### 【0094】

50

ライゲーション時配列決定反応も有用であり、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献 1 1 ; または特許文献 6 2 もしくは特許文献 6 3 に記載のものが挙げられる。いくつかの実施形態は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献 1 2 ; 非特許文献 1 3 ; 非特許文献 1 4 ; または特許文献 6 4 に記載のようにハイブリダイゼーション時配列決定手順を含むことができる。ライゲーション時配列決定およびハイブリダイゼーション時配列決定手順の両方において、アレイの部位に存在する核酸は、オリゴヌクレオチド送達および検出の反復サイクルにかけられる。本明細書または本明細書で引用した参考文献に記載の組成物、装置または方法は、ライゲーション時配列決定またはハイブリダイゼーション時配列決定手順に容易に適合させることができる。典型的には、オリゴヌクレオチドを蛍光標識し、本明細書または本明細書で引用した参考文献のSBS手順に関して記載されたものと同様の蛍光検出器を用いて検出することができる。

10

**【 0 0 9 5 】**

いくつかの配列決定の実施形態は、DNAポリメラーゼ活性のリアルタイム観察を伴う方法を利用することができる。例えば、ヌクレオチド取り込みは、フルオロフォア担持ポリメラーゼと -リン酸標識ヌクレオチドとの間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 相互作用、またはゼロモード導波路 (ZMW) によって検出することができる。FRETベースの配列決定の技法および試薬は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献 1 5 ; 非特許文献 1 6 ; 非特許文献 1 7 に記載されている。

**【 0 0 9 6 】**

いくつかの配列決定の実施形態は、ヌクレオチドの伸長産物への組み込みの際に放出されるプロトンの検出を含む。例えば、放出されたプロトンの検出に基づく配列決定は、Ion Torrent (ギルフォード、コネチカット州、Thermo Fisher子会社) から市販されている電気検出器および関連技法、または各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献 2 7 ; 特許文献 2 8 ; 特許文献 2 9 ; もしくは特許文献 3 0 に記載の配列決定法およびシステムを使用することができる。

20

**【 0 0 9 7 】**

本開示の方法は、1つ以上の候補薬剤を固体支持体から除去する工程をさらに含むことができる。特定の実施形態では、フィーチャーの核酸タグを配列決定する前に、候補薬剤をアレイのフィーチャーから除去することができる。これは、候補薬剤が配列決定技法に干渉する場合、または配列決定技法で使用される試薬から候補薬剤を保護することが望ましい場合に有益であり得る。いくつかの実施形態では、スクリーニングにおいてヒット物質として同定された1つ以上の候補薬剤をアレイから選択的に除去することができる。

30

**【 0 0 9 8 】**

いくつかの実施形態では、候補薬剤は、それを固体支持体に結合させているテザーを切断することによって除去することができる。例えば、候補薬剤は、それが結合している核酸タグを介して固体支持体につながれていてもよい。タグ核酸が、相補的核酸へのハイブリダイゼーションによって支持体に結合する場合、ハイブリッド複合体を変性させることによって除去を達成することができる。あるいは、核酸タグは、候補薬剤への結合点とタグ配列との間に位置する切断部位を含むことができる。このように、候補薬剤を、切断部位を標的とする切断反応によってタグ配列から分離することができる。いくつかの方法では、増幅または修飾工程の間に、切断部位を核酸に導入することができる。例えば、切断部位を、伸長工程の間に伸長プライマーに導入することができる。

40

**【 0 0 9 9 】**

例示的な切断部位には、限定されないが、結合切断をもたらす化学的、酵素的または物理的過程を受け易い成分が挙げられる。例えば、その位置は、エンドヌクレアーゼによって認識されるヌクレオチド配列であり得る。適切なエンドヌクレアーゼおよびそれらの認識配列は、当該技術分野でよく知られており、多くの場合市販されている (例えば、New England Biolabs、ピバリー、マサチューセッツ州 ; ThermoFisher、ウォルサム、マサチューセッツ州またはSigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州から)。特に有用なエン

50

ドヌクレアーゼは、核酸中の結合部位に対して3'側の離れた部位で核酸鎖の結合を切断し、その例にはII型またはII型制限エンドヌクレアーゼが挙げられる。

#### 【0100】

光解離性成分は、有用な切断部位を提供する。例示的な光解離性成分には、限定されないが、(1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)エチル)エステル(すなわちDMNPE)および(1-(2-ニトロフェニル)エチル)エステル(すなわちNPE)が挙げられる。参照により本明細書に組み込まれる非特許文献18を参照。他の光解離性成分、ならびにその合成および使用のための方法は、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献49または特許文献65に記載されている。光解離性成分は、候補薬剤の個々のフィーチャーからの標的切断に有利に使用することができる。空間分解放射線(例えば、レーザー、集束光源および/または空間フィルタ/マスクからの)を使用して、特定の候補薬剤が光解離性成分を介して繋がれている個々のフィーチャーにアドレスすることができる。その結果、特定の候補薬剤を選択的に除去することができる(同じアレイ上の他のフィーチャーの候補薬剤と比較して)。

10

#### 【0101】

いくつかの実施形態では、切断部位は、脱塩基部位であるか、または脱塩基部位を作るために除去されやすい塩基を有するヌクレオチドである。脱塩基部位を形成するために除去されやすいヌクレオチドの例には、ウラシルおよび8-オキソ-グアニンが挙げられる。特定の実施形態では、New England Biolabsから入手可能なUSER(商標)試薬が使用される。核酸を切断するために使用され得る切断部位および方法の他の例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる特許文献66に記載されている。

20

#### 【0102】

本開示は、タンパク質アレイの作製方法をさらに提供する。本方法は、以下の工程を含むことができる:(a)固体支持体に結合したcDNA分子のライブラリーを提供する工程と;(b)固体支持体上のcDNA分子を増幅してクラスターを形成する工程であって、各クラスターがライブラリーからの特定のcDNA分子の複数のコピーを含む工程と;(c)クラスターの複数のコピーを転写し、クラスターの各々に結合した複数のmRNA分子を生成する工程と;(d)クラスターのmRNA分子を翻訳し、クラスターの各々に結合した複数のタンパク質を生成する工程。

#### 【0103】

この開示は、以下の工程を含むタンパク質アレイの作製方法も提供する:(a)mRNA分子のライブラリーを提供する工程であって、ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含んでいる工程、(b)ライブラリーから第1サブライブラリーを得る工程であって、第1サブライブラリーはタグ配列またはその相補体を有する核酸を含み、核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合している工程、(c)ライブラリーから第2サブライブラリーを得る工程であって、第2サブライブラリーは標的配列およびタグ配列またはその相補体を有する核酸を含んでいる工程、(d)第2サブライブラリーを第1サブライブラリーと接触させ、それにより第2サブライブラリーの核酸を、タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合させる工程と;(e)固体支持体上の標的配列を翻訳し、個々のフィーチャーに結合したタンパク質のアレイを作製する工程。

30

40

#### 【0104】

ゲノムDNA(gDNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)またはコピーDNA(cDNA)分子のライブラリーは、1つ以上の目的のタンパク質を発現する1つ以上の生物体由来し得る。例えば、所望のタンパク質または所望の活性を有するタンパク質を発現することが推測される生物体からライブラリーを得ることができる。本明細書に記載のもののような当該技術分野で知られている任意の生物体を使用することができる。この生物体は、工業的、治療的、診断的または予後的関心のものであり得る。例えば、ライブラリーは人体から得ることができ、予後または診断目的のためにスクリーニングすることができる。あるいは、生物体は、治療効果をもたらす遺伝子または工業的用途を有する遺伝子を発現すると推測され

50

るものであってもよい。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、非ヒト生物体から得られるか、そうでなければ非ヒト起源である。

【0105】

いくつかの用途では、gDNA、mRNAまたはcDNA分子のライブラリーは、組み換え生物体のライブラリーで発現される単一遺伝子の変異体を含む。そのような変異体は、限定されないうが、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献19および非特許文献20に記載のものが挙げられる既知のタンパク質工学技法を用いて作製することができる。例えば、変異体を、遺伝子の全部または一部のランダム突然変異誘発によって生成することができる。セミランダム突然変異誘発技法も使用することができる。

【0106】

本明細書に記載の方法において発現される遺伝子（例えば、mRNA、cDNAまたはタンパク質として）は、抗体、酵素、受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、核内ホルモン受容体、ヒストン修飾酵素および本明細書で例示される他のものからなる群より選択され得る。遺伝子は組み換え体であってよく、例えば、遺伝子の天然の供給源とは異なる生物体において発現されるか、または遺伝子にとって天然ではない修飾を有する。特定の実施形態では、gDNA、mRNA、cDNAまたはタンパク質ライブラリーは、クローニングまたは発現用に一般的に使用される細菌、酵母、昆虫、哺乳動物または他の細胞系から単離することができる。

【0107】

ライブラリーのそれぞれ個々の成員がタンパク質コード配列およびタグ配列を含むように、異種核酸（例えば、gDNA、mRNAまたはcDNA）のライブラリーを構築することができる。タグ配列を、各タンパク質コード配列にランダムにまたは系統的に割り当てる（すなわち、既知タグが既知変異体とa prioriに関連している）ことができる。一例として、タンパク質もコードすることになる核酸構築物を合成する際に、ランダムヌクレオチドをタグ領域の1つ以上の位置に組み込むことによって、タグをランダムに割り当てることできる。別の例では、平均して各タンパク質コード核酸が特有のタグ配列にライゲーションするように、異種核酸タグの集団を異種タンパク質コード核酸の集団にランダムにライゲーションさせることができる。系統的なタグ付けの例として、特定のタグの核酸構築物への合成は、それが構築物中にあるタンパク質コード配列中の突然変異または変異体とa prioriに相関するような方法で行うことができる。

【0108】

本明細書に記載の方法は、ライブラリーから第1および第2サブライブラリーを得る工程を含むことができる。いくつかの実施形態では、サブライブラリーは、ライブラリーから画分を除去することによって、またはライブラリーを物理的に分割することによって得られる。一般に、ライブラリーは、各候補薬剤の複数のコピーを含む液体であろう。gDNA、mRNA、cDNA、大環状分子、環状ペプチド、融合分子（例えば、核酸-タンパク質融合）、提示構築物（例えば、フェージ上のペプチド）またはタンパク質などの、任意の様々な候補薬剤を使用することができる。したがって、流体を分画または分割することによって得られるサブライブラリーは、ほぼ同じ内容物を有すると予想される。場合によっては、複数のコピーを作製するために、増幅工程を核酸ライブラリー（例えば、DNAまたはRNAライブラリー）で実施することができる。

【0109】

gDNA、mRNA、cDNAまたはタンパク質ライブラリーを、本明細書の他の箇所に記載の方法を用いて固体支持体に結合させることができる。特定の実施形態では、mRNA分子ライブラリーが使用され、ここでmRNA分子の各々は、候補薬剤をタグ配列と共にコードする配列を含む。第1サブライブラリーは、ライブラリーのmRNA分子を固体支持体と接触させてmRNA分子を固体支持体に結合させることを含む方法によって得られる。例えば、固体支持体は、固体支持体に結合した核酸プライマーを有することができ、mRNA分子は、核酸プライマーとのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。より具体的な例として、mRNA分子はユニバーサルプライマー結合配列を含むことができ、核酸プライ

10

20

30

40

50

マーはユニバーサルプライマー配列を含み、mRNA分子はユニバーサルプライマー結合配列のユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。次いで、結合したmRNA分子を固体支持体上でコピーまたは増幅し、タグ配列の相補体を生成することができる。次いで、第1サブライブラリーと同じライブラリーに由来する第2サブライブラリーを、第1サブライブラリーのアンプリコン（またはコピー）と接触させ、それにより第2サブライブラリーの核酸を、タグ配列とその相補体のハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合させることができる。このようにして、固体支持体を、スクリーニング反応または翻訳に利用可能なmRNA分子のライブラリーを含むように改変し、第2サブライブラリーのmRNA分子によって発現されるタンパク質のライブラリーを生成する。

10

**【0110】**

いくつかの実施形態では、第1核酸または第2核酸サブライブラリーの1つを、溶液中でコピーまたは増幅することができる。このようにして増幅またはコピーされたサブライブラリーは、他のサブライブラリーのタグ配列にハイブリダイズすることができる相補的タグ配列を含むことになる。サブライブラリーのいずれかを固体支持体に結合させることができ、他方のサブライブラリーをハイブリダイズさせ、スクリーニング反応、mRNAを産生する転写反応および/またはタンパク質ライブラリーを生成する翻訳反応に利用可能な核酸分子ライブラリーを有する固体支持体を作製することができる。

**【0111】**

mRNAライブラリーを利用する実施形態では、ライブラリー中の個々のmRNA分子の一部または全部を逆転写してcDNAを生成することを含む方法によって、第1サブライブラリーを得ることができる。逆転写は、溶液中または固体支持体上で起こり得る。次いで、得られたcDNA分子を溶液中または固体支持体上で増幅することができる。したがって、ライブラリー中に存在するタグ配列の相補体を有するcDNA分子を生成することができる。場合によっては、cDNA分子は、mRNA分子の一部分だけ、例えば、マルチドメインタンパク質の特定のドメインまたはドメインのサブセットを発現する部分だけを含むことができる。

20

**【0112】**

本発明の方法は、cDNAをmRNAに転写する工程を含むことができる。転写は、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献19および非特許文献20の文献に記載のような既知のカクテル、または市販されているカクテルを使用して行うことができる。特定の  
実施形態では、転写は、支持体に結合したcDNA分子上で行われる。転写反応のmRNA産物は、それらが生成されるフィーチャーに結合することができる。例えば、本明細書の実施例2に記載の技法を用いて結合を達成することができる。また、タンパク質を、それらをコードするDNA分子に結合させること（例えば、直接結合またはエマルジョン液滴中の共局在化によって）も有用であり得る。タンパク質は、それらをコードするDNA分子に近接して結合させることもできる（例えば、核酸プログラム型タンパク質アレイ（NAPPA））。

30

**【0113】**

本発明の方法は、mRNAをタンパク質に翻訳する工程を含むことができる。翻訳は、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献19および非特許文献20に記載のような既知のカクテル、または市販されているカクテルを使用して行うことができる。特定の  
実施形態では、翻訳は、支持体に結合したmRNA分子上で行われる。翻訳反応のタンパク質産物は、それらが生成されるフィーチャーに結合することができる。例えば、本明細書の実施例2に記載の技法を用いて結合を達成することができる。

40

**【0114】**

本明細書に記載のタンパク質アレイの作製方法を、タンパク質のスクリーニング方法に使用することができる。本方法は、以下の工程を含むことができる：(i) タンパク質アレイを作製する工程と；(ii) タンパク質アレイをスクリーニング剤と接触させる工程であって、アレイ中の1つ以上のタンパク質がスクリーニング剤（または刺激剤）と反応する工程と；(iii) スクリーニング剤（または刺激剤）との接触の間または接触の後にタンパク質アレイを検出し、それによりアレイ中の少なくとも1つのタンパク質がスクリー

50

ニング剤（または刺激剤）と反応することを判定する工程。

【0115】

特定の実施形態では、スクリーニング剤は、1つ以上のタンパク質に結合することによって、またはタンパク質とタンパク質に対する親和性を持つ検体間の結合を遮断することによって、1つ以上のタンパク質と反応する。アレイの検出は、1つ以上のタンパク質に結合しているスクリーニング剤を検出することを含むことができる。例えば、スクリーニング剤は発光性であってもよく、アレイ上の発光を検出することによって検出を行うことができる。

【0116】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、1つ以上のタンパク質を化学修飾することによって、1つ以上のタンパク質と反応する。この場合、アレイの検出は、1つ以上の修飾されたタンパク質を検出することによって達成することができる。例えば、1つ以上の修飾されたタンパク質は発光性であってもよく、アレイ上の発光を検出することによって検出を達成することができる。

10

【0117】

いくつかの実施形態では、スクリーニング剤は、検体生成物を生成することによって、1つ以上のタンパク質と反応する。この場合、アレイの検出は、検体生成物を検出することを含む。例えば、検体生成物は発光性であってもよく、アレイ上の発光を検出することによって検出を実施することができる。

【0118】

本明細書において先に記載したように、アレイの検出は、複数の時点でアレイ上の個々のフィーチャーのうちの1つ以上についてシグナルを取得することを含むことができる。

20

【0119】

gDNA、cDNAまたはmRNA分子の一部であるタグ配列は、本明細書に記載の方法または当該技術分野で知られている方法を用いて配列決定することができる。例えば、配列決定反応は、スクリーニングが実施されているか、実施されたか、または実施される予定の固体支持体上で実施することができる。したがって、本明細書に記載の方法は、固体支持体上のタグ配列またはその相補体を配列決定し、それにより固体支持体上の個々のフィーチャーでのタグ配列またはその相補体の位置を決定する工程を含むことができる。そのような方法は、少なくとも1つのタンパク質に結合したタグ配列に基づいて、スクリーニング剤と反応するアレイ中の少なくとも1つのタンパク質を同定する工程をさらに含むことができる。

30

【0120】

本明細書に記載の方法は、固体支持体上の候補gDNA、cDNAまたはmRNAを配列決定する工程をさらに含むことができる。したがって、1つ以上の配列決定反応を固体支持体上で行い、タグ配列の同一性および/または候補配列の同一性を決定し、それにより固体支持体上の個々のフィーチャーでの所望の候補薬剤の位置を決定することができる。

【0121】

場合によっては、gDNA、cDNAまたはmRNAは、配列決定法の平均読み取り長より長くてもよい。そのような場合、候補核酸を複数の配列決定操作にかけ、それぞれで異種プライマーを用いることができる。例えば、第1配列決定操作は、本明細書に記載の配列決定方法論およびプラットフォームまたは本明細書に組み込まれる参考文献において一般的に使用されるユニバーサルプライミング配列にハイブリダイズするプライマーを使用することができる。第1配列決定プライマーがハイブリダイズした位置の下流にハイブリダイズする第2配列決定プライマーを用いて、次の配列決定操作を行うことができる。鋳型核酸の重複するまたは隣接する読み取りを得られるように、プライマーを、配列決定操作の予想される読み取り長に従って配置することができる。候補核酸の所望の領域（単数または複数）をカバーするのに十分な数の配列決定プライマーについて、複数の配列決定操作を繰り返すことができる。

40

【0122】

50

候補核酸が、配列決定法の平均読み取り長よりも長い場合の別の選択肢は、カセット手法を使用することである。カセット手法では、核酸の小さな領域またはドメインが、候補核酸において突然変異または修飾される。カセットは、1回の配列決定操作で読み込むのに十分短いように選択することができる。カセットの上流にある候補核酸の領域がライブラリーの全成員において均一である限り、それはユニバーサルプライミング部位としての役割を効果的に果たし、配列決定プライマーは、カセットでの局在配列決定のために、この領域にハイブリダイズすることができる。

【0123】

いくつかの実施形態では、候補gDNA、cDNAまたはmRNAを配列決定する必要はない。むしろ、タグの配列決定が候補核酸を同定するのに十分であるように、タグ配列は既知候補核酸配列とa prioriに関連付けられていてもよい。候補核酸と、それがコードするタンパク質と、またはタンパク質の特性とを同定するために、特定のフィーチャーに存在するタグのa prioriな知識を、スクリーニング工程においてフィーチャーから観察されるシグナルと関連させることができる。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、候補核酸（例えば、gDNA、cDNAまたはmRNA）またはタンパク質は、それを固体支持体に結合させるテザーを切断することによって除去することができる。例えば、そのような候補薬剤は、タグ配列を介して固体支持体に繋がれてもよい。切断部位は、候補薬剤への結合点とタグ配列との間に位置することができる。このように、候補薬剤を、切断部位を標的とする切断反応によってタグ配列から分離することができる。

20

【0125】

したがって、本開示の方法は、アレイの1つ以上のフィーチャーに結合したgDNA、cDNA、mRNAまたはタンパク質分子を選択的に除去する工程を含むことができる。選択的除去には、例えば、本明細書の他の場所に記載の試薬および方法を使用した、分子をフィーチャーに結合させる光解離性結合の光媒介性切断を挙げることができる。

【0126】

本開示は、(a) 固体支持体と；(b) 固体支持体に結合した異種cDNA分子のライブラリーであって、各異種cDNA分子が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、各フィーチャーが特定のcDNA分子の複数のコピーを含むライブラリーと；(c) cDNA分子に結合したmRNA分子であって、cDNA分子の各々が、それぞれの結合したmRNA分子に相補的であるmRNA分子と；(d) mRNA分子に結合したタンパク質分子であって、タンパク質分子の各々が、それぞれの結合したmRNA分子によってコードされるタンパク質分子を含むアレイを提供する。

30

【0127】

本開示は、(a) mRNA分子のライブラリーであって、ライブラリー中の個々のmRNA分子が標的配列およびタグ配列を含むライブラリーと、(b) タグ配列の相補体を有する核酸を含む固体支持体を含み、核酸が固体支持体上の個々のフィーチャーに結合しており、個々のmRNA分子のタグ配列が、固体支持体上の個々のフィーチャーのそれぞれの相補的タグ配列にハイブリダイズし、mRNA分子の翻訳によって得られるタンパク質が、それぞれのmRNA分子に結合するアレイをさらに提供する。

40

【0128】

本開示のアレイは、本明細書に記載の方法の1つ以上の工程から生じる成分を含むことができる。例えば、例えばgDNA、cDNAまたはmRNA種などの核酸は、本明細書に記載の方法に従って固体支持体に結合させることができる。同様に、タンパク質は、本明細書に記載の方法に従って固体支持体に結合させることができる。特定の実施形態では、実施例2および3に記載のように、cDNAを固体支持体に結合させ、コードされたmRNAをcDNAに結合させ、コードされたタンパク質をmRNAに結合させることができる。これらの実施例に記載のように、cDNAを介する結合は任意であり、代わりにmRNAを固体支持体に結合させることが

50

でき（例えば、相補的タグへのハイブリダイゼーションまたは他の結合方法を介して）、コードされたタンパク質をmRNAに結合させることができる。

【0129】

任意に、mRNA分子を、それをコードするcDNA分子に、RNAポリメラーゼで形成された複合体を介して結合させることができる。結合は、複合体化されたcDNA、mRNAおよびRNAポリメラーゼ間の共有結合架橋によって媒介され得る。同様に、タンパク質分子は、それをコードするmRNAに、リボソームと形成された複合体を介して結合させることができる。結合は、複合体化されたmRNA、タンパク質およびリボソーム間の共有結合架橋によって媒介され得る。

【0130】

10

本明細書に記載のスクリーニング工程の任意の様々なスクリーニング剤、標識または生成物が、本開示のアレイに存在し得る。例えば、タンパク質があるフィーチャーは、任意に、発光分子（スクリーニング剤など）のタンパク質への特異的な非共有結合を介して、またはタンパク質に共有結合した発光成分を介して、発光標識することができる。全てのフィーチャーが必ずしも標識されるわけではない。むしろ、所望の活性または選択された活性を有するタンパク質を含有するフィーチャーのサブセットを選択的に標識し、他のフィーチャーは標識しないことができる。例えば、ライブラリーの内容物およびスクリーニングの性質に応じて、フィーチャーの50%、25%、10%、5%または1%未満を標識してもよい。

【0131】

20

本明細書に記載の任意の様々な候補薬剤および/または核酸タグが、本開示のアレイに存在し得る。アレイ上の異なる種の数、アレイ上の種を含有するフィーチャーの密度、または特定のフィーチャーに結合するそれぞれの種数は、アレイの作製方法および使用方法に関して本明細書に記載される範囲内であり得る。

【0132】

この開示によって、細胞のスクリーニング方法も提供される。本方法は、以下の工程を含むことができる：(a) 複数の異種細胞を提供する工程であって、異種細胞の各々がタグ配列を有する核酸タグを含んでいる工程と；(b) 異種細胞の混合物を固体支持体と接触させ、固体支持体に結合した細胞のアレイを形成する工程と；(c) 固体支持体上の細胞のアレイを、少なくとも1つの光学特性についてスクリーニングする工程であって、スクリーニング反応が、固体支持体に結合した個々の細胞を検出することを含む工程と；(d) 固体支持体に結合した核酸タグのタグ配列を配列決定する工程と；(e) アレイ中の少なくとも1つの細胞を候補細胞として、候補細胞の光学特性およびタグ配列に基づいて同定する工程。

30

【0133】

特定の実施形態では、細胞は、候補薬剤として本明細書に記載の方法で使用される。細胞は、多細胞生物体から単離された天然細胞、単細胞生物体を含む天然細胞、多細胞生物体由来の遺伝子操作された細胞または遺伝子操作された単細胞生物体であり得る。本明細書に記載の方法または組成物で使用される細胞は、天然の供給源から得ることができ、またはそれらはex vivo培養物から得ることができる。

40

【0134】

Ex vivoでコピー、培養または増殖させることができる細胞は、特に有用である。例えば、スクリーニング工程の前または後に候補細胞の1つ以上のコピーを作製することは有用であり得る。したがって、スクリーニングにおいてヒット物質として同定された細胞（または細胞のクローン）を、事前に作られたストックまたはスクリーニングで使用される固体支持体から単離することができる。単離された細胞をさらに使用もしくは操作して、例えば、細胞をさらに十分に特性評価することができ、または治療手段において細胞を使用することができる。

【0135】

遺伝子組み換え細胞を使用する実施形態では、遺伝子組み換えは、例えば、以下をもた

50

らすものを含む当該技術分野で知られている任意の様々なものであり得る：非天然組み換えタンパク質の発現、突然変異組み換えタンパク質の発現、天然に存在するタンパク質のコード配列の全部または一部の欠失、天然に存在するタンパク質の発現の阻害、天然に存在するタンパク質の発現の増強、非天然検体の生成または天然検体の生成の阻害。例えば、候補細胞ライブラリー中の1つ以上の遺伝子のコード配列は、点突然変異、欠失（例えば、タンパク質コード配列全体、タンパク質のドメインもしくは他の部分の除去）、または挿入（例えば、キメラ）を含有し得る。

【0136】

ライブラリー中にある候補細胞は、核酸タグを含むことができる。細胞をタグ付けするいくつかの例示的な方法は、実施例4および/または以下に記載されている。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、核酸タグを細胞の表面に共有結合させることができる。一般に、ライブラリー中の各細胞を単一核酸タグ配列のみでタグ付けする方法が採用される（とはいえ、同じタグ配列のコピーをそれぞれ有する複数の核酸分子が各細胞内または各細胞上に存在し得る）。例えば、各細胞が核酸タグ分子と個々に反応できるように、細胞を物理的に単離することができる。物理的に細胞を分離する方法には、例えば、個々の容器、マイクロプレート上のウェル、アレイ上のフィーチャー、ビーズ、液滴アクチュエータ装置内の流体小滴、エマルジョン中の流体小滴、または小胞への各細胞の分離が挙げられる。

【0138】

核酸タグが送達され得る液滴を作製するのに特に有用な方法には、例えば、RainDance Technologies（ビルリカ、マサチューセッツ州）によって市販されているもの、または各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献67もしくは特許文献68に記載のものが挙げられる。液滴の作製および液滴へのタグの添加のさらなる方法は、10X Genomicsによって市販されているか、または各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献69；特許文献70；特許文献71または特許文献72に記載されている。これらの方法を改変し、細胞（または本明細書に記載の他の候補薬剤）が個々の液滴に充填され、充填された液滴が核酸タグを含有する流体と相互作用し、個々の液滴が単一タグ核酸種および単一候補薬剤種で終わるようにすることができる。当然ながら、核酸種の複数のコピーまたは候補薬剤種の複数のコピーが個々の液滴中に存在することができる。いくつかの実施形態では、核酸タグは、個々の液滴に送達されるビーズに結合する。核酸タグは、例えば実施例4に記載の結合性化学物質を用いて細胞の表面に結合することができる。

20

30

【0139】

細胞（または他の候補薬剤）を分離するために、例えば細胞をタグ付けするために使用され得る特に有用な液滴操作装置は、例えば以下に記載の液滴アクチュエータである：特許文献73、2005年6月28日に登録された、「エレクトロウエットティングベースの技術により液滴を操作するための装置」という名称の特許文献74；Pamulaらによる、2006年8月31日に公開された「プリント回路基板上で液滴を操作するための装置および方法」という名称の特許文献75；Pollackらによる、2007年10月25日に公開された「液滴ベースの生化学」という名称の特許文献76；Shenderovによる、2004年8月10日に登録された「マイクロ流体用の静電アクチュエータおよびその使用方法」という名称の特許文献77；Shenderovによる、2003年5月20日に登録された「マイクロ流体用の可動部品のないアクチュエータ」という名称の特許文献78；Kimらによる、2003年11月6日に公開された「エレクトロウエットティング駆動マイクロポンピング」という名称の特許文献79；Kimらによる、2006年7月27日に公開された「ノズルからの液滴の完全な移動を促進するための方法および装置」という名称の特許文献80；Kimらによる、2007年2月1日に公開された「プリント回路基板上での小物移動」という名称の特許文献81；Shahらによる、2009年11月19日に公開された「液滴マイクロ流体における磁性粒子の使用法」という名称の特許文献82；Kimらによる、2010年4月22日に公開された「チップ上の液滴の電気的操作のリアルタイムフィードバック制御のための方法および装置」という名称の特許文献83；Velev

40

50

による、2009年6月16日に登録された「流体表面を有する液滴輸送装置および方法」という名称の特許文献84；Sterlingらによる、2007年1月16日に登録された「エレクトロウエッティングによる、化学的、生化学的および生物学的アッセイなどのためのマイクロ流体制御用の方法、装置および品物」という名称の特許文献85；Beckerらによる、2010年1月5日に登録された「プログラム可能な流体処理のための方法および装置」という名称の特許文献86；Beckerらによる、2005年12月20日に登録された「プログラム可能な流体処理のための方法および装置」という名称の特許文献87；Decreらによる、2008年2月12日に登録された「流体の操作のためのシステム」という名称の特許文献88；Yamakawaらによる、2006年2月23日に公開された「化学分析装置」という名称の特許文献89；Wuによる、2011年3月3日に公開された「熱交換化学プロセスのためのデジタルマイクロ流体ベースの装置」という名称の特許文献90；Fouilletらによる、2009年7月30日に公開された「電極アドレス指定方法」という名称の特許文献91；Fouilletらによる、2006年5月30日に登録された「静電気力による微小懸垂線に沿った微小液体容積の移動のための装置」という名称の特許文献92；Marchandらによる、2008年5月29日に公開された「液滴マイクロリアクター」という名称の特許文献93；Adachiらによる、2009年12月31日に公開された「液体移送装置」という名称の特許文献94；Rouxらによる、2005年8月18日に公開された「2つまたは複数の固体基質間での液滴の移動を制御するための装置」という名称の特許文献95；ならびに非特許文献21、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

**【0140】**

特定の実施形態では、ライブラリー中の細胞を、核酸タグを含むように遺伝子組み換えすることができる。例えば、集団中の個々の細胞は、タグ配列をコードするプラスミドを保持することができるか、または個々の細胞のゲノムは、タグ配列を含むように改変することができる。場合によっては、タグ配列は、本明細書に記載の方法でスクリーニングされる遺伝的変異体も含む核酸構築物中にコードされる。

**【0141】**

それぞれ個々の細胞がランダムに割り当てられたタグ配列を獲得するように、または各細胞を改変して既知タグ配列を含むようにすることができるように、異種細胞のライブラリーを構築することができる。例えば、ランダムなタグ付けは、スクリーニングされる遺伝的変異体もコードすることになる核酸構築物を合成する際に、ランダムなヌクレオチドをタグ領域の1つ以上の位置に組み込むことによって行うことができる。別の例では、平均して各変異体核酸が特有のタグ配列にライゲーションするように、異種核酸タグの集団を異種変異体コード核酸の集団にランダムにライゲーションさせることができる。次いで、構築物をライブラリー中の細胞に加えることができる。同様に、平均して各細胞が特有のタグ配列に結合するように、異種核酸タグの集団を異種細胞の集団に共有結合させることができる。

30

**【0142】**

他の実施形態では、それぞれ個々の細胞が、既知細胞とa prioriに関連する既知タグを取得するように、異種細胞のライブラリーを構築することができる。A prioriなタグ付けの例として、特定のタグの核酸構築物への合成は、それが上記構築物中の突然変異または変異体と相関するような方法で行うことができる。いくつかの実施形態では、細胞は互いに物理的に分離されており、既知タグ配列を有する核酸を細胞と接触させ、単一タイプのタグの単一細胞との共有結合を形成する。

40

**【0143】**

特定の実施形態では、核酸タグをビーズに結合させることができ、ビーズを細胞に結合させることができる。任意に、ビーズを、特異的結合親和性を有する抗体または細胞に結合させることができる。しかし、他の結合様式を使用してビーズを細胞に結合させることができ、例えば、核酸を候補薬剤または固体支持体に結合させるという文脈において本明細書で例示されるものが挙げられる。

**【0144】**

50

いくつかの実施形態では、核酸タグは、細胞の原形質膜脂質または脂肪酸への核酸タグの共有結合によって、細胞に結合することができる。あるいは、核酸タグは、細胞の原形質膜脂質中のタンパク質への共有結合によって、細胞に結合することができる。共有結合の代替として、核酸タグは、細胞表面上のリガンドに結合する受容体を含むことができ、または核酸タグは、細胞表面上の受容体に結合するリガンドを含むことができる。例示的な結合方法を、以下の実施例 4 に記載する。

#### 【0145】

細胞ライブラリーを、他のタイプの候補薬剤を固体支持体に結合させるための本明細書に記載の方法の1つ以上を用いて、アレイに結合させることができる。例えば、固体支持体は、核酸プライマーを含むことができ、細胞は、核酸タグの核酸プライマーへのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。場合によっては、核酸タグはユニバーサルプライマー結合配列を含むことができ、核酸プライマーはユニバーサルプライマー配列を含むことができ、候補薬剤は、ユニバーサルプライマー結合配列のユニバーサルプライマー配列へのハイブリダイゼーションを介して固体支持体に結合することができる。

10

#### 【0146】

本開示の方法は、核酸タグなどの核酸がハイブリダイズされる固体支持体に結合したプライマーを伸長させる工程を含むことができる。得られた伸長プライマーは、タグ配列および核酸由来の他の配列（相補的形態であるが）を含むことになる。したがって、伸長プライマーは、候補薬剤からの核酸の空間的にタグ付けされたバージョンである。核酸中に存在するタグ配列以外の配列要素も、伸長プライマーに含めることができることが理解されるであろう。そのような要素には、例えば、プライマー結合部位、切断部位、他のタグ配列（例えば、試料識別タグ）、捕獲配列、核酸結合タンパク質または核酸酵素の認識部位などが挙げられる。

20

#### 【0147】

プライマーの伸長は、本明細書で例示される方法か、そうでなければ核酸の増幅または核酸の配列決定について当該技術分野で知られている方法を用いて実施することができる。特定の実施形態では、1つ以上のヌクレオチドを、プライマーの3'末端に、例えばポリメラーゼ触媒作用（例えばDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）を介して付加することができる。化学的または酵素的方法を使用して、1つ以上のヌクレオチドをプライマーの3'もしくは5'末端に付加することができる。1つ以上のオリゴヌクレオチドを、プライマーの3'もしくは5'末端に、例えば化学的または酵素的（例えば、リガーゼ触媒作用）方法を介して付加することができる。プライマーは鑄型指向様式で伸長ことができ、それにより伸長産物は、プライマーにハイブリダイズする鑄型核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、RNA鑄型を用いる逆転写酵素によってDNAプライマーを伸長させ、それによりcDNAを生成する。したがって、本明細書に記載の方法で作製された伸長プローブは、逆転写DNA分子であり得る。核酸を伸長するための例示的な方法は、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献 96 または特許文献 97 または特許文献 98 に記載されている。

30

#### 【0148】

プライマーにハイブリダイズした核酸の全部または一部は、伸長によってコピーすることができる。例えば、伸長プローブは、少なくとも1、2、5、10、25、50、100、200、500、1000またはそれ以上の核酸からコピーされたヌクレオチドを含むことができる。伸長産物の長さは、例えば、伸長反応において可逆的に終結するヌクレオチドを使用し、限られた数の伸長サイクルを実行することによって制御することができる。そのサイクルは、SB S技法で例示されるように実行することができ、標識ヌクレオチドの使用は必要ではない。したがって、本明細書に記載の方法で生成された伸長プライマーは、1000、500、200、100、50、25、10、5、2または1以下の核酸からコピーされたヌクレオチドを含むことができる。当然ながら、伸長プローブは、上記の範囲内または範囲外のいずれの長さでもあり得る。

40

50

## 【0149】

アレイに結合した細胞ライブラリーは、他の候補薬剤のスクリーニングに関して本明細書に記載の方法を用いてスクリーニングすることができる。特定の実施形態では、細胞アレイのスクリーニングは、細胞をスクリーニング剤で処理する工程を含むことができる。その結果、スクリーニング剤は、アレイ上の少なくとも1つの候補細胞に結合し得る。任意に、スクリーニング剤は発光性であり、スクリーニング反応は、少なくとも1つの候補細胞の発光を検出することによって実施されることになる。

## 【0150】

いくつかの実施形態では、アレイに送達されるスクリーニング剤は、アレイ中の少なくとも1つの候補細胞を改変することになる。例えば、スクリーニング剤は、アレイ上の少なくとも1つの候補細胞を刺激し得る。あるいは、スクリーニング剤は、アレイ上の少なくとも1つの候補細胞を阻害または殺傷さえし得る。

10

## 【0151】

細胞アレイと接触するスクリーニング剤は、少なくとも1つの候補細胞の発光を増減させてもよく、スクリーニング反応は、少なくとも1つの候補細胞の発光を検出する工程を含むことができる。

## 【0152】

本明細書の他の箇所に記載されているように、検出工程は、反応速度測定または時間ベースの測定を含むことができる。例えば、細胞アレイの検出は、複数の時点でアレイ上の個々のフィーチャーのうちの1つ以上についてシグナルを取得する工程を含むことができる。

20

## 【0153】

細胞に結合しているか、または細胞中に存在する核酸タグは、本明細書に記載の方法で配列決定することができる。細胞に結合している核酸は、細胞上で配列決定することができる。あるいは、例えば、実施例4に例示されているもののようなプライマー伸長法を介して、核酸を固体支持体に移すことができ、タグ配列（またはその相補体）を含有する伸長プライマーの領域は、固体支持体上で配列決定することができる。本明細書の他の箇所に記載の固体支持体に結合した核酸の配列決定方法を、細胞に結合する核酸タグまたは核酸タグが由来する細胞に近接したフィーチャーに結合する核酸タグに使用することができる。

30

## 【0154】

場合によっては、核酸タグ（またはタグのコピー）を固体支持体に結合させたままで、細胞を固体支持体から除去することが望ましい場合がある。その後、タグ配列を、細胞の非存在下で配列決定することができる。

## 【0155】

核酸タグが細胞内に存在する実施形態では、アレイの表面上で細胞を溶解し、細胞内容物の放出および核酸タグの局在捕捉をもたらすことができる。核酸タグは、固体支持体上のプライマーに相補的なユニバーサル配列領域を含むことができる。したがって、核酸タグを、増幅および/または配列決定に適した形式で固体支持体上に捕捉することができる。固体支持体上に捕捉された核酸は、任意に増幅することができる。固体支持体上に捕捉された核酸またはそれから生成されたアンプリコンは、本明細書に記載の方法を用いて固体支持体上で配列決定することができる。

40

## 【0156】

本開示の方法は、1つ以上の細胞をアレイから除去する工程を含むことができる。例えば、スクリーニング工程でヒット物質として同定された1つ以上の細胞を選択的に除去することができる。任意に、細胞の生存能力を保持する条件を使用することができる。そのようにして、除去された細胞（単数または複数）を、培養、コピー、または増殖することができる。細胞（単数または複数）を、他の候補薬剤に関して本明細書の他の箇所に記載の技法および試薬を用いて除去することができる。例えば、光解離性リンカーおよび空間フィルタリングされた光線の使用は、特定の細胞をアレイ中の他の細胞から単離するのに

50

特に有用であり得る。

【0157】

いくつかの実施形態では、スクリーニング工程の後に生存細胞をアレイから除去する必要はない。むしろ、タグ配列は、タグの配列決定が、細胞を単離または特性評価することをさらに必要とせずに細胞を同定するのに十分であるように、既知の細胞とa prioriに関連していてもよい。特定のフィーチャーに存在するタグのa prioriな知識は、細胞を同定するために、スクリーニング工程においてフィーチャーから観察されたシグナルと関連させることができる。

【実施例】

【0158】

以下の実施例は、本発明を説明することを意図しているが、本発明を限定するものではない。

【0159】

(実施例1)

小分子スクリーニング

Illumina (サンディエゴ、カリフォルニア州) によって市販されているものなどの次世代配列決定プラットフォームは、創薬のための統合されたハイスループットスクリーニングプラットフォームを構築する基盤を提供する。標的分子への結合を可能にする官能基で核酸を修飾することにより、配列決定フローセルを、ハイスループット化合物スクリーニング用のアレイを構築するための基質として利用することが可能である。様々なスクリーニングアッセイを、同じプラットフォームを使用して、結合した標的に変えて実施することができる。配列決定プラットフォーム上の小分子をスクリーニングするための例示的な方法を図1A~図1Fに図示し、以下に記載する。

【0160】

図1Aは、それぞれが29ヌクレオチド長である50,000の異種核酸分子がテープベースの合成機器上で合成される第1工程を示す。テープは、個々の核酸種がそれぞれ合成される個々にアドレス可能な部位を含む。核酸分子はまた、スルフヒドリル、アミンまたはN-ヒドロキシスクシンイミド基などの官能基 (FG) を5'末端に含む。核酸の5'領域はユニバーサルプライマー (50,000の核酸の全てについて同じ) をコードする10ヌクレオチドを含み、3'領域は50,000の異種タグ配列 (「コード」配列とも称される) のうちの1つをコードする。例示的なテープベースのDNA合成機器は、参照により本明細書に組み込まれる特許文献99に記載されている。

【0161】

第2工程は図1Bに示されており、単一鋳型ハイブリッド核酸を合成テープの各ウェル中の核酸にライゲーションさせ、ユニバーサルオーバーハングプライマーを作製する。図に示すように、ライゲーションは、異種核酸のユニバーサルプライマー配列と、単一鋳型ハイブリッド上のオーバーハングとのハイブリダイゼーション後に生じる。任意に、ライゲーション事象の前に、異種核酸をテープから除去することができる (例えば、核酸を精製または修飾するために)。他の任意の構成は、異種核酸の代わりに単一鋳型ハイブリッドに結合した官能基を有することを含む。その代わりに、またはそれに加えて、単一鋳型ハイブリッドは、ピオチン、アジドまたはアルキン基などの表面結合成分を有することができる。

【0162】

図1Cに示すように、特定の候補薬剤 (例えば、「化合物」) を合成機器テープ上の個々のウェルの各々にロボットで添加する第3工程が実施される。候補薬剤の各々は、異種核酸上の官能基と反応する反応基を含む。結果として、候補薬剤の各々は、合成機器テープ上の特定の核酸タグに結合され、それによりコードされた候補薬剤を生成する。

【0163】

図1Dに示すように、コードされた候補薬剤をフローセル表面上の識別可能な部位に固定化する工程4が実施される。固定化は、核酸の単一鋳型部分の、フローセル表面上にあ

10

20

30

40

50

る相補的ユニバーサルプライマーへのハイブリダイゼーションによって行うことができる。プライマーを、フローセル表面に、PAZAMゲル、または例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献16、もしくは特許文献100に記載のような他のヒドロゲルを介して結合させることができる。

【0164】

工程5では、図1Eに示すように、スクリーニング剤（「標的分子」とも称される）を、フローセルの表面上にある固定化されコードされた候補薬剤と接触させる。スクリーニング剤は、Illumina配列決定機器などの光学装置を用いて検出することができる蛍光標識を含む。画像を、例えばリアルタイムで取得し、識別可能な部位の各々でのスクリーニング剤の結合反応速度を測定することができる。図1Eの例では、コードNに結合した候補薬剤は、所望の結合反応速度プロファイルによって決定される「ヒット物質」である。

10

【0165】

図1Fに示すように、コードNの配列は、フローセル上で実行される配列決定プロトコルに基づいて決定することができる。コードNの配列を、それが合成された合成機器テープ上の位置と関連させることができ、次に、「ヒット物質」の同一性を、コードNが合成された合成機器テープ上の位置にどの候補薬剤が配信されたかの知識に基づいて判定することができる。

【0166】

（実施例2）

タンパク質スクリーニング

20

固相増幅法は、高度に多重化された核酸の提示を可能にする。特に有用な固相増幅法は、ブリッジ増幅（クラスター形成とも称される）であり、これは、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献35；特許文献37；特許文献36；特許文献38；特許文献39；特許文献40；特許文献41に記載のように実施することができる。

【0167】

この実施例は、固相増幅から生じる核酸クラスターを使用してフローセル上にタンパク質アレイを形成することを記載する。この技法のいくつかの重要な利点は、(a)多種多様な異種タンパク質の活性についてスクリーニングすることができるように、比較的小さいサイズであるが、表面上で光学的に識別可能な多数のタンパク質含有フィーチャーを提供すること；および(b)フィーチャーがタンパク質をコードする核酸を含有し、核酸は配列決定に適したものであり、それによりフローセルの各フィーチャーのタンパク質を同定できることである。

30

【0168】

図2に示すように、cDNAライブラリーは、転写部位および翻訳部位とともにP5ならびにP7プライマー結合部位を有するアダプターを有するように構築される。ライブラリーはフローセルに結合され、ライブラリー成員は、ブリッジ増幅を用いてフローセルの表面上で増幅され、クラスターを形成する。P5およびP7プライマー結合配列、アダプターを有する核酸ライブラリーの作製方法、およびクラスターの作製方法についての記載は、例えば、ブリッジ増幅技術に関して上記で引用した参考文献、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献1、特許文献16および特許文献101を参照。

40

【0169】

得られたcDNAクラスターを、RNAポリメラーゼを用いてmRNAに転写する。mRNAは、以下により、その転写が始まるcDNAクラスターに近接して維持される：(a)RNAポリメラーゼが停止してmRNA転写物がcDNAに結合したままとなるように、cDNA構築物の末端に転写終結部位がないことにより、(b)同様にRNAポリメラーゼを停止させる既知転写休止部位（例えば、大腸菌のTrpオペロン由来）の使用により、(c)化学的方法を用いて転写を停止させることにより（例えば、ピシクロマイシン）、または(d)転写されたRNAがハイブリダイズすることになるcDNAクラスターにおいて相補配列を有することにより。

【0170】

mRNAは、cDNAクラスターに局在し、そこから転写され、その後翻訳されてタンパク質を

50

作製する。これは、mRNA中の開始コドン（cDNAライブラリー構築物の5'末端のアダプター中の転写開始配列とともに導入され得る）によって促進される。さらに、mRNAは、3'末端に終止コドンを持たないことになる。図2に示すように、終止コドンの欠如は、タンパク質がリボソームを介してmRNAに結合したままであるように、mRNAの末端でのリボソーム停止をもたらす（その後mRNAは、停止したRNAポリメラーゼによってcDNAクラスターに結合した状態にある）。あるいは、リボソームを化学的手段（例えば、クロラムフェニコール/ピユーロマイシン）によって停止させることができる。共役した転写および翻訳は、容易に入手可能なウサギ網状赤血球溶解物、細菌S30または小麦胚芽抽出物系を用いて行うことができる。

#### 【0171】

別の手法では、タンパク質を溶液中で生成させ、次いでフローセルまたは他の表面に結合させることができる。この手法は表面上での増幅を含まないが、溶液ベースの技法がより容易に利用可能であるか、または評価されるタンパク質に適用可能である場合に有益であり得る。得られたタンパク質アレイをスクリーニング剤または他の刺激剤でスクリーニングし、ヒット物質を同定する。クラスター内のcDNAを配列決定し、タンパク質ヒット物質を同定する。

#### 【0172】

（実施例3）

タグを用いたタンパク質スクリーニング

Illumina（サンディエゴ、カリフォルニア州）によって市販されているものなどの次世代配列決定プラットフォームは、タンパク質進化のための統合されたハイスループットスクリーニングプラットフォームを構築する基盤を提供する。例示的な方法を図3Aおよび図3Bに示す。

#### 【0173】

第1工程として、目的の標的タンパク質およびランダムタグ（「コード」とも称される）に対するランダムまたはセミランダム突然変異を有するベクターのライブラリーを作製する。ベクターを、タンパク質およびタグのコード配列を含むmRNAを発現するように構築する。異種ランダムタグの数は、各変異体mRNAが高い確率で特有のタグを含むように、ライブラリー中のタンパク質変異体の数より多い。例えば、10ヌクレオチドのランダム配列は $10^6$ 個の異種タグを提供することになり、20ヌクレオチドのランダム配列は $10^{12}$ 個の異種タグを提供することになる。

#### 【0174】

突然変異のランダムな導入およびランダムタグの使用の代わりに、第1工程は、所定の突然変異を引き起こし、既知タグと結合させるように行うことができる。

#### 【0175】

第2工程では、ベクターで形質転換された細菌のライブラリーを培養して、それぞれのベクター由来のmRNAを生成する。ライブラリーを溶解し、ライブラリー中（すなわちmRNAライブラリー）の種々のベクターからのmRNA転写物の混合物を放出させる。

#### 【0176】

第3工程では、mRNAライブラリーを分割して2つのサブライブラリーを作製する。ライブラリーを分割すると、両方のサブライブラリーに同じ成員が存在するように、ライブラリーは各成員の複数のコピーを含んでいる。再度、特有のタグ配列が各タンパク質変異体配列に結合される。

#### 【0177】

第4工程では、図3Bに示すように、第1サブライブラリーをフローセルに結合させ、フローセル上で増幅させ、コード配列および得られたアンプリコンのそれぞれのタグを配列決定する。このようにして、各成員が結合されている部位が特定される。次いで、第2サブライブラリーの成員をフローセルと接触させると、第2サブライブラリーからの成員が、タグ配列の相補性を介して第1サブライブラリー由来の同一の成員から生成されたアンプリコンにハイブリダイズする。このようにして、第2サブライブラリーの各成員が位置

10

20

30

40

50

する部位は、配列決定結果およびタグとそれらの相補体との間の予想されるハイブリダイゼーションに基づいて推論することができる。フローセル上に捕捉された第2サブライブラリーの成員は、その後翻訳され、タンパク質標的をフローセル上に発現する。タンパク質の各々は、それが翻訳されたRNAに結合したままの状態が発現される。例えば、結合は、実施例2に記載の技法を用いて達成することができる。次いで、スクリーニング剤または他の刺激剤でタンパク質をスクリーニングすると、所望の機能をハイスループット様式で同定することができる。結果は、タンパク質をコードするRNA配列と関連するフローセル上の部位に局在するタンパク質活性シグナルである。

#### 【0178】

この方法論は、フローセルレーンあたり3,000万以上のタンパク質の大量処理を可能にすることができる。このスクリーニング過程は、エマルジョンベースのスクリーニングに関連する困難を回避する。例えば、フローセルの各フィーチャーでの定量的および反応速度ベースのデータをIllumina配列決定機器を使用して取得し、従来のエマルジョンベースの技法を使用して得られるものよりも洗練された選択的スクリーニング基準を可能にすることができる。

#### 【0179】

(実施例4)

#### 細胞スクリーニング

この実施例は、蛍光顕微鏡検査で典型的に伴う利点である、リアルタイムで動的過程を追跡する能力を有する蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)の高い処理能力の利点を提供し、同時に集団内の個々の細胞を同定する次世代配列決定の利点を付加する、細胞のスクリーニング方法論を記載する。結果として、本明細書に記載の方法は、所望の挙動を示す細胞の回収および特性評価を可能にする。具体的には、この実施例は、Illumina社(サンディエゴ、カリフォルニア州)からの次世代配列決定プラットフォームを適応させ、蛍光により、特異的刺激に応答する個々の細胞の表現型挙動(例えば、蛍光レポーターの発現によって測定される)を超ハイスループットで観察し、後続の同定および回収のための、それぞれ個々の細胞の表面上に提示されたタグの配列決定が続く。このプラットフォームは、細胞工学用ハイスループットスクリーニングの標準的な方法を提供することができる。

#### 【0180】

細胞は、小分子およびタンパク質とは異なる、そして多くの場合、それらの改良版である潜在的治療能力を有する。細胞は身体の特定の場所に積極的に移動し、複数の外部刺激を感知することができる。複数の情報源を統合して正確な出力で応答することができる。さらに、細胞ベースの応答は、予めプログラムされた機能または外部要因の追加によって制御することができる複雑な動的パターンを有することができる。現在、クローン病を治療するための操作された微生物の使用から、がんを治療するための患者由来の操作されたヒト免疫細胞の使用まで、広範囲の疾患の治療のための細胞ベースの療法が検討されている。重要なことには、微生物またはヒト細胞のいずれかを、治療的に有用であるように操作することができる。

#### 【0181】

#### 細胞工学のワークフロー

細胞工学(微生物またはヒト細胞のいずれかにおける)は、考慮すべき多くの変数を伴う複雑な過程である。したがって、単一設計を試みるのではなく、選択またはスクリーニングされ得る候補細胞のライブラリーを設計することが有益である。具体的には、細胞工学は、以下の工程を含むことができる:(1)外部シグナル、情報統合ネットワーク、およびシグナル依存応答(しばしば遺伝子発現を伴う応答)に対する1つ以上のセンサーを含むことができる遺伝子回路の設計;(2)候補細胞のライブラリーにわたって上記成分の1つ以上の遺伝子標的を修飾すること(例えば、CRISPR-Cas9を用いて);ならびに(3)多数の異種候補細胞の中から、所望の細胞挙動を与えるヒット物質を同定するハイスループットスクリーニング。

10

20

30

40

50

## 【0182】

堅固なハイスループットスクリーニング技術は、検査が必要な細胞数が多い（しばしば何千もの異なる設計が試みられる）場合に、細胞工学に大きな利点を提供することができ、操作過程に導入される変更により、大規模で多様な細胞行動が明らかになるであろう。所望のスクリーニングは、非常に高い処理能力を達成しながら、複雑な時間的動態を追跡することもできる。本明細書に記載のスクリーニングは、これらの利点を提供する。

## 【0183】

細胞スクリーニング法は、以下の2つの段階を有する：

## 【0184】

段階1：表現型観察。図4に示すように、適切な蛍光レポーターを有する操作された生細胞のライブラリーを、配列決定プラットフォーム（例えばIllumina MiSeq（登録商標）、NextSeq（登録商標）、HiSeq（登録商標）またはGenome Analyzer（登録商標）プラットフォーム）のフローセルに充填する。個々の細胞はランダムに分布し、フローセルの表面に結合することになる（分析される特定の細胞に応じて特定の結合性化学物質を使用して）。それぞれ個々の細胞の蛍光を一定の時間間隔で記録し、配列決定中にIlluminaフローセルで目下で行われている際にフローセル表面を走査する。個々の細胞は、目下の配列決定クラスターに匹敵する（またはそれよりも大きい）平均サイズを有することになり、それにより配列決定プラットフォームの解像度をスクリーニングによく適合させることに留意されたい。また、細胞は、シグナル強度が配列決定プラットフォームによって目下で検出されているものと類似である（またはより大きい）ように、何千もの蛍光レポーター分子を抱えることができる。特定の時間に、細胞をスクリーニング剤（または他の刺激剤）に晒し、細胞の応答を検出する（例えば、レポーター遺伝子の発現の変化、または任意の他のタイプの細胞レポーターの蛍光強度の変化 - 細胞質中のカルシウム濃度、細胞内局在の変化によるフルオロフォアクエンチングなどに反映されるように）。蛍光レポーターの変化を経時的に観察することにより、多様な刺激剤（または刺激剤の組み合わせ）に応答した表現型の変化の時間的動態を決定することが可能になる。

## 【0185】

段階2：個々のタグの解読による単一細胞識別。集団内の各細胞にはタグが割り当てられることになる。細胞をタグ付けするための3つの異なる技法を以下に説明する。最初の工程では、タグを個々の細胞に結合させる。タグのタイプ（例えば、ビーズ、膜結合核酸など）とは無関係に、1つの細胞が各容器に位置するように、最初に細胞を個々の容器（例えば、マイクロウェル）に分類する。次いで、図5に示すように、各容器内の細胞に特有のタグを与える。

## 【0186】

2.1 ビーズでの単一細胞バーコード化。集団内の各細胞（例えば、T細胞では直径 $\sim 10\ \mu\text{m}$ ）を、1~10個のビーズでタグ付けする。ビーズは、約 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の直径を有することができる。有用なビーズには、例えば、Illuminaのビーズアレイ技術で使用されているものか、または各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献102もしくは特許文献103に記載のものが挙げられる。個々の細胞を個々の容器に予め分離し、各容器に同じ特有のタグを共有するビーズ（すなわち、各容器と各タグとの間に既知の対応があることになる）を加えることによって、各細胞は単一タグをコードするビーズでタグ付けされる。細胞タグ付けは多くの方法で、例えば、標的細胞の表面上に天然に存在する特異的エpitepを認識する抗体とビーズを共有結合させることにより達成することができる。このように、各ビーズタグ付き細胞はフローセルの表面上にランダムに分布することになるが、各細胞はそれ自身のビーズ（単数または複数）と空間的に共局在化することに留意されたい（図6）。したがって、段階1に続いて、フローセル上のビーズ（単数または複数）を解読し、同定されたタグを対応するビーズ（単数または複数）に最も近接した細胞に割り当てることによって、各細胞の同一性が明らかになる。ビーズ上のタグは、合成技術による配列決定（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献1、特許文献49、特許文献50もしくは特許文献51；特許文献52、特許文献53、特許文献54

10

20

30

40

50

、特許文献 5 5 もしくは特許文献 5 6、および特許文献 5 7 を参照)、または各々が参照により本明細書に組み込まれる特許文献 1 5 もしくは非特許文献 2 2 に記載の解読技術を用いて解読することができる。

#### 【0187】

2.2 配列決定タグでの単一細胞同定。ビーズタグ付けに代わるものまたは追加されるものは、各細胞の表面上に直接提示される特有の配列識別子を使用することである。そのために、集団中の各細胞は、フローセルへの細胞充填の前に(例えば、段階1の前に)、表面提示された個々の一本鎖DNAタグで修飾されることになる。核酸タグ結合性化学物質は、特定の細胞型によって決まる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる非特許文献 2 3 によって報告されているように、ヒト細胞を、原形質膜脂質に共有結合した一本鎖DNA分子でタグ付けすることができる。別の例として、酵母細胞を、Aga1-Aga2細胞壁複合体上に提示されたHaloTagタンパク質に共有結合した一本鎖DNA分子でタグ付けすることができる。

10

#### 【0188】

それぞれ個々のタグは、少なくとも3つの領域で構成されている。領域1は、結合部分(例えば、細胞型に応じて、脂質またはタンパク質)に連結される。領域2は、必要とされるプレキシティに応じた規定数の塩基からなる(4ヌクレオチド全てを使用して、長さ「n」の配列に対して $4^n$ の組み合わせを生成することが可能である;例えば、4塩基長の配列は、256の異なる個々の細胞を同定するためのタグを包含することになり、5つでは1024の異なるタグを生じることになる、など)。したがって、9塩基のタグ配列さえあれば、250,000を超える異種細胞を個別に同定することが可能である。領域3は、配列決定プライマーに相補的なDNA配列からなる。各細胞は、単一タグをコードする核酸で、予め容器中の個々の細胞を単離し、各容器に同じ特有のタグ配列を共有する核酸(前述のように、各容器と各タグの間には既知の対応が存在することになる)を添加することによってタグ付けされることに留意されたい。

20

#### 【0189】

別々の工程(表現型測定が得られる前または後に実施される)において、それぞれ個々の細胞の同一性は、例えば、以下に記載の2つの方法のうちの1つで決定されることになる。

#### 【0190】

2.2.1 各細胞に結合した特定のタグのin situ配列決定。各細胞は、特定のタグの複数のコピーを提示する。したがって、シグナルは配列決定機器で容易に検出できる(図7を参照)。さらに、各タグを同定するための読み取り長は比較的短く(例えば、9塩基は $>250,000$ タグを識別するのに十分である)、十分に、市販の配列決定機器の典型的な数百ヌクレオチドの読み取り長の範囲内である。

30

#### 【0191】

In situタグ配列決定は、多くの方法で達成することができる。1つの可能性は、生細胞の表面上で直接配列することである。別の可能性は、配列決定の前に細胞を固定することである(生細胞から流出するヌクレオチドが配列決定反応を妨害する場合)。第3の可能性は、各細胞から核酸タグを分離して捕捉することである。このために、フローセル表面を、全ての細胞結合核酸に共通の領域に相補的な領域を含有する捕捉プローブ(例えば、配列決定プライマー)で修飾し、表面への細胞の初期結合を可能にし、配列決定の前に分離された核酸の捕捉を容易にする。必要に応じて、核酸タグの表面捕捉後に細胞を除去することができる。

40

#### 【0192】

2.2.2 フローセルに結合したタグのコピーのin situ配列決定。図8に示すように、細胞表面提示核酸タグを、フローセル表面結合プライマー(部分的相補配列を有する)にハイブリダイズさせる。細胞表面核酸タグを、特定の制限酵素での消化によって細胞から分離させ、次いで細胞をフローセルから洗い流す。次いでフローセル表面結合核酸タグを伸長し、元の細胞タグのコピーを効果的に作製し、次いで配列決定することになる。多くの

50

場合、細胞は何千もの核酸からなる直径約 $1\mu\text{m}$ の「スポット」を残す可能性があるため、コピーをブリッジ増幅する必要はない。しかし、希望であればブリッジ増幅を実施することができる（この場合、適切なプライマー結合部位を核酸タグに添加することができ、第2プライマータイプをフローセル表面に結合させることができる）。

【0193】

場合によっては、図9に示すように、膜固定核酸を用いてタグを個々の細胞に結合させることができる。膜固定核酸は、リンカー領域、制限部位（RE）、配列決定プライマー結合部位（SBS3）、タグ配列（バーコード）および捕捉配列を含むことになる。次いで、参照により本明細書に組み込まれる非特許文献23に記載のように、または図10に示すように、捕獲配列に相補的な配列を有する表面結合核酸によって細胞を表面捕捉することができる。

10

【0194】

スクリーニング工程における細胞表現型挙動を示す蛍光シグナルの記録（例えば、ある期間のおよび特定の培地条件下でのレポーターからの蛍光の測定）に続いて、核酸タグをフローセル表面上でコピーし、その後細胞を洗い流すことができる。表面上のコピーは、図11に示すように、どの細胞がフローセル表面上のどこに位置したかに関する空間情報を効果的に保存する。

【0195】

表面上の各細胞の空間位置を記録することにより、記録された蛍光時系列の各々にタグ同一性を割り当てることが可能となり、したがって表現型応答を細胞同一性と効果的に結びつけることができる。次いで、これらの同一性を用いて、単一容器内（図12に示すように、細胞が最初にタグ付けされた場所）の個々のクローンを同定することができるか、または選択された細胞の表面上に存在するタグに相補的な核酸でプルダウンすることにより、選択された細胞を細胞混合物から回収することができる。

20

【0196】

この出願を通じて、様々な刊行物、特許または特許出願が参照されている。これらの刊行物の開示内容全体は、本発明が関係する技術水準をより詳細に説明するために、参照により本出願に組み込まれる。

【0197】

用語「含む（comprising）」は、本明細書において非限定的であることを意図しており、列挙された要素を含むだけでなく、任意の追加の要素をさらに包含する。

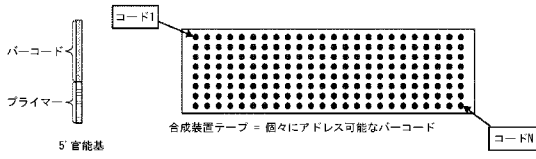
30

【0198】

本発明を上記で示した実施例を参照して説明してきたが、本発明から逸脱することなく種々の変更が行われ得ることが理解されるべきである。したがって、本発明は、特許請求の範囲によってのみ限定される。

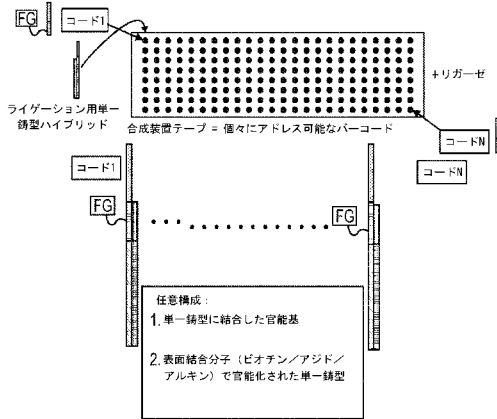
【 図 1 - 1 】

1. 工程1: 500,000個の29merオリゴ + 結合基 (-SH; アミン; NHS) を合成する。  
 1. 合成装置 = 50,000オリゴ/日 → 10日後500,000オリゴ  
 2. バーコード = 19mer; 「プライマー」 = 10mer



A

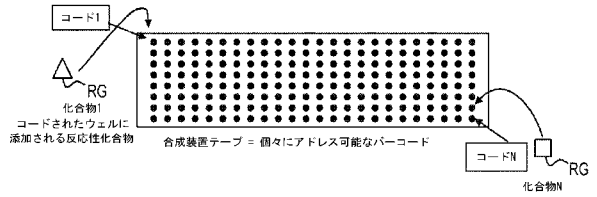
工程2: オーバーハングしたプライマーを単一鎖型配列で懸々のウェルにおいてライゲーションする



B

【 図 1 - 2 】

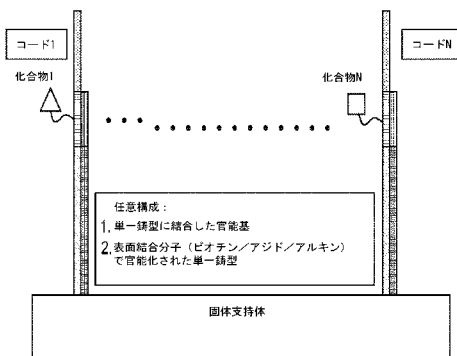
工程3: 反応基 (RG) を有する化合物を、官能化コードを有する個々のウェルにロボットで添加する。



C

【 図 1 - 3 】

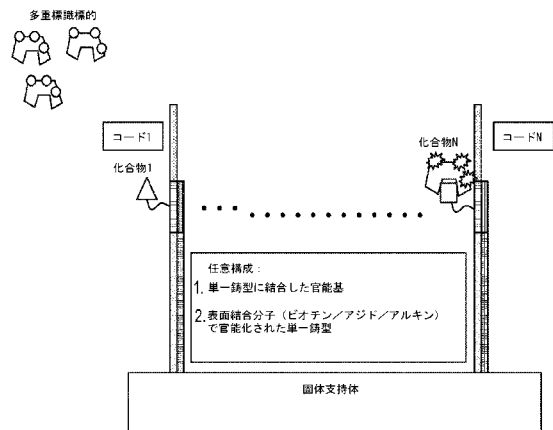
工程4: ハイブリダイゼーションまたは表面官能基を介して単一分子表面 (またはPazamフローセル表面) に固定化された化合物。



D

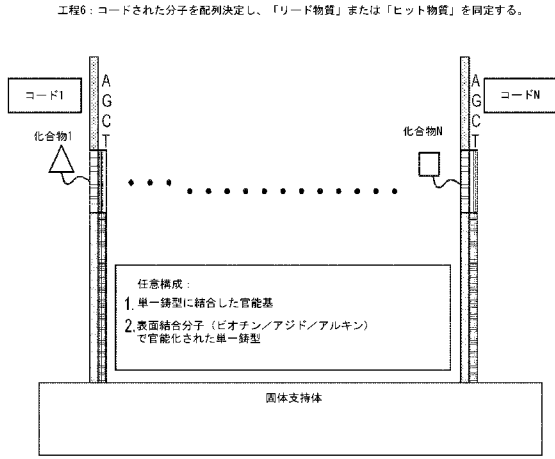
【 図 1 - 4 】

工程5: 標的分子内に浸し、化合物に対する結合動態のリアルタイム画像を記録する。



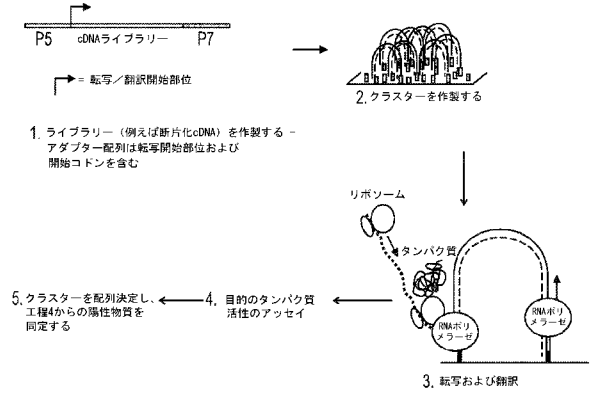
E

【 図 1 - 5 】



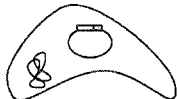
F

【 図 2 】



【 図 3 A 】

1. mRNA転写物 + インデックスを有する細菌ライブラリーを製作する  
(インデックス: 10bp = 10<sup>6</sup>コード; 20bp = 10<sup>12</sup>コード)



2. 細菌を溶解する - mRNA転写物を収集する



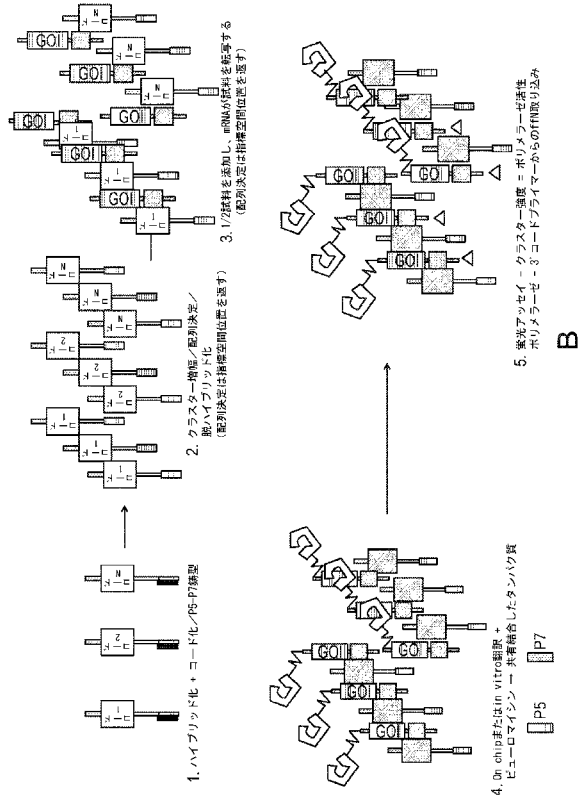
3. 1/2試料 - 配列決定は突然変異の指標を決定する。

突然変異 Y<sub>1</sub> = コード X<sub>1</sub>  
突然変異 Y<sub>2</sub> = コード X<sub>2</sub>  
突然変異 Y<sub>N</sub> = コード X<sub>N</sub>

4. 1/2試料 - フローセルで翻訳/アッセイ

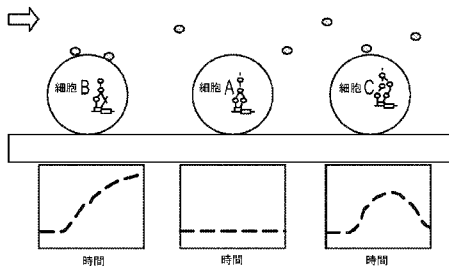
A

【 図 3 B 】

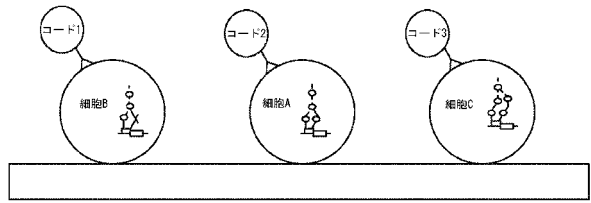


B

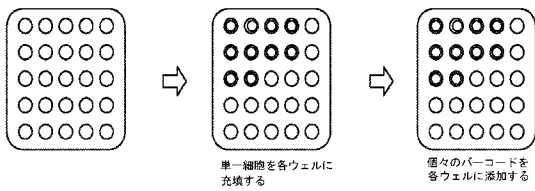
【 図 4 】



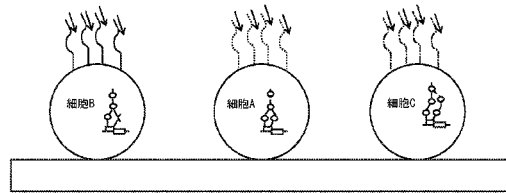
【 図 6 】



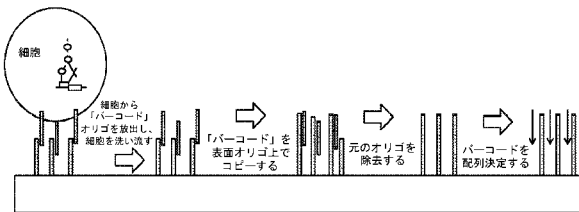
【 図 5 】



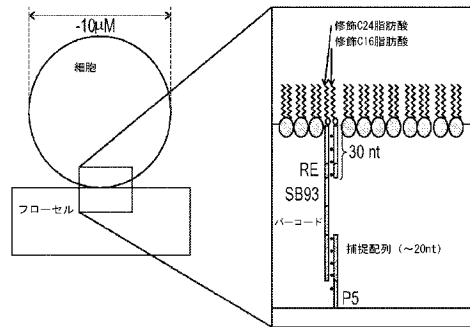
【 図 7 】



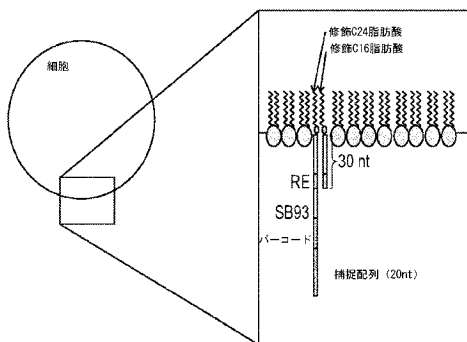
【 図 8 】



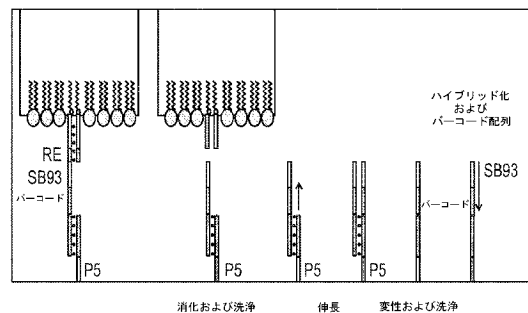
【 図 10 】



【 図 9 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】

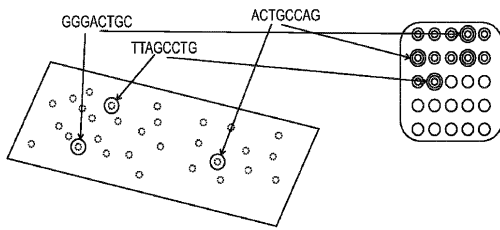




Fig. 12

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2016/031524</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q 1/68(2006.01)I, G01N 33/53(2006.01)I, G01N 33/573(2006.01)I, G01N 33/569(2006.01)I, G01N 21/76(2006.01)I</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; C12P 19/34; C12N 15/10; G01N 33/53; G01N 33/573; G01N 33/569; G01N 21/76		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords:solid phase amplification in situ sequencing, tag, bridge, flow cell, library, barcode, monotemplate hybrid, screen, monitor		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GU et al., `Multiplex single-molecule interaction profiling of DNA-barcoded proteins` Nature, Vol.515, pp.554-557, supplemental pages 1-9 (2014) See abstract; pages 554-555; supplemental page 1; figures 1, 2, 3.	106-146
A		1-105
A	BOWMAN et al., `Multiplexed Illumina sequencing libraries from picogram quantities of DNA` BioMedCentral Genomics, Vol.14, Article 466, pages 1-7 (2013) See the whole documents.	1-146
A	US 2014-0228223 A1 (ANDREAS GNIRKE et al.) 14 August 2014 See the whole document.	1-146
A	WO 2014-144822 A2 (IMMUMETRIX, INC.) 18 September 2014 See the whole document.	1-146
A	US 2004-0018491 A1 (KEVIN GUNDERSON et al.) 29 January 2004 See the whole document.	1-146
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 09 August 2016 (09.08.2016)		Date of mailing of the international search report <b>09 August 2016 (09.08.2016)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2016/031524**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014-0228223 A1	14/08/2014	WO 2011-143231 A2 WO 2011-143231 A3	17/11/2011 22/03/2012
WO 2014-144822 A2	18/09/2014	CA 2905505 A1 CA 2905517 A1 CN 105189748 A CN 105189749 A EP 2970958 A2 EP 2970959 A2 US 2016-0001248 A1 US 2016-0040234 A1 WO 2014-144713 A2 WO 2014-144713 A3 WO 2014-144822 A3	18/09/2014 18/09/2014 23/12/2015 23/12/2015 20/01/2016 20/01/2016 07/01/2016 11/02/2016 18/09/2014 27/11/2014 23/04/2015
US 2004-0018491 A1	29/01/2004	None	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K	17/00	
C 1 2 N 11/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	F
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N	11/00	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
	G 0 1 N	21/64	F
	G 0 1 N	21/64	E

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 マイケル プリバイト  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者 ミーシャ ゴリンスキー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者 マシュー ウィリアム ケリンジャー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者 セルジオ ペイサジョピッチ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者 ジョナサン マーク バウテル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0

Fターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA04 DA02 DA06 EA01 EA06 FA02 FA03  
 2G045 AA40 CA18 CB01 DA14 DA20 DA30 DA35 DA36 DA57 FA37  
 FB01 FB02 FB03 FB12 FB13 FB15 GC15 JA01 JA07  
 4B033 NA02 NA22 NA25 NA26 NA42 NA45 NC02 NC11 ND05 ND20  
 4B063 QA05 QQ08 QQ13 QQ28 QQ42 QQ53 QQ54 QQ79 QR08 QR32  
 QR35 QR36 QR77 QR80 QR82 QR84 QS24 QS36 QS38 QS39  
 QX02  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA40 BA54 BA60 BA70 EA50 FA74

专利名称(译)	发现和分析治疗剂的平台		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018518157A</a>	公开(公告)日	2018-07-12
申请号	JP2017555663	申请日	2016-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	亿明达股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Iramina公司		
[标]发明人	モリーヘ マイケルプリバイト ミーシャゴリンスキー マシューウィリアムケリンジャー セルジオペイサジョビッチ ジョナサンマークパウテル		
发明人	モリーヘ マイケルプリバイト ミーシャゴリンスキー マシューウィリアムケリンジャー セルジオペイサジョビッチ ジョナサンマークパウテル		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C40B40/06 C40B40/10 C40B40/02 C07K17/00 C12N11/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N21/64		
CPC分类号	B01J19/0046 B01J2219/005 B01J2219/00626 B01J2219/00743 B01L3/5085 C12Q1/6869 C40B20/04 C40B50/16 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68 B01J2219/00317 B01J2219/00459 B01J2219/00527 B01J2219/00547 B01J2219/00572 B01L3/54 B01L2300/021 C12N15/1062 C12N15/1065 C12N15/1068 C12N15/1075 C12Q2563/131 C12Q2563/179 C12Q2565/514 C12Q2565/515		
FI分类号	C12Q1/68.Z C12N15/00.A C40B40/06 C40B40/10 C40B40/02 C07K17/00 C12N15/00.F C12N11/00 G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N21/64.F G01N21/64.E		
F-TERM分类号	2G043/AA04 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA02 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/EA06 2G043/FA02 2G043/FA03 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/DA57 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/JA01 2G045/JA07 4B033/NA02 4B033/NA22 4B033/NA25 4B033/NA26 4B033/NA42 4B033/NA45 4B033/NC02 4B033/NC11 4B033/ND05 4B033/ND20 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ28 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ54 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR36 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QR84 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/BA54 4H045/BA60 4H045/BA70 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二 井上 高雄		
优先权	62/159710 2015-05-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种表征候选药物的方法，该方法包括：(a) 提供与核酸标签结合的候选药物文库；(b) 使该文库与固体支持物接触以将候选药物支持在固体支持物上。(c) 使阵列与筛选剂接触，由此阵列中的一种或多种候选试剂与筛选剂反应；(d) 检测所述阵列并确定所述阵列中的至少一种候选试剂与所述筛选剂反应；(e) 对所述核酸标签进行测序并确定与所述阵列中的所述候选试剂结合的标签

序列。(f) 基于与至少一种候选试剂结合的标签序列，鉴定与筛选剂反应的阵列中的至少一种候选试剂。

Step 1: Synthesize 500,000 29-mer oligos + attachment group (-SH, amine, NHS).

1. Synthesizer = 60,000 oligos/day 500,000 oligos in 10 days
2. Bar-code = 19-mer; "Primer" = 10-mer

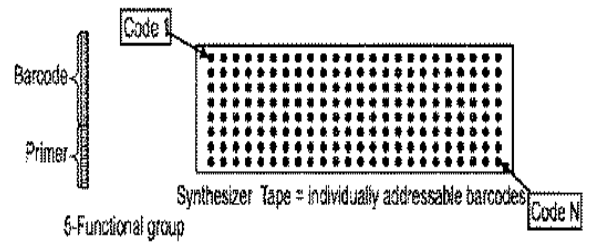


Fig. 1A