

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7208902号  
(P7208902)

(45)発行日 令和5年1月19日(2023.1.19)

(24)登録日 令和5年1月11日(2023.1.11)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 M 1/32 (2006.01)	C 1 2 M	1/32		
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	A	
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	

請求項の数 18 (全34頁)

(21)出願番号	特願2019-535266(P2019-535266)	(73)特許権者	519210859
(86)(22)出願日	平成29年12月22日(2017.12.22)		エクセラ・バイオサイエンス・イン
(65)公表番号	特表2020-504616(P2020-504616		コーポレイテッド
	A)		XCELLA BIOSCIENCES,
(43)公表日	令和2年2月13日(2020.2.13)		INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2017/068296		アメリカ合衆国94025カリフォルニ
(87)国際公開番号	WO2018/125832		ア州メンロ・パーク、オプライエン・ド
(87)国際公開日	平成30年7月5日(2018.7.5)		ライブ1440番、スウィート・ディ
審査請求日	令和2年12月10日(2020.12.10)	(74)代理人	100145403
(31)優先権主張番号	62/441,128		弁理士 山尾 憲人
(32)優先日	平成28年12月30日(2016.12.30)	(74)代理人	100122301
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 富田 憲史
		(74)代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生
		(74)代理人	100170520

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マルチステージサンプル回収システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

マルチステージサンプル回収システムであって、  
スクリーニングアレイステージであって、顕微鏡対物レンズに対して二次元で制御可能であり、スクリーニングアレイと連携し、且つ連携を解除し得るように構成されており、前記スクリーニングアレイが複数のマイクロキャピラリーを含む、スクリーニングアレイステージと、

第1の回収アレイステージであって、前記顕微鏡対物レンズに対して少なくとも一次元で制御可能であり、回収アレイと連携し、且つ連携を解除し得るように構成されている、第1の回収アレイステージと、

抽出ビーム発生器であって、抽出ビームが前記スクリーニングアレイステージの開口部を通して光学的に結合されており、前記スクリーニングアレイステージの下から向けられる、抽出ビーム発生器と、を備え、

前記スクリーニングアレイステージおよび前記第1の回収アレイステージが互いに独立して制御可能であり、前記第1の回収アレイステージが前記スクリーニングアレイステージの下に配置されている、  
マルチステージサンプル回収システム。

【請求項2】

前記抽出ビームがレーザービームである、請求項1に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 3】

前記スクリーニングアレイステージと連携し、且つ連携を解除し得るように構成されているスクリーニングアレイをさらに備える、請求項 1 または請求項 2 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 4】

前記第 1 の回収アレイステージと連携し、且つ連携を解除し得るように構成されている回収アレイをさらに備える、請求項 3 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 5】

前記回収アレイが複数の回収容器を備える、請求項 4 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

10

## 【請求項 6】

前記スクリーニングアレイが複数のマイクロスケールサンプル容器を備え、前記回収アレイが複数の回収容器を備え、前記スクリーニングアレイおよび前記回収アレイが、少なくとも 1 つのマイクロスケールサンプル容器および少なくとも 1 つの回収容器を、前記顕微鏡対物レンズの作動距離内に配置するように構成される、請求項 4 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 7】

前記顕微鏡対物レンズの前記作動距離が、 $2.5\text{ mm} \sim 25\text{ mm}$ である、請求項 6 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 8】

前記スクリーニングアレイが、少なくとも 100,000 個のマイクロキャピラリーを備える、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のマルチステージサンプル回収システム。

20

## 【請求項 9】

前記回収アレイが回収容器を備える、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 10】

前記回収アレイが、少なくとも 1 個の回収容器を備える、請求項 9 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 11】

前記回収容器が、細胞損傷を防止するかまたは細胞増殖を促進するように構成されている、請求項 9 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

30

## 【請求項 12】

前記回収容器が、増幅反応用に構成されている、請求項 9 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 13】

前記増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 12 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 14】

前記増幅反応が逆転写ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 12 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

40

## 【請求項 15】

前記回収容器がシークエンシング反応用に構成されている、請求項 9 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 16】

前記スクリーニングアレイステージおよび前記第 1 の回収アレイステージが、電子モータによって制御可能である、請求項 1 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 17】

第 2 の回収アレイステージをさらに備える、請求項 1 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

## 【請求項 18】

50

前記第 2 の回収アレイステージが、前記第 1 の回収アレイステージに対して直角に配置されている、請求項 17 に記載のマルチステージサンプル回収システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年12月30日に提出された米国仮特許出願第62/441,128号の利益を主張するものであり、その全ては参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

タンパク質、核酸、炭水化物、および他の重要な生体分子の同定、特徴付け、および再設計を含む生物学的サンプルの分析は、サンプル数の拡大およびサンプルサイズの縮小から大きな恩恵を受けてきた。例えば、DNAマイクロアレイ等の生物学的材料の二次元マイクロアレイは、サンプルを処理して結果を検出するための多重アプローチを含むハイスループットスクリーニング方法の開発を可能にした。

【0003】

上記アプローチは、場合によっては、蛍光または他の対応する特異的かつ高感度の標識化アプローチを用いて目的の検体を同定する光検出技術とそれらを組み合わせることによって恩恵を受けてきた。

【0004】

そのような技術は、特定のサンプルについての分析情報、例えば、溶液中の特定の生体分子の存在および場合によっては量、または特定の核酸もしくはポリペプチドの配列を提供するが、それらは典型的には、目的のサンプルを不活性化させるかまたは別様に損傷することなく、アッセイによって同定された生物学的サンプルを回収することはできない。

【0005】

したがって、ハイスループット能力を有する改善されたマイクロスケールスクリーニングおよび分析の方法およびシステム、特にスクリーニングおよび分析において同定されたサンプルの回収を可能にする方法およびシステムを開発することが引き続き必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、一態様では、マルチステージサンプル回収システムであって、スクリーニングアレイステージであって、顕微鏡対物レンズに対して二次元で制御可能であり、スクリーニングアレイと可逆的に連携するように構成されている、スクリーニングアレイステージと、

第1の回収アレイステージであって、顕微鏡対物レンズに対して少なくとも一次元で制御可能であり、回収アレイと可逆的に連携するように構成されている、第1の回収アレイステージと、を備え、

スクリーニングアレイステージおよび第1の回収アレイステージは互いに独立して制御可能である、システムを提供することによって、これらおよび他の必要性に対処する。

【0007】

いくつかの実施形態では、本開示のマルチステージサンプル回収システムは、スクリーニングアレイステージと可逆的に連携するスクリーニングアレイと、第1の回収アレイステージと可逆的に連携する回収アレイとをさらに備える。

【0008】

いくつかの実施形態では、システムは、スクリーニングアレイステージの開口部を通してスクリーニングアレイのマイクロスケールサンプル容器に光学的に結合された抽出ビーム発生器をさらに備える。

【0009】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、システムは第2の回収アレイステージをさらに備える。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A-C】例示的なマイクロキャピラリースクリーニングアッセイのステップを概略的に示す。各パネルの左側の図は、単一のマイクロキャピラリーの側面からの断面図である。各パネルの右側の図は、マイクロキャピラリーアレイの小部分の底面図である。各例における陰影は、蛍光等の電磁シグナルを示すことを意図している。

【図2A-C】哺乳動物細胞に対するハイブリドーマスクリーニングを例示するマイクロキャピラリーアレイの小区分の底面図を示しており、明視野（図2A）、Live Green（図2B）、または蛍光抗マウス二次抗体（図2C）のいずれかを用いて細胞が画像化される。

10

【図3】4時間のインキュベーションにわたるA431標的細胞およびハイブリドーマ細胞の両方を含むマイクロキャピラリーの画像を示す。

【図4A-B】哺乳動物細胞に対する発現および非発現酵母細胞を強調するマイクロキャピラリーアレイの小区分の画像を示しており、明視野（図4A）または蛍光抗体（図4B）のいずれかを使用して細胞が画像化される。

【図5A-G】6日間にわたるマイクロキャピラリーアレイにおける不死化ヒト細胞の増殖を示す。

【図6A-E】本開示のスクリーニング方法を実施するように設計された顕微鏡システムの異なる図である。

20

【図7A】スクリーニングアレイステージの一例を示す。図7Bは、例示的な回収アレイステージを示す図である。

【図8】本サンプル回収システムによって促進されるように、スクリーニングアレイからの3つの対象のサンプルの回収中の、スクリーニングアレイと回収アレイとの互いに対する例示的な位置決めを示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

マイクロキャピラリーアレイは最近、例えば「マイクロキャピラリー単一細胞分析およびレーザー抽出」または「 $\mu$ SCALE」と呼ばれるアプローチにおいて、ハイスループット分析および多数の生物学的サンプルを用いたタンパク質工学のためのアプローチに用いられている。Chen et al. (2016) Nature Chem. Biol. 12: 76-81; DOI: 10.1038/NCHEMBIO.1978を参照のこと。このアプローチは、マイクロキャピラリーアレイ内の単一細胞の空間的分離に依存しており、したがって、マイクロキャピラリーアレイの各マイクロキャピラリー内の別々のサンプルの画像化、細胞増殖、およびタンパク質発現の繰り返しを可能にする。したがって、この技術は、例えば、アレイ全体に分布した酵母、細菌、または他の適切な細胞から発現される数百万ものタンパク質変異体の分析において、マイクロキャピラリーアレイ内の数百万ものサンプルに対する大規模並列の定量的な生化学的測定および生物物理学的測定を可能にする。有利には、このアプローチは、多重サンプルの同時時間分解動態解析、および標的表現型特徴に基づくそれらの細胞の選別を可能にした。

30

40

【0012】

生物学的変異体の集団の定量的生化学的分析および生物物理学的分析のための $\mu$ SCALE法および装置の開発もまた、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開2016/0244749A1号に報告されている。しかしながら、 $\mu$ SCALEアプローチによる所望のマイクロキャピラリーの内容物の抽出は、各サンプル中に放射線吸収材料を含めること、およびパルスレーザーからの電磁放射線をこの材料に向けることを必要とし、したがって抽出方法を複雑にする。加えて、所望の結合活性を欠くマイクロキャピティから放出されるシグナルを最小限にするために、マイクロキャピティのアレイ中の生物学的変異体をスクリーニングする初期の方法は、整列したサンプルに微粒子を添加して、サンプル中およびサンプル外への電磁放射線の透過を一部または完全に阻害するこ

50

とに依存していた。米国特許出願公開第2014/0011690A1号を参照のこと。本開示のいくつかの態様において、スクリーニング方法はこれらの追加のサンプル成分または操作に依存せず、したがってスクリーニング技術を単純化し、その効率を向上させる。スクリーニング方法はまた、共に2016年12月12日に出願された米国特許出願第62/433,210号および同第15/376,588号に記載されており、それらの開示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0013】

これらのアプローチの特定の用途において、また本明細書により詳細に開示されるように、標的分子は、粒子（例えば、磁性粒子）、細胞、またはマイクロキャピラリー壁の表面等の表面上に固定化され得る。これらのアプローチにおける変異体タンパク質と標的分子との相互作用は、次いで、検出可能な抗体を利用する方法および標的細胞内で発生した検出可能なシグナルを測定する方法を含むいくつかの方法によって測定され得る。そのような方法は、標的分子、例えば細胞または他の表面上の標的分子に結合するタンパク質変異体を発見するためのハイスループットスクリーニングにおいて使用され得ることが理解されよう。

#### 【0014】

##### スクリーニング方法

したがって、いくつかの態様において、本開示は、以下のステップを含む変異体タンパク質の集団をスクリーニングする方法を提供する：

複数のマイクロキャピラリーを備え、各マイクロキャピラリーが変異体タンパク質、固定化標的分子、およびレポーターエレメントを含み、変異体タンパク質が特定の親和性で固定化標的分子と会合する、マイクロキャピラリーアレイを提供するステップ、ならびに少なくとも1つの変異体タンパク質と少なくとも1つの固定化標的分子との会合を示す少なくとも1つのレポーターエレメントからのシグナルを測定して、少なくとも1つの目的のマイクロキャピラリーを同定するステップ。

#### 【0015】

これらの方法において、マイクロキャピラリーアレイは、好ましくは複数の縦方向に溶解されたキャピラリー、例えば溶解シリカキャピラリーを含むが、任意の他の適切な材料がアレイに用いられてもよい。例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられる、PCT国際特許公開第WO2012/007537号および同第WO2014/008056号を参照されたい。そのようなアレイは、例えば、数百万個または数十億個のシリカキャピラリーを結束し、熱プロセスを通してそれらを溶解することによって製造することができるが、他の適切な製造方法も用いることができる。溶解プロセスは、例えば、i) 張力下でシングルクラッドファイバに延伸されたキャピラリーシングルドロージャラスを加熱するステップと、ii) 結束、加熱、および延伸によってシングルドロージャラスからキャピラリーマルチドロースシングルキャピラリーを作成するステップと、iii) 追加の結束、加熱、および延伸によってマルチドロースシングルキャピラリーからキャピラリーマルチ-マルチドロースマルチキャピラリーを作成するステップと、iv) 押圧ブロックに積み重ねることによってマルチ-マルチドロースマルチキャピラリーからドロージャラスのブロックアセンブリーを作成するステップと、v) 熱および圧力で処理することによってブロックアセンブリーからブロック押圧ブロックを作成するステップと、vi) 正確な長さ（例えば1mm）でブロック押圧ブロックを切断することによってブロック形成ブロックを作成するステップを含んでもよい。

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、製造方法は、シリカキャピラリーをスライスし、それによって非常に高密度のガラスマイクロキャピラリーアレイを形成することをさらに含む。いくつかの実施形態において、マイクロキャピラリーアレイは約1ミリメートルの高さに切断されてもよいが、高さ10μm以下のアレイを含むさらに短いマイクロキャピラリーアレイも企図される。いくつかの実施形態では、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、または10μmのアレイを含むさらに短いマイク

10

20

30

40

50

ロキャピラリーアレイが企図される。

いくつかの実施形態において、10 mm以上のアレイを含むさらに長いマイクロキャピラリーアレイが企図される。いくつかの実施形態では、アレイは、200 μm、250 μm、300 μm、350 μm、400 μm、450 μm、500 μm、550 μm、600 μm、650 μm、700 μm、750 μm、800 μm、850 μm、900 μm、950 μm、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm、5 mm、6 mm、7 mm、8 mm、9 mm、または10 mmの高さである。

【0017】

そのようなプロセスは、本方法における使用に適した非常に高密度のマイクロキャピラリーアレイを形成する。例示的なアレイにおいて、各マイクロキャピラリーは、約5 μmの直径および約66%の開口空間を有する（すなわち、各マイクロキャピラリーの内腔を表す）。いくつかのアレイでは、開放しているアレイの割合は、約67%の開口面積を有するHamamatsuによって提供されるマイクロキャピラリーアレイのように、約50%～約90%の範囲、例えば約60～75%である。ある特定の例において、直径5 μmのマイクロキャピラリーおよび約66%の開口空間を有する10×10 cmのアレイは、約3億3000万個のマイクロキャピラリーを有する。

10

【0018】

種々の実施形態において、アレイ中の各マイクロキャピラリーの内径は、約1 μm～500 μmの範囲である。いくつかのアレイにおいて、各マイクロキャピラリーは、約1 μm～300 μm、任意選択的に約1 μm～100 μm、さらに任意選択的に約1 μm～75 μm、さらに任意選択的に約1 μm～50 μm、さらに任意選択的に約5 μm～50 μmの範囲の内径を有することができる。

20

【0019】

いくつかのマイクロキャピラリーアレイにおいて、アレイの開口面積は開口面積(OA)の最大90%を占めるため、孔直径が1 μm～500 μmの間で変動する場合、アレイ1 cm当たりのマイクロキャピラリーの数は約460～1,100万個以上の間で変動する。いくつかのマイクロキャピラリーアレイにおいて、アレイの開口面積は開口面積の約67%を占めるため、孔径が1 μm～500 μmの間で変動する場合、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は約340～800,000個以上の間で変動する。いくつかの実施形態において、孔径は1 μm、5 μm、10 μm、50 μm、100 μm、250 μm、350 または500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は5 μm～500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は10 μm～450 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は50 μm～500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は100 μm～500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は250 μm～500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は350 μm～500 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は100 μm～450 μmである。いくつかの実施形態において、孔径は250 μm～450 μmである。

30

いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約400、500、1000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、または800,000個である。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約500～800,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約1000～700,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約2000～600,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約10,000～800,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約10,000～700,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において

40

50

、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約50,000~800,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約50,000~700,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約100,000~700,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約100,000~600,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約100,000~500,000個の間で変動する。いくつかの実施形態において、アレイ1平方cm当たりのマイクロキャピラリーの数は、約500,000~800,000個の間で変動する。

10

**【0020】**

特定の一実施形態において、マイクロキャピラリーアレイは、数十億個のシリカキャピラリーを結合し、次いで熱プロセスを通じてそれらを溶融することによって製造することができる。その後、スライス(0.5mm以上)を切り出して非常に高いアスペクト比のガラスマイクロキャピラリーアレイを形成する。アレイはまた、Hamamatsu Photonics K.K.(日本)、Incom, Inc.(マサチューセッツ州)、Photonis Technologies, S.A.S.(フランス) Inc.等から市販されている。いくつかの実施形態において、アレイのマイクロキャピラリーは、一端において、アレイに付着した固体基材で閉鎖されている。

**【0021】**

20

本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーアレイは、アレイ内に任意の数のマイクロキャピラリーを含むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロキャピラリーアレイは、少なくとも100,000、少なくとも300,000、少なくとも1,000,000、少なくとも3,000,000、少なくとも10,000,000個、またはさらにそれ以上のマイクロキャピラリーを含む。アレイ内のマイクロキャピラリーの数は、スクリーニングされる変異体タンパク質ライブラリーのサイズを考慮して選択されるのが好ましい。

**【0022】**

上記のように、本スクリーニング方法で使用されるマイクロキャピラリーアレイ中の各キャピラリーは、変異体タンパク質、固定化標的分子、およびレポーターエレメントを含み、変異体タンパク質はスクリーニング方法に供される変異体タンパク質の集団の1つである。変異体タンパク質の集団は、マイクロキャピラリーアレイ内に適切に分布させることができる任意のタンパク質の集団であり得る。理想的には、各マイクロキャピラリーが少数の異なる変異体タンパク質、好ましくはマイクロキャピラリー当たり単一の異なる変異体タンパク質を含むように、変異体タンパク質の集団がマイクロキャピラリーアレイに分布している。重要なのは、集団内の少なくともいくつかのタンパク質が特定の親和性で固定化標的分子と会合することができ、その結果、レポーターエレメントからのシグナルを測定することによって会合が検出できるように、変異体タンパク質の集団が固定化標的分子と組み合わせると選択されるということである。いくつかの実施形態において、本発明のマイクロキャピラリースクリーニング方法は、マイクロキャピラリーへの成分の添加から数分以内に変異体タンパク質と標的分子との間で起こる反応および/または相互作用(結合相互作用を含む)のスクリーニングを可能にする。いくつかの実施形態において、変異体タンパク質と標的分子との反応および/または相互作用は、約1分~約10分以内に起こる、および/または検出可能である。いくつかの実施形態において、変異体タンパク質と標的分子との反応および/または相互作用は、約1時間~約6時間以内に起こる、および/または検出可能である。いくつかの実施形態において、変異体タンパク質と標的分子との反応および/または相互作用は、マイクロキャピラリー内の細胞が生存し、かつ健康であるような期間内に起こる、および/または検出可能である。いくつかの実施形態において、変異体タンパク質と標的分子との反応および/または相互作用は、マイクロキャピラリー内の細胞が生存可能であるような期間内に起こる、および/または検出可能であ

30

40

50

る。いくつかの実施形態において、細胞は、マイクロキャピラリーおよび/またはマイクロキャピティから取り出した後に増殖させることができる。いくつかの実施形態において、細胞は、マイクロキャピラリーおよび/またはマイクロキャピティから取り出した後に生存可能である。いくつかの実施形態において、変異体タンパク質と標的分子との反応および/または相互作用はマイクロキャピラリー内で起こる。

#### 【0023】

本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、全長タンパク質またはポリペプチド配列の両方、およびその断片を指す。そのような断片は、例えば、結合活性等の機能的活性を保持する断片を含み得る。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本開示を通して互換的に使用され、ペプチド結合を介して共有結合したアミノ酸の鎖を含み、ポリペプチド中の各アミノ酸は「アミノ酸残基」と称され得る。用語「タンパク質」または「ポリペプチド」の使用は、いずれか特定の長さのポリペプチド、例えば、いずれか特定の数のアミノ酸残基に限定されるとみなされるべきではない。主題のタンパク質は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、硫酸化等を含む翻訳後修飾等の非ペプチド修飾、またはアルキル化、アセチル化、エステル化、PEG化等の他の化学修飾を有するタンパク質を含み得る。ポリペプチド配列内の非天然アミノ酸の包含またはアミノ酸残基間の非ペプチド結合等のさらなる修飾もまた、用語「タンパク質」または「ポリペプチド」の定義の範囲内で考慮されるべきである。

#### 【0024】

変異体タンパク質の集団は、好ましくは、小さな変異を有するタンパク質の集団、例えば、各タンパク質がわずかに異なるアミノ酸配列を有するタンパク質の集団である。したがって、スクリーニングアッセイは、望ましい特性を有する変異体タンパク質配列を同定することができる。スクリーニングは顕微鏡規模で非常に大量に行うことができるため、膨大な数の変異体タンパク質を比較的短時間でアッセイすることができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは4時間~6時間以内に実施される。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは4時間、5時間、または6時間以内に実施される。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは、マイクロキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）あたり1~3秒を要する。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは、マイクロキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）あたり約1秒を要する。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは、マイクロキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）あたり約2秒を要する。いくつかの実施形態では、スクリーニングプロセスは、マイクロキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）あたり約3秒を要する。

#### 【0025】

いくつかの実施形態において、マイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、変異体タンパク質の集団由来の0~5個の異なる変異体タンパク質を含む。特定の実施形態において、マイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、変異体タンパク質の集団由来の0~4、0~3、0~2、またはさらには0~1個の異なる変異体タンパク質を含む。変異体タンパク質の集団中の異なる変異体タンパク質は、それらのアミノ酸配列またはタンパク質の他の何らかの化学修飾に相違点があるかどうかにかかわらず、それらの分子構造が異なることを理解されたい。

#### 【0026】

各マイクロキャピラリーは、特定の変異体タンパク質の起源および発現レベルに応じて、典型的には、同じ変異体タンパク質の多くの複数のコピーを含むことを理解されたい（下記参照）。いくつかの実施形態において、各マイクロキャピラリーは、変異体タンパク質がマイクロキャピラリーにどのように送達されるかまたはその中でどのように発現されるかに応じて、特定の変異体タンパク質の数千、数万、数十万、数百万、数十億個、また

10

20

30

40

50

はさらにはそれ以上の分子を含む。

【0027】

変異体タンパク質の集団は、典型的には、生物学的発現系、例えばインビトロ（すなわち無細胞）発現系またはインビボもしくは細胞発現系において遺伝子ライブラリーを用いて生成される。例示的な細胞発現系として、例えば、動物系（例えば、哺乳動物系）、真菌系（例えば、酵母系）、細菌系、昆虫系、または植物系が挙げられる。特定の実施形態において、発現系は哺乳動物系または酵母系である。発現系は、細胞性であれ無細胞性であれ、典型的には、変異体タンパク質の集団をコードする遺伝物質のライブラリーを含む。細胞発現系は、望ましい表現型を有する細胞、例えば、固定化標的分子と高い親和性で会合することができる変異体タンパク質等の特定の目的の変異体タンパク質を発現する細胞を成長および増殖させることができるという利点を提供し、したがって、細胞によって発現される目的のタンパク質の同定および特徴付けを単純化する。

10

【0028】

大規模な変異体タンパク質の集団をコードする遺伝子ライブラリーは、生物工学の分野で周知である。そのようなライブラリーは、標的分子への高親和性結合、安定性、高発現、または特定の分光学的活性、例えば、蛍光もしくは酵素活性等の有利な特性を有するタンパク質を同定するための定向進化のプロセスに依存するシステムにおいてしばしば利用される。多くの場合、ライブラリーは、宿主発現系由来の配列との遺伝的融合、例えば、亜細胞局在化を指示するタンパク質の断片を含み、変異体融合タンパク質の発現集団は、変異体タンパク質集団の活性スクリーニングのために、標的断片によって細胞またはウイルス粒子の特定の位置に向けられる。当技術分野で周知のように、日常的な生物工学技術を使用して、多数の変異体タンパク質（例えば、 $10^6$ 変異体、 $10^8$ 変異体、 $10^{10}$ 変異体、 $10^{12}$ 変異体、またはさらにはそれ以上の変異体）を生成することができる。そのようなライブラリーは、抗体、抗体断片、一本鎖可変断片、または天然タンパク質リガンドを含む、本明細書に記載の変異体タンパク質のうちのいずれかを含み得る。

20

【0029】

したがって、いくつかの実施形態において、変異体タンパク質は可溶性タンパク質、例えば、細胞発現系によって分泌される可溶性タンパク質である。例示的な可溶性変異体タンパク質として、抗体および抗体断片、ジスルフィド結合したペプチド足場等の代替タンパク質足場、細胞表面受容体タンパク質の細胞外ドメイン、例えばGタンパク質共役受容体リガンド等の受容体リガンド、他のペプチドホルモン、レクチン等が挙げられる。有利には、所望の結合活性を有する変異体タンパク質およびそれを発現した細胞は、アッセイを通して同じマイクロキャピラリー内に共同在するため、本方法において結合活性についてスクリーニングされる変異体タンパク質は、スクリーニングアッセイ後に同定されるためにそれらを発現する細胞またはウイルスに共有結合される必要がない。所望のマイクロキャピラリーの内容物の単離、それに続く所望の変異体タンパク質の発現に關与する細胞またはウイルスクローンの増殖は、それによってそのタンパク質の同定および特徴付けを可能にする。細胞またはウイルス粒子の表面上の分子へのタンパク質の融合によって目的の変異体タンパク質が提示されるスクリーニングアッセイとは異なり、本スクリーニング方法で同定される変異体タンパク質は、それらの同定後にまったく変更される必要がない。したがって、スクリーニングにおいて観察される変異体タンパク質の活性は、それらの後の用途におけるそれらのタンパク質の実際の活性を表す可能性がより高い。

30

40

【0030】

しかしながら、他の実施形態において、変異体タンパク質が膜結合性タンパク質、例えば、発現系において細胞またはウイルス粒子の表面と結合したままのタンパク質であることが望ましい場合がある。細胞結合性変異体タンパク質のスクリーニングは、変異体タンパク質およびその標的分子が生体組織内の2つの細胞間の相互作用を媒介する場合に望ましい可能性がある。また、細胞結合性変異体タンパク質に対してスクリーニングする能力は、例えば、Gタンパク質共役受容体またはイオンチャネル等の従来的に「新薬の開発につながらない」タンパク質標的との相互作用についてスクリーニングする際にも望ましい

50

場合がある。

【0031】

変異体タンパク質に加えて、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、固定化標的分子も含む。固定化標的分子は、スクリーニングアッセイの変異体タンパク質に対する潜在的結合パートナーとして機能する。各マイクロキャピラリーが理想的にはわずかに異なる配列の変異体タンパク質を含む変異体タンパク質の集団とは異なり、固定化された標的分子は、理想的にはアレイの各マイクロキャピラリー中に同じ分子構造を有する。

【0032】

いくつかの実施形態において、標的分子は、標的タンパク質もしくはポリペプチド、標的核酸、標的炭水化物、標的脂質、またはこれらの標的分子の2つ以上の組み合わせである。例えば、いくつかの実施形態において、標的分子は脂質修飾タンパク質またはグリコシル化タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、標的分子は表面上に固定化される。より具体的な実施形態において、標的分子は、標的細胞等の細胞の表面、ビーズの表面、マイクロキャピラリー壁の表面、または別の適切な表面上に固定化される。他のより具体的な実施形態において、標的分子は天然タンパク質、例えば、細胞の表面上に固定化された天然タンパク質である。さらに他のより具体的な実施形態において、標的分子は、重力沈降によってマイクロキャピラリー中に沈殿するように構成される表面上に固定化される。

10

【0033】

前述のように、本開示の方法において、変異体タンパク質は、マイクロキャピラリー内で特定の親和性で固定化標的分子と会合する。重要なのは、会合がレポーターエレメントからのシグナルによって測定され得るように、そのような親和性は目的の変異体タンパク質に対して十分に強くなければいけないということである。当業者には十分に理解されるように、結合親和性は、典型的には解離定数 ( $K_d$ ) によって評価され、解離定数が低いほど親和性が高い。いくつかの実施形態において、目的の変異体タンパク質と固定化標的分子との会合は、ミリモルからマイクロモルの範囲の解離定数を示す。特定の実施形態において、会合は、マイクロモルから高ナノモル (すなわち、 $10^{-6} M \sim 10^{-8} M$ ) の解離定数を示す。より具体的な実施形態において、会合は、低ナノモルから高ピコモル (すなわち、 $10^{-8} M \sim 10^{-10} M$ ) の解離定数を示す。さらにより具体的な実施形態において、会合は、ピコモル範囲 (すなわち、 $10^{-10} M \sim 10^{-12} M$ )、またはさらに低い解離定数を示す。いくつかの実施形態において、第1の細胞は変異体タンパク質またはポリペプチドを発現および分泌し、第2の細胞は標的を含み、その結果、第1の細胞が第2の細胞に結合する。いくつかの実施形態において、第2の細胞は標的を発現する。いくつかの実施形態において、第2の細胞は標的で標識される。いくつかの実施形態において、第1の細胞はマイクロキャピラリー中の第2の細胞に結合する。いくつかの実施形態において、第1の細胞は、マイクロキャピラリーおよび/またはマイクロキャピティ中の第2の細胞に結合する。

20

【0034】

いくつかの実施形態において、標的分子は、標的タンパク質もしくはポリペプチド、標的核酸、標的炭水化物、標的脂質、またはこれらの標的分子の2つ以上の組み合わせである。例えば、いくつかの実施形態において、標的分子は脂質修飾タンパク質またはグリコシル化タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、標的分子は表面上に固定化される。より具体的な実施形態において、標的分子は、標的細胞等の細胞の表面、ビーズの表面、マイクロキャピラリー壁の表面、または別の適切な表面上に固定化される。他のより具体的な実施形態において、標的分子は天然タンパク質、例えば、細胞の表面上に固定化された天然タンパク質である。さらに他のより具体的な実施形態において、標的分子は、重力沈降によってマイクロキャピラリー中に沈殿するように構成される表面上に固定化される。いくつかの実施形態において、1、2、3、もしくは4つ、またはそれ以上の標的分子に結合する変異体を同定するために、1、2、3、もしくは4つ、またはそれ以

40

50

上の標的分子が用いられる。いくつかの実施形態において、標的分子は、別々の異なるマイクロキャピラリーに別々に含まれる。いくつかの実施形態において、標的分子は、単一アレイ内の別々の異なるマイクロキャピラリーに別々に含まれる。いくつかの実施形態において、標的分子は、1つ以上のアレイ内の別々の異なるマイクロキャピラリーに別々に含まれる。いくつかの実施形態において、標的分子は単一マイクロキャピラリーと一緒に含まれる。いくつかの実施形態において、標的分子は単一アレイ内の単一マイクロキャピラリーと一緒に含まれる。いくつかの実施形態において、変異体が結合する1、2、3、もしくは4つ、またはそれ以上の標的分子は、化学修飾、二次翻訳後修飾、または配列同一性変異体（例えば、元の核酸またはアミノ酸標的配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の配列同一性を有する変異体を含む）を含む、元の標的分子の誘導体または変異体である。

10

## 【0035】

変異体タンパク質および固定化標的分子に加えて、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、レポーターエレメントも含む。重要なのは、レポーターエレメントが変異体タンパク質と固定化標的分子との会合を示す測定可能なシグナルを提供し、したがって目的の変異体タンパク質を含むマイクロキャピラリーを特定する役割を果たすということである。

## 【0036】

いくつかの実施形態において、レポーターエレメントは、変異体タンパク質の集団中の各変異体タンパク質に結合することができる標識抗体または他の分子である。より具体的には、レポーターエレメントは、蛍光標識抗体または他の結合分子である。

20

## 【0037】

いくつかの実施形態において、標識抗体は、標識一次抗体または標識二次抗体である。本開示の目的のために、一次抗体は、典型的には、目的の抗原に直接結合する抗体であると考えられ、二次抗体は、典型的には、一次抗体標識の目的で一次抗体上の定常領域に結合する抗体であると考えられる。したがって、二次抗体は、フルオロフォアもしくは他の検出可能な標識で頻繁に標識されるか、または検出可能なシグナルを発生させることができる酵素で標識される。それらは概して、異なる種に由来する一次抗体に特異的である。例えば、当業者には理解されるように、ヤギまたは他の動物種が、マウス、ニワトリ、ウサギ、またはその動物種由来の抗体以外のほぼあらゆる一次抗体に対する二次抗体を生成するために使用され得る。特定の実施形態において、標識抗体は蛍光抗体または酵素結合抗体である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、AlexaFluor3、AlexaFluor5、AlexaFluor350、AlexaFluor405、AlexaFluor430、AlexaFluor488、AlexaFluor500、AlexaFluor514、AlexaFluor532、AlexaFluor546、AlexaFluor555、AlexaFluor568、AlexaFluor594、AlexaFluor610、AlexaFluor633、AlexaFluor647、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、およびAlexaFluor750 (Life Technologies, Inc. (USA) から入手可能なMolecular Probes AlexaFluor色素) を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 およびCy7 (GE Life SciencesまたはLumiprobe から入手可能) を含む、Cy色素を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、DyLight350、DyLight405、DyLight488、DyLight550、DyLight594、DyLight633、DyLight650、DyLight680、DyLight750およびDyLight800 (Thermo Scientific (USA) から入手可能) を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、FluoProbes390、FluoProbes488、FluoProbes532、FluoP

30

40

50

robes 547H、FluoProbes 594、FluoProbes 647H、FluoProbes 682、FluoProbes 752およびFluoProbes 782、AMCA、DEAC(7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボン酸);7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン-3;7-ヒドロキシクマリン-3;MCA(7-メトキシクマリン-4-酢酸);7-メトキシクマリン-3;AMF(4'-(アミノメチル)フルオレセイン);5-DTAF(5-(4,6-ジクロロトリアジニル)アミノフルオレセイン);6-DTAF(6-(4,6-ジクロロトリアジニル)アミノフルオレセイン);6-FAM(6-カルボキシフルオレセイン)、5(6)-FAMカダベリン;5-FAMカダベリン;5(6)-FAMエチレンジアミン;5-FAMエチレンジアミン;5-FITC(FITC異性体I;フルオレセイン-5-イソチオシアネート);5-FITCカダベリン;フルオレセイン-5-マレイミド;5-IAF(5-ヨードアセトアミドフルオレセイン);6-JOE(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン);5-CR110(5-カルボキシローダミン110);6-CR110(6-カルボキシローダミン110);5-CR6G(5-カルボキシローダミン6G);6-CR6G(6-カルボキシローダミン6G);5(6)-カルボキシローダミン6Gカダベリン;5(6)-カルボキシローダミン6Gエチレンジアミン;5-ROX(5-カルボキシ-X-ローダミン);6-ROX(6-カルボキシ-X-ローダミン);5-TAMRA(5-カルボキシテトラメチルローダミン);6-TAMRA(6-カルボキシテトラメチルローダミン);5-TAMRAカダベリン;6-TAMRAカダベリン;5-TAMRAエチレンジアミン;6-TAMRAエチレンジアミン;5-TMRC6マレイミド;6-TMRC6マレイミド;TRC2マレイミド;TRCカダベリン;5-TRITC;G異性体(テトラメチルローダミン-5-イソチオシアネート);6-TRITC;R異性体(テトラメチルローダミン-6-イソチオシアネート);ダンシルカダベリン(5-ジメチルアミノナフタレン-1-(N-(5-アミノペンチル))スルホンアミド);EDANS C2マレイミド;フルオレサミン;NBD;およびピロメテン、ならびにそれらの誘導体を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、使用されるレポーターエレメントは、AlexaFluor633で標識されたロバ抗ヤギIgG二次抗体であり得る。

#### 【0038】

本方法の実施形態のいくつかにおいて、例えば、図1A~1Cに示されるスクリーニング方法では、変異体タンパク質はレポーターエレメントと標的分子、この例では標的細胞の表面上の標的分子との会合を媒介する。図1Bに示すように、変異体タンパク質(ここでは「分泌タンパク質」と表される)が標的細胞上のその標的分子に対して十分な親和性を有する場合、変異体タンパク質は、マイクロキャピラリー溶液の条件下で標的細胞と会合する。レポーターエレメント(ここでは「蛍光検出抗体」と表される)は、理想的には、図1Cに示すように、標的分子に対する変異体タンパク質の親和性に影響を及ぼさないエピトープで変異体タンパク質に結合する。

#### 【0039】

当業者には理解されるように、蛍光抗体等の可溶性レポーターエレメントが本スクリーニング方法において使用される場合、マイクロキャピラリー内の溶液中に遊離したままの(すなわち、変異体タンパク質に結合していないか、または標的分子に結合していない変異体タンパク質に結合しているかのいずれか)任意の過剰なレポーターエレメントによって放出されるシグナルは、変異体タンパク質を介して標的分子と会合したレポーターエレメントのシグナルを圧倒するほど高くしてはならない(例えば、図1Cに示される会合していない蛍光検出抗体を参照)。しかしながら、そのようなバックグラウンドシグナルは、マイクロキャピラリー溶液内の標識抗体または他のレポーターエレメントの濃度を制限することによって最小限に抑えることができる。さらに、スクリーニング方法からのシグナルが蛍光顕微鏡を用いて測定される場合、標的分子の位置(例えば、標的細胞が沈降重力によってそこに沈殿した場合、マイクロキャピラリーの底部)を囲む比較的狭い被写界深度を撮像するように顕微鏡を構成することにより、標的分子と会合していないレポーター

エレメントからのバックグラウンドシグナルを最小限に抑えることができる。

【0040】

他の実施形態において、レポーターエレメントは、例えば、変異体タンパク質と固定化標的分子、例えば、細胞の表面上の受容体または他の分子標的との会合等の結合事象に関連して検出可能なシグナルを発生させる細胞内レポーターエレメントである。これらの実施形態において、レポーターエレメントは、例えば細胞内シグナル伝達経路等の全細胞経路を含み得る。そのような経路は、経路の下流読み出しとして検出可能なシグナルを含むか、または含むように操作されるべきである。検出可能なシグナルが標的細胞の外表面に結合している図1A~1Cに示されているアッセイとは対照的に、これらの実施形態における検出可能なシグナルは典型的には標的細胞の内部で発生するであろう。

10

【0041】

多くの細胞内シグナル伝達経路が、ハイスループットスクリーニングアッセイ、特に創薬スクリーニングにおける使用のために開発されており、本アッセイにおける使用に適合させることができる。例えば、Michelinisら(2010)Anal.Bioanal.Chem.398:227-38を参照のこと。特に、細胞表面上の標的分子との結合事象が測定可能なシグナル、特に蛍光シグナルの発生をもたらす任意の細胞アッセイを、本アッセイにおけるレポーターエレメントとして使用することができる。好ましくは、細胞はそれらの表面に目的の標的分子を発現するように操作することができ、その結果、標的分子への特定の変異体タンパク質の結合およびその結果としての細胞内シグナル伝達経路の活性化が、レポーターエレメントからの検出可能なシグナルの産生をもたらし、したがって、ポジティブヒットとしてのマイクロキャピラリーの同定を可能にする。緑色蛍光タンパク質(GFP)、または多種多様な変異体蛍光タンパク質のいずれかの発現は、そのような細胞アッセイにおける読み出しとしてしばしば使用され、本方法におけるレポーターエレメントのエンドポイントとして機能し得る。レポーターエレメントはまた、RFP(赤色蛍光タンパク質)およびYFP(黄色蛍光タンパク質)、ならびにそれらの変異体も含み得る。代替として、当業者には十分に理解されるように、シグナル伝達の読み出しは、ルシフェラーゼまたは生物発光シグナルを産生する他の関連酵素によって提供され得る。例えば、Kelkar et al.(2012)Curr.Opin.Pharmacol.12:592~600を参照のこと。細菌系および植物系由来の他の周知の酵素レポーターとして、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)等が挙げられ、これらは適切な発色基質を用いて本スクリーニングアッセイにおける使用に適合させることができる。ホタルルシフェラーゼおよびGFPを用いた転写レポーターは、転写因子の機能および制御を研究するために広く使用されてきた。それらは同様に、本スクリーニングアッセイにおける使用に適合させることができる。例示的な細胞内シグナル伝達系は市販されており、例えば、ルシフェラーゼまたはGFPのいずれかの読み出しによって利用可能な、QiagenのSignal(商標)Reporter Assayキット(例えば、www.sabiosciences.com/reporterassays.phpを参照)がある。そのようなシステムは、本スクリーニング方法で使用するために適切に再設計することができる。

20

30

40

【0042】

変異体タンパク質発現系は、特に発現系が細胞発現系である場合、変異体タンパク質の発現の前および/またはマイクロキャピラリーのアレイにアッセイ混合物を送達する前に、固定化標的分子およびレポーターエレメント(または固定化標的分子および/またはレポーターエレメントの生成に関与する細胞成分等の適切な成分)と組み合わせられ得ることを理解されたい。そのようなアプローチは、有利には、スクリーニングアッセイの全成分が典型的には静的形態で混合されてマイクロキャピラリーに装填される従来技術のマイクロキャピラリースクリーニングシステムと比較して、成分間の相互作用のタイミングにおける柔軟性および制御を可能にする。対照的に、本方法は、細胞成分の増殖、遺伝子成分の発現、またはその両方を可能にすることによってかのいずれかで、結合アッセイの成

50

分の一部または全部をマイクロキャピラリー内でインサイチュで生成することを可能にする。

【 0 0 4 3 】

変異体タンパク質の濃度、固定化標的分子の濃度、およびレポーターエレメントの濃度を含む、マイクロキャピラリー内のスクリーニングアッセイの各成分の濃度は、最適な結果を得るために、アッセイにおいて所望の通りに調節することができることも理解されたい。特に、これらの成分間の所望のレベルの会合を達成するために、変異体タンパク質および/または固定化標的分子の濃度を調節することが望ましい場合がある。会合のレベルはまた、これらの成分間の特定の親和性にも依存し、より高い親和性は所与の濃度の成分に対してより高いレベルの会合をもたらす、より低い親和性は所与の濃度に対してより低いレベルの成分の会合をもたらす。当業者には理解されるように、レポーターエレメントの濃度も、最適レベルのシグナル出力を達成するために同様に調節され得る。いくつかの実施形態において、用いられるレポーターエレメントは、市販のものを含む二次抗体を含む。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 200 ~ 1 : 2000である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 300 ~ 1 : 2000である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 300 ~ 1 : 1500である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 400 ~ 1 : 1500である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 500 ~ 1 : 1500である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 200 ~ 1 : 1000である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 500 ~ 1 : 1000である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 1000 ~ 1 : 2000である。いくつかの実施形態において、希釈範囲は1 : 1500 ~ 1 : 2000である。いくつかの実施形態において、希釈は1 : 200、1 : 300、1 : 400、1 : 500、1 : 600、1 : 700、1 : 800、1 : 900、1 : 1000、1 : 1500、または1 : 2000である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、AlexaFluor 3、AlexaFluor 5、AlexaFluor 350、AlexaFluor 405、AlexaFluor 430、AlexaFluor 488、AlexaFluor 500、AlexaFluor 514、AlexaFluor 532、AlexaFluor 546、AlexaFluor 555、AlexaFluor 568、AlexaFluor 594、AlexaFluor 610、AlexaFluor 633、AlexaFluor 647、AlexaFluor 660、AlexaFluor 680、AlexaFluor 700、およびAlexaFluor 750 (Life Technologies, Inc. (USA) から入手可能なMolecular Probes AlexaFluor色素) を含む得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5およびCy7 (GE Life SciencesまたはLumiprobe sから入手可能) を含む、Cy色素を含む得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、DyLight 350、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 550、DyLight 594、DyLight 633、DyLight 650、DyLight 680、DyLight 750およびDyLight 800 (Thermo Scientific (USA) から入手可能) を含む得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、FluoProbes 390、FluoProbes 488、FluoProbes 532、FluoProbes 547H、FluoProbes 594、FluoProbes 647H、FluoProbes 682、FluoProbes 752およびFluoProbes 782、AMCA、DEAC (7 - ジエチルアミノクマリン - 3 - カルボン酸) ; 7 - ヒドロキシ - 4 - メチルクマリン - 3 ; 7 - ヒドロキシクマリン - 3 ; MCA (7 - メトキシクマリン - 4 - 酢酸) ; 7 - メトキシクマリン - 3 ; AMF (4' - (アミノメチル) フルオレセイン) ; 5 - DTA F (5 - (4, 6 - ジクロロトリアジニル) アミノフルオレセイン) ; 6 - DTA F (6 - (4, 6 - ジクロロトリアジニル) アミノフルオレセイン) ; 6 - FAM (6 - カルボキシフルオレセイン)、5 (6) - FAMカダベ

10

20

30

40

50

リン；5 - F A Mカダベリン；5 ( 6 ) - F A Mエチレンジアミン；5 - F A Mエチレンジアミン；5 - F I T C ( F I T C異性体 I ；フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート ) ；5 - F I T Cカダベリン；フルオレセイン - 5 - マレイミド；5 - I A F ( 5 - ヨードアセトアミドフルオレセイン ) ；6 - J O E ( 6 - カルボキシ - 4 ' , 5 ' - ジクロロ - 2 ' , 7 ' - ジメトキシフルオレセイン ) ；5 - C R 1 1 0 ( 5 - カルボキシローダミン 1 1 0 ) ；6 - C R 1 1 0 ( 6 - カルボキシローダミン 1 1 0 ) ；5 - C R 6 G ( 5 - カルボキシローダミン 6 G ) ；6 - C R 6 G ( 6 - カルボキシローダミン 6 G ) ；5 ( 6 ) - カルボキシローダミン 6 Gカダベリン；5 ( 6 ) - カルボキシローダミン 6 Gエチレンジアミン；5 - R O X ( 5 - カルボキシ - X - ローダミン ) ；6 - R O X ( 6 - カルボキシ - X - ローダミン ) ；5 - T A M R A ( 5 - カルボキシテトラメチルローダミン ) ；6 - T A M R A ( 6 - カルボキシテトラメチルローダミン ) ；5 - T A M R Aカダベリン；6 - T A M R Aカダベリン；5 - T A M R Aエチレンジアミン；6 - T A M R Aエチレンジアミン；5 - T M R C 6マレイミド；6 - T M R C 6マレイミド；T R C 2マレイミド；T Rカダベリン；5 - T R I T C；G異性体 ( テトラメチルローダミン - 5 - イソチオシアネート ) ；6 - T R I T C；R異性体 ( テトラメチルローダミン - 6 - イソチオシアネート ) ；ダンシルカダベリン ( 5 - ジメチルアミノナフタレン - 1 - ( N - ( 5 - アミノペンチル ) ) スルホンアミド ) ；E D A N S C 2マレイミド；フルオレサミン；N B D ；およびピロメテン、ならびにそれらの誘導体を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、使用されるレポーターエレメントは、A l e x a F l u o r 6 3 3で標識されたロバ抗ヤギ I g G二次抗体であり得る。

#### 【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、細胞発現系の生存率を改善するための単数または複数の薬剤をさらに含む。具体的には、単数または複数の薬剤は、例えばレーザーパルスによる、目的のマイクロキャピラリーの内容物を単離するステップの間の細胞損傷を防止するために含まれる ( 下記参照 ) 。好ましい実施形態において、薬剤はメチルセルロース ( 例えば 0 . 0 0 1 ~ 1 0 重量 % ) 、デキストラン ( 例えば 0 . 5 ~ 1 0 重量 % ) 、ブルロニック F - 6 8 ( 例えば 0 . 0 1 ~ 1 0 重量 % ) 、ポリエチレングリコール ( 「 P E G 」 ) ( 例えば、0 . 0 1 ~ 1 0 重量 % ) 、ポリビニルアルコール ( 「 P V A 」 ) ( 例えば、0 . 0 1 ~ 1 0 重量 % ) 等である。代替として、または加えて、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーアレイ中の各マイクロキャピラリーは、例えば、5 0 % 馴化増殖培地、2 5 % 標準増殖培地、または 2 5 % 血清等の増殖添加剤をさらに含む得る。いくつかの実施形態において、馴化増殖培地は 2 4 時間馴化される。いくつかの実施形態において、添加される薬剤は、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレン、インスリン様成長因子、もしくはこれらの薬剤の組み合わせ、または上記薬剤のいずれかの組み合わせである。

#### 【 0 0 4 5 】

本開示のスクリーニング方法は、少なくとも 1 つの変異体タンパク質と少なくとも 1 つの固定化標的分子との会合を示す少なくとも 1 つのレポーターエレメントからのシグナルを測定して、少なくとも 1 つの目的のマイクロキャピラリーを同定するさらなるステップを含む。いくつかの実施形態において、測定されるシグナルは、蛍光シグナル、吸光度シグナル、明視野シグナル、または暗視野シグナル、位相差シグナル等である。したがって、測定ステップは、適切な検出器デバイス、例えば、電磁放射線または任意の他の適切なシグナルを検出することができるデバイスによって行うことができる。特定の実施形態において、測定ステップは、蛍光顕微鏡または上記のシグナルを検出するように構成される他の顕微鏡等の顕微鏡によって行われる。

#### 【 0 0 4 6 】

好ましい実施形態において、本スクリーニング方法で利用されるマイクロキャピラリーは、電磁放射線の透過を抑制することができる微粒子を含まないことを理解されたい。言い換えれば、マイクロキャピラリーは、マイクロキャピラリーアレイに入射する電磁放射

線に対して、特にマイクロキャピラリーの縦軸に沿って完全に透明であることが好ましい。他の好ましい実施形態において、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーは、磁性微粒子またはビーズを含まない。さらに他の好ましい実施形態において、本スクリーニング方法のマイクロキャピラリーは、電磁放射線の透過を抑制することができる微粒子、磁性微粒子、または磁性ビーズを含まない。

【0047】

他の好ましい実施形態において、本スクリーニング方法で利用されるマイクロキャピラリーは電磁放射線吸収材料を含まない。しかしながら、スクリーニング方法において測定可能なシグナルを発生することに関与するレポーターエレメントの成分、例えば、蛍光抗体上のフルオロフォアは、本発明のこの態様の目的のために、電磁放射線吸収材料とみなされるべきではないことを理解されたい。

10

【0048】

いくつかの実施形態において、本スクリーニング方法は、目的のマイクロキャピラリーの内容物を単離するステップをさらに含む。特定の実施形態において、目的のマイクロキャピラリーの内容物は、目的のマイクロキャピラリーをレーザーによりパルス発振することによって単離される。いくつかの実施形態において、レーザーはダイオードレーザーである。いくつかの実施形態では、レーザーはナノ秒パルスレーザーである。いくつかの実施形態では、レーザーはピコ秒パルスレーザーである。より具体的には、レーザーはダイオードレーザーまたはダイオード励起QスイッチNd:YLFレーザーであり得る。いくつかの実施形態において、レーザーは、マイクロキャピラリー壁とマイクロキャピラリー

20

【0049】

スクリーニングとサンプル回収のためのシステム

30

本発明の別の態様によれば、以下を含む変異体タンパク質の集団をスクリーニングするためのシステムが提供される：

複数のマイクロキャピラリーを備え、各マイクロキャピラリーが変異体タンパク質、固定化標的分子、およびレポーターエレメントを含み、変異体タンパク質が特定の親和性で固定化標的分子と会合する、アレイ。これらのスクリーニングデバイスの構成要素は上に詳細に記載されている。

【0050】

いくつかの実施形態において、スクリーニングシステムは光源および検出器をさらに備える。いくつかの実施形態において、光源は、Nikon Intensilight Illuminatorである。いくつかの実施形態では、光検出器は、電荷結合素子(CCD)または相補型金属酸化膜半導体(CMOS)撮像センサ等の撮像カメラである。いくつかの実施形態では、光検出器はHamamatsu ORCA-Flash4.0CMOSカメラである。光源および検出器は、スクリーニングシステムで使用される特定のレポーターエレメントに従って選択される。例えば、レポーターエレメントが蛍光シグナルを発生する場合、光源は蛍光プローブを励起するために適切な波長の励起光を供給する。同様に、検出器は、蛍光プローブによって放出される光の波長に感応するように選択される。当業者には理解されるように、光源および検出器は、例えば、蛍光顕微鏡等の顕微鏡の構成要素であり得るか、またはそれらは別々のデバイスであり得る。好ましくは、蛍光顕微鏡は倒立蛍光顕微鏡である。

40

【0051】

50

本方法による変異体タンパク質の集団をスクリーニングするための例示的な顕微鏡を図 6 A ~ 6 E の図面に示す。図 6 A は、顕微鏡の上方からの斜視図を示しており、スクリーニングアレイステージ 12、回収アレイ 14、回収アレイホルダ 16、第 1 の回収アレイステージ 18、および第 2 の回収アレイステージ 20 を示している。図 6 B はデバイスの正面図を示す。図 6 C は右側からの図を示す。デバイスの右側の拡大図が図 6 D に提供されており、システム内のスクリーニングアレイステージと回収アレイステージと回収アレイとの関係を詳細に示している。図 6 E は、この特定のマルチステージサンプル回収システムの様々な構成要素の分解図を提供する。

#### 【 0 0 5 2 】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、マルチステージサンプル回収システムであって、

10

スクリーニングアレイステージであって、顕微鏡対物レンズに対して二次元で制御可能であり、スクリーニングアレイと可逆的に連携するように構成されている、スクリーニングアレイステージと、

第 1 の回収アレイステージであって、顕微鏡対物レンズに対して少なくとも一次元で制御可能であり、回収アレイと可逆的に連携するように構成されている、第 1 の回収アレイステージと、を備え、

スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは互いに独立して制御可能である、システムを提供する。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは互いに物理的に離れている。いくつかの実施形態では、二次元で制御可能なスクリーニングアレイステージは、顕微鏡対物レンズに対して水平次元および/または垂直次元で制御可能である。いくつかの実施形態では、少なくとも一次元で制御可能な第 1 の回収アレイステージは、顕微鏡対物レンズに対して水平次元および/または垂直次元で制御可能である。いくつかの実施形態では、少なくとも一次元で制御可能な第 1 の回収アレイステージは、顕微鏡対物レンズに対して水平次元で制御可能である。いくつかの実施形態では、少なくとも一次元で制御可能な第 1 の回収アレイステージは、顕微鏡対物レンズに対して垂直次元で制御可能である。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、垂直次元で第 1 の回収アレイステージのより近くに配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、垂直次元で回収アレイステージからより離れて配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは、サンプル回収プロセス中に移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、第 1 の回収アレイステージは、サンプル回収プロセス中に移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元と垂直次元の両方で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第 1 の回収アレイステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第 1 の回収アレイステージに移動する。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第 1 の回収アレイステージに回収される。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第 1 の回収アレイステージに移動し、この移動は、スクリーニングアレイステージおよび/または第 1 の回収アレイステージの移動および/または再配置によって促進される。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第 1 の回収アレイステージに移動し、この移動は、スクリーニングアレイステージの移動および/または再配置によって促進される。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリー

20

30

40

50

ニングアレイステージから第1の回収ステージに移動し、この移動は、第1の回収ステージの移動および/または再配置によって促進される。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第1の回収ステージに回収され、この回収は、スクリーニングアレイステージおよび/または第1の回収ステージの移動および/または再配置によって促進される。

いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第1の回収ステージに回収され、この回収は、スクリーニングアレイステージの移動および/または再配置によって促進される。いくつかの実施形態では、サンプル回収プロセス中に、サンプルがスクリーニングアレイステージから第1の回収ステージに回収され、この回収は、第1の回収ステージの移動および/または再配置によって促進される。

10

いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元または垂直次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができる。

いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元または垂直次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができる。いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができる。

20

いくつかの実施形態では、レーザーは固定された位置にある。いくつかの実施形態では、レーザーは顕微鏡対物レンズに対して固定された位置にある。いくつかの実施形態では、レーザーは、第1の回収ステージを通過する前にスクリーニングアレイステージを通過する。いくつかの実施形態では、レーザーは、第1の回収ステージを通過する前にスクリーニングアレイステージを通過し、サンプルをスクリーニングアレイステージから第1の回収ステージに移動させる。

いくつかの実施形態では、レーザーは最初にスクリーニングアレイステージを通過し（例えば、活性化され、発射する）、サンプルをスクリーニングアレイステージから第1の回収ステージに移動させる。いくつかの実施形態では、サンプルは、スクリーニングアレイステージから第1の回収ステージへとレーザーによって移動させられる。いくつかの実施形態において、レーザーは、スクリーニングアレイステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）を通過し、第1の回収ステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）に入る）に至る。

30

いくつかの実施形態において、レーザーは、スクリーニングアレイステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）を通過し、第1の回収ステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）に入る）に至り、サンプルを、スクリーニングアレイステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）から、第1の回収ステージ内の1つのキャピラリー（すなわち、キャピティ、マイクロキャピラリー、マイクロキャピティ、ポア、および/またはマイクロポア）に入る）に移動させる。

いくつかの実施形態では、レーザーは固定された位置に留まる（すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない）。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元および/または垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる（すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない）。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる（すなわち、顕微鏡対物レン

40

いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元および/または垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる（すなわち、顕微鏡対物レン

いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる（すなわち、顕微鏡対物レン

50

ズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元および/または垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元および/または垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、水平次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、第1の回収ステージは、サンプル回収プロセス中に、垂直次元で、移動および/または再配置することができるが、一方で、レーザーは固定された位置に留まる(すなわち、顕微鏡対物レンズに対して移動しない)。いくつかの実施形態では、2つのステージ間の垂直距離は約20mmである。いくつかの実施形態では、スクリーニングステージと回収ステージとの間の垂直距離は約20mmである。いくつかの実施形態では、スクリーニングステージに配置されている(例えば、陥凹している)スクリーニングアレイと、回収ステージに配置されている(例えば、陥凹している)回収スライドとの間にギャップがある。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する回収スライドとの間の間隙は、約1mm、約2mm、または約3mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する回収スライドとの間の間隙は、約1mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する回収スライドとの間の間隙は、約2mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する回収スライドとの間の間隙は、約3mmである。いくつかの実施形態では、回収スライドは、第1の回収アレイと呼ばれる。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する第1の回収アレイとの間の間隙は、約1mm、約2mm、または約3mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する第1の回収アレイとの間の間隙は、約1mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する第1の回収アレイとの間の間隙は、約2mmである。いくつかの実施形態では、陥凹しているおよび/またはスクリーニングステージに位置するスクリーニングアレイと、陥凹しているおよび/または回収ステージに位置する第1の回収アレイとの間の間隙は、約3mmである。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージと回収ステージは、顕微鏡対物レンズがスクリーニングアレイと回収スライドの両方を撮像できるように、配置される。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収アレイステージは、顕微鏡対物レ

10

20

30

40

50

レンズがスクリーニングアレイと第1の回収アレイとの両方を撮像できるように、配置される。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイは対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態では、第1の回収アレイは対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイおよび第1の回収アレイは対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージは対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態では、第1の回収アレイステージは対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイステージおよび第1の回収アレイステージは対物レンズの作動距離内にある。作動距離は、通常、顕微鏡対物レンズが結像することができる距離である（すなわち、対物レンズの作動距離は、対物レンズの前部レンズとサンプルとの間のギャップまたは距離である）。いくつかの実施形態では、顕微鏡対物レンズの作動距離は約1 mm ~ 約30 mmである。いくつかの実施形態では、顕微鏡対物レンズの作動距離は約5 mm ~ 約25 mmである。いくつかの実施形態では、顕微鏡対物レンズの作動距離は約10 mm ~ 約25 mmである。いくつかの実施形態では、顕微鏡対物レンズの作動距離は約10 mm ~ 約20 mmである。いくつかの実施形態では、本方法で使用される顕微鏡の移動距離は約1 mm ~ 約30 mmである。いくつかの実施形態では、本方法で使用される顕微鏡の移動距離は約5 mm ~ 約25 mmである。移動距離は、通常、顕微鏡のZ軸が移動できる距離である。いくつかの実施形態では、本方法で使用される顕微鏡の移動距離は、約10 mm ~ 約25 mmである。いくつかの実施形態では、本方法で使用される顕微鏡の移動距離は、約10 mm ~ 約20 mmである。いくつかの実施形態では、回収アレイは第1の回収アレイである。いくつかの実施形態では、回収アレイは第2の回収アレイである。いくつかの実施形態では、マイクロキャピラリーアレイは作動距離内にある。いくつかの実施形態では、マイクロキャピラリーアレイは、マイクロキャピラリーアレイに焦点を合わせることができるよう投影または対物レンズの作動距離内にある。いくつかの実施形態において、顕微鏡システムは、マイクロキャピラリーアレイと回収アレイおよび/または回収スライドの両方に焦点を合わせる能力を有する。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイと回収アレイおよび/または回収スライドの両方が対物レンズの移動距離内にある。

10

20

いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイは対物レンズの移動距離内にある。いくつかの実施形態では、回収アレイおよび/または回収スライドは対物レンズの移動距離内にある。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイと回収アレイおよび/または回収スライドの両方が対物レンズの移動距離内にあり、スクリーニングアレイと回収アレイおよび/または回収スライドに焦点を合わせることができるようになっている。例示的な実施形態として、次の段落で説明されているように、および本出願を通して、図6A ~ 図6Eを含めて本明細書で提供される図を参照されたい。

30

#### 【0053】

上述のように、例示的なサンプル回収システムの様々な図が図6A ~ 図6Eに提供されている。具体的には、図6Eは、スクリーニングアレイステージ12、回収アレイ14、回収アレイホルダ16、第1の回収アレイステージ18、第2の回収アレイステージ20、および顕微鏡対物レンズ22の相対配置を示す。抽出ビーム、この場合はレーザービーム、およびスクリーニングアレイ画像の光路は、それぞれ図6B ~ 図6Dに示される3つの視点から「レーザービーム経路」および「結像経路」として示されている。スクリーニングアレイステージは、好ましくは、連携するアレイを通る光ビームの透過を可能にする開口部内に、マイクロスケールサンプル容器のアレイを収容するように構成されている。そのようなステージは図7Aにより詳細に示されている。例示的な回収アレイステージは図7Bに示されている。回収アレイと回収アレイステージとの可逆的な連携を容易にするために、例えば図6Eに示すように、少なくとも1つの回収アレイステージを回収アレイホルダに接続することが好ましい。可逆的連携は、サンプル回収プロセスの前、最中、または後に、回収アレイが回収アレイステージ（例えば、第1の回収ステージ）と連携し、連携を解除することができる能力を指す。いくつかの実施形態では、可逆的は、場合によっては1回を超えて、回収アレイをシステム内に配置すること、および/またはシステム

40

50

から取り外すことができることを示す。いくつかの実施形態では、回収アレイは、ばね張力、重力、磁力、摩擦、ねじ/締結具、および/またはベルクロを介して回収アレイステージと可逆的に連携している。

【0054】

好ましい実施形態では、マルチステージサンプル回収システムは、スクリーニングアレイステージと可逆的に連携するスクリーニングアレイをさらに含む。可逆的連携とは、サンプル回収プロセスの前、最中、または後に、スクリーニングアレイがスクリーニングアレイステージと連携し、連携を解除することができる能力を指す。いくつかの実施形態では、可逆的とは、場合によっては1回を超えて、スクリーニングアレイをシステム内に配置すること、および/またはシステムから取り外すことができることを示す。いくつかの実施形態では、スクリーニングアレイは、ばね張力、重力、磁力、摩擦、ねじ/締結具、および/またはベルクロを介してスクリーニングアレイステージと可逆的に連携している。当業者には理解されるように、このようなスクリーニングアレイは、典型的には複数のマイクロスケールサンプル容器、好ましくは上記により詳細に記載された複数のマイクロキャピラリーを含むが、他のスクリーニングアレイは、本システムにおいて適切に利用することができる。

10

【0055】

他の好ましい実施形態では、本マルチステージサンプル回収システムは、第1の回収アレイステージと可逆的に連携する回収アレイをさらに含む。より具体的には、回収アレイは、回収容器または複数の回収容器を含む。例えば図6Aおよび6Eの回収アレイ14に示されるようなそのような回収容器は、いくつかの実施形態において、細胞損傷を防止するようにつ/または細胞増殖を促進するように構成され得る。例えば、回収アレイ内の各回収容器は、細胞損傷を防止するための薬剤または複数の薬剤を含むことができる。いくつかの実施形態において、薬剤はメチルセルロース（例えば0.001~10重量%）、デキストラン（例えば0.5~10重量%）、プルロニックF-68（例えば0.01~10重量%）、ポリエチレングリコール（「PEG」）（例えば、0.01~10重量%）、ポリビニルアルコール（「PVA」）（例えば、0.01~10重量%）等である。代替的に、または追加的に、各回収容器は、例えば50%の培養上清、25%の標準増殖培地、25%の血清、または別の適切な増殖添加剤等の増殖添加剤を含み得る。どちらも2016年12月12日に出願された米国特許出願第62/433,210号および同第15/376,588号も参照されたい。いくつかの実施形態において、馴化増殖培地は24時間馴化される。いくつかの実施形態において、添加される薬剤は、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレン、インスリン様成長因子、もしくはこれらの薬剤の組み合わせ、または上記薬剤のいずれかの組み合わせである。細胞増殖を促進するための回収容器の構成は、細胞培養の技術分野の当業者にはよく理解されている。

20

30

【0056】

いくつかの実施形態では、回収容器は、ポリメラーゼ連鎖反応もしくは逆転写ポリメラーゼ連鎖反応等の増幅反応に、またはDNAシークエンシング反応等のシークエンシング反応に構成することができる。本サンプル回収システムを使用してスクリーニングアレイから回収されたサンプルを同定または特徴付けるのに有用な増幅反応、シークエンシング反応、または任意の他のそのような分析反応のための回収容器の構成は、分析技術の当業者によってよく理解されている。

40

【0057】

好ましい実施形態では、マルチステージサンプル回収システムは、スクリーニングアレイステージと可逆的に連携するスクリーニングアレイと、第1の回収アレイステージと可逆的に連携する回収アレイとの両方を備える。より具体的には、スクリーニングアレイは複数のマイクロスケールサンプル容器を含み、回収アレイは複数の回収容器を含む。

【0058】

上述のように、本マルチステージサンプル回収システムは、典型的には、スクリーニングアレイ内の対象のサンプルを識別するための光源および光検出器を含む。いくつかの場

50

合において、例えば生物発光シグナルがモニターされている場合、別個の光源は必要とされ得ず、そしてシステムは光検出器のみを含み得る。いずれの場合も、光検出器は通常、スクリーニングアレイをスクリーニングアレイステージの開口部を通して検出器に光学的に結合することによって、スクリーニングアレイ内のサンプルから放出された光シグナルをモニターするように構成される。上述のように、スクリーニングアレイのサンプル容器内のレポーターエレメントからの光シグナルを観察することにより、対象のサンプルを保持する特定のサンプル容器を識別することができ、次いでこれらのサンプル容器の内容物を抽出ビーム発生器からのパルスによって回収できる。光検出器、例えば電荷結合素子（CCD）または相補型金属酸化膜半導体（CMOS）撮像センサ等の撮像カメラは、理想的には、単一視野内のスクリーニングアレイから多数のサンプル容器を撮像することができる。いくつかの実施形態では、光検出器は電荷結合素子（CCD）である。いくつかの実施形態では、光検出器は相補型金属酸化膜半導体（CMOS）撮像センサである。いくつかの実施形態では、光検出器はフォトダイオードである。蛍光標識がレポーターエレメントに使用される場合、イメージング検出器は典型的には電磁スペクトルの可視範囲におけるそれらの感度で選択される。スクリーニングアレイからの蛍光放出は、典型的には顕微鏡対物レンズを介して、システムの結像経路を介して光検出器に向けられる。例えば、Nikon Eclipseシリーズ倒立顕微鏡等の市販の顕微鏡は、当業者には理解されるように、本システムでの使用に適切に適合させることができる。

10

## 【0059】

いくつかの実施形態では、マルチステージサンプル回収システムは、スクリーニングアレイステージの開口部を通してスクリーニングアレイの1つのマイクロスケールサンプル容器に光学的に結合された抽出ビーム発生器をさらに含む。より具体的には、抽出ビームは、レーザービーム、例えば、ダイオードレーザー、ダイオード励起QスイッチNd:YLFレーザー等のダイオード励起Qスイッチレーザー、または別の適切なレーザーデバイスによって放出されるビームであり得る。いくつかの実施形態において、レーザーはダイオードレーザーである。いくつかの実施形態では、レーザーはナノ秒パルスレーザーである。いくつかの実施形態では、レーザーはピコ秒パルスレーザーである。システムがマイクロキャピラリーのアレイを含む場合、抽出ビームは、マイクロキャピラリー壁とマイクロキャピラリーに含まれるサンプルとの間の水-ガラス界面に向けることができる。マイクロキャピラリーのアレイ内の蛍光イメージングによって同定された特定のマイクロキャピラリーの内容物を単離するためのレーザーの使用は、以前に記載されている。例えば、Chen et al. (2016) Nature Chem. Biol. 12: 76-81; DOI: 10.1038/NCHEM BIO.1978および米国特許出願公開第2016/0244749A1号を参照されたい。

20

30

## 【0060】

好ましい実施形態では、抽出ビームは、標的マイクロスケールサンプル容器の下から向けられる。しかしながら、必要に応じて、抽出ビームを、代替的に標的化マイクロスケールサンプル容器の上方から向けることができることも理解されるべきである。

## 【0061】

特定の実施形態では、システムは第2の回収アレイステージをさらに備える。より具体的な実施形態では、第2の回収アレイステージは第1の回収アレイステージに対して直角に配置されている。これらの実施形態によれば、サンプルは、スクリーニングアレイから、規則的な格子、特にx行とy列を有する格子に配置された回収容器を有する回収アレイに自動的に回収することができ、xおよびyは、独立して3、10、30、100、またはそれ以上であり得る。

40

## 【0062】

いくつかの実施形態では、当業者には理解されるように、スクリーニングアレイステージおよび回収アレイステージまたは複数の回収アレイステージは、1つ以上の電子モータによって制御可能である。

## 【0063】

50

いくつかの実施形態では、本システムのスクリーニングアレイおよび回収アレイは、少なくとも1つのマイクロスケールサンプル容器および少なくとも1つの回収容器が顕微鏡対物レンズの作動距離内に配置されるように構成される。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約0.1 mm ~ 40 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約1 mm ~ 40 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約2 mm ~ 30 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は約1.5 mm ~ 30 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約2.5 mm ~ 30 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約2 mm ~ 25 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約3 mm ~ 30 mmまでである。いくつかの実施形態では、垂直距離を含む作動距離は、約3 mm ~ 25 mmまでである。より具体的には、作動距離は約2.5 mm ~ 約2.5 mmまでである。これらの実施形態では、システムは、対象のマイクロスケールサンプル容器および連携する回収容器の内容物の同時画像化を可能にする。より具体的な実施形態では、顕微鏡対物レンズの作動距離は、約4 mm ~ 約10 mm、さらには約6 mm ~ 約8 mm、例えば約7.4 mmである。いくつかの実施形態では、回収アレイは第1の回収アレイである。いくつかの実施形態では、回収アレイは第2の回収アレイである。

10

#### 【0064】

上述のように、好ましい実施形態では、本マルチステージサンプル回収システムのスクリーニングアレイは、複数のマイクロキャピラリーを含む。より具体的には、スクリーニングアレイは、少なくとも100,000、少なくとも300,000、少なくとも1,000,000、少なくとも3,000,000、少なくとも10,000,000個、またはさらにそれ以上のマイクロキャピラリーを含む。いくつかの実施形態において、アレイは、少なくとも100,000、少なくとも200,000、少なくとも300,000、少なくとも400,000、少なくとも500,000、少なくとも600,000、少なくとも700,000、少なくとも800,000、少なくとも1,000,000、少なくとも1,500,000、少なくとも2,000,000、少なくとも2,500,000、または少なくとも3,000,000個以上のマイクロキャピラリーを含む。

20

#### 【0065】

また上述のように、好ましい実施形態では、本マルチステージサンプル回収システムの回収アレイは、1つ以上の回収容器を含む。したがって、そのようなシステムでは、回収アレイは、少なくとも1個の回収容器、少なくとも3個の回収容器、少なくとも10個の回収容器、少なくとも30個の回収容器、少なくとも100個の回収容器、またはさらに多くの回収容器を含み得る。

30

#### 【0066】

好ましい実施形態では、本システムの回収アレイは、スクリーニングアレイの下に配置される。いくつかの実施形態では、回収アレイとスクリーニングアレイは、少なくとも2.5 mm、少なくとも30 mm、少なくとも35 mm、少なくとも40 mm、少なくとも45 mm、または少なくとも50 mm、またはそれ以上離れている。いくつかの実施形態では、回収アレイとスクリーニングアレイは少なくとも30 mm、少なくとも35 mm、または少なくとも40 mm離れている。いくつかの実施形態では、回収アレイとスクリーニングアレイは少なくとも35 mmまたは少なくとも40 mm離れている。いくつかの実施形態では、回収アレイとスクリーニングアレイは少なくとも35 mm離れている。いくつかの実施形態では、回収アレイは、スクリーニングアレイの少なくとも2.5 mm、少なくとも30 mm、少なくとも35 mm、少なくとも40 mm、少なくとも45 mm、または少なくとも50 mm下にある。いくつかの実施形態では、回収アレイはスクリーニングアレイの少なくとも30 mm、少なくとも35 mm、または少なくとも40 mm下にある。いくつかの実施形態では、回収アレイはスクリーニングアレイの少なくとも35 mmまたは少なくとも40 mm下にある。いくつかの実施形態では、回収アレイはスクリーニング

40

50

アレイの少なくとも35mm下にある。

【0067】

本発明の範囲またはそのいずれの実施形態からも逸脱することなく、本明細書に記載の方法および用途に対して他の適切な改変および適合をなし得ることが、関連技術分野の当業者には容易に明らかであろう。本発明を詳細に説明してきたが、本発明を制限することを意図するものではなく、例示のみを目的とする以下の実施例を参照することによって、本発明はより明確に理解されるであろう。

【実施例】

【0068】

実施例1．分泌されたEGFR結合タンパク質のスクリーニング

10

図1A～図1Cは、固定化標的分子としての細胞表面タンパク質（例えば、上皮成長因子受容体（「EGFR」））と会合することができる可溶性タンパク質、この場合は固定化標的タンパク質の例示的なスクリーニング方法を示す。図1A（左側のパネル）は、その表面にEGFRを発現する標的細胞を示す。また、変異体タンパク質の集団を発現する「ライブラリー発現細胞」、およびマイクロキャピラリー溶液中の多数の「蛍光検出抗体」も示される。マイクロキャピラリーアレイの底面図が右側のパネルに示される。

このスクリーニングアッセイによる各マイクロキャピラリーの構成要素：

1．目的の変異体タンパク質を分泌する細胞（「ライブラリー発現細胞」）。目的の変異体タンパク質は、変異体タンパク質の集団、すなわちタンパク質ライブラリーのメンバーであることが好ましい。

20

2．「標的細胞」の表面上に固定化された標的タンパク質。この例では、標的タンパク質は天然の細胞表面受容体（すなわちEGFR）である。しかしながら、代替として、標的タンパク質は、ビーズ表面またはマイクロキャピラリー自体の表面等の別の表面上に固定化されてもよい。

3．レポーターエレメント

a．この例では、レポーターエレメントは、分泌タンパク質に特異的な蛍光標識抗体（すなわち「蛍光検出抗体」）に対応する。抗体は、分泌タンパク質上のエピトープに特異的に局在するが、理想的には標的細胞上の標的タンパク質への分泌タンパク質の結合を妨害しない。

b．代替として、レポーターエレメントは、標的タンパク質を発現する細胞内のシグナル伝達経路であってもよい。分泌された変異体タンパク質が細胞表面上の標的タンパク質に結合し、標的細胞内のシグナル伝達経路を活性化する場合、結合相互作用は細胞内で蛍光シグナルを発生するであろう（図示せず）。

30

4．反応バッファー：

a．ライブラリー発現細胞または標的細胞のための培地であり得る。

b．哺乳類の画像化溶液であり得る。

方法の説明

ステップ1：全ての構成要素をマイクロキャピラリーに添加する（図1A参照）。

ステップ2：特異的な「分泌タンパク質」がライブラリー発現細胞によってマイクロキャピラリーに発現される。標的タンパク質に結合することができる分泌タンパク質変異体は、示されるように標的細胞表面に局在している（図1B参照）。

40

ステップ3：結合した分泌タンパク質変異体と会合した蛍光検出抗体が、特定のマイクロキャピラリー中の標的細胞と会合して観察される（図1C参照）。

【0069】

詳細な説明とサンプルデータ：

この方法を実証するために、ヒト癌細胞上のEGFRに結合するように設計されたタンパク質を発現する酵母ベクターライブラリーを作成した。このライブラリーにおいて、いくつかの酵母変異体はタンパク質を発現することができたが、他の変異体はタンパク質を発現することができなかった。酵母細胞、癌細胞、および発現タンパク質に対する蛍光抗体をマイクロキャピラリーに添加した。18時間後、マイクロキャピラリーアレイを画像

50

化した。スクリーニングのさらなる詳細および結果は、後述の実施例 3 に提供される。

【0070】

#### 実施例 2 . 哺乳動物細胞に対するハイブリドーマスクリーニング

##### 一般的な背景

タンパク質または他の標的分子間の結合相互作用をスクリーニングするための現在の方法は、典型的には「ディスプレイ」法、例えばファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物ディスプレイ、またはウイルスディスプレイの使用に依存している。ディスプレイ法において、タンパク質変異体をコードする遺伝子のライブラリーが細胞またはファージの表面に発現される。タンパク質変異体は、標的に結合することができるタンパク質変異体を同定するために、可溶性型の標的分子と共にインキュベートされる。ライブラリーは、パンニングまたは蛍光活性化細胞選別（「FACS」）によってスクリーニングすることができる。そのようなアッセイは、2つの主な制約を有する：1）人工タンパク質は典型的にはディスプレイプラットフォームにつながる、および2）通常、可溶性形態の標的分子が存在することが有利である。したがって、多くの標的分子に結合する変異体タンパク質、特にGタンパク質共役受容体および他のそのような受容体等の膜タンパク質のための信頼できるアッセイを開発することは困難であり得る。

10

【0071】

#### 哺乳動物細胞に対するハイブリドーマスクリーニング

標的分子に特異的に結合する抗体変異体を同定するために、標的分子として高レベルのEGFRを発現する癌細胞株にハイブリドーマ（抗体変異体を分泌する）を添加した。分泌された抗体に特異的な標識抗体を次に添加した。

20

材料：

細胞：

マウスハイブリドーマ

A431 標的細胞（高レベルのEGFRを発現するヒト癌細胞株）

検出抗体：

Alexa488（フルオロフォア）で標識された抗マウス二次抗体

細胞培養用培地：

DMEM - 10%ウシ胎仔血清

DMEM - 10%ウマ血清

30

細胞株の増殖および調製マウスハイブリドーマ細胞を完全培地（10%ウマ血清を含むダルベッコの改変イーグル培地）中で培養した。ハイブリドーマ細胞をPBSAで2回洗浄し、完全培地に600細胞/μLで懸濁した。A431細胞を完全培地（10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地）中で培養した。A431細胞をPBSAで2回洗浄し、LiveGreen蛍光シグナルで染色した。次いで、A431細胞を、ハイブリドーマを含む完全培地に1800細胞/μLの最終濃度で懸濁した。

アッセイの設定2つの細胞型を混合した後、検出抗体を反応混合物に添加した：1：100希釈の二次（抗マウスAlexa488）。次いで、この反応混合物をエタノールで滅菌したコロナ処理マイクロキャピラリーアレイ（直径40μm、厚さ1mm）に装填した。蒸発の防止に役立つように、1%重量/容量のアガロースの2mmの厚板をアレイ上に置いた。各時間後、サンプルを蛍光顕微鏡および明視野顕微鏡下で画像化した。

40

【0072】

サンプルデータ：

図2A~2Cは、全ての細胞（図2A、明視野シグナル）、A431標的細胞（図2B、LiveGreenシグナル）、または蛍光抗マウス二次抗体で標識された細胞（図2C、Ab-a555シグナル）のいずれかを示すマイクロキャピラリーアレイの小区分の画像を示す。EGFRに特異的な抗体を発現するハイブリドーマ細胞を含むマイクロキャピラリーは、各画像において2本の矢印で示されている。

【0073】

図3は、4時間のインキュベーションにわたるA431標的細胞とハイブリドーマ細胞

50

の両方を含むマイクロキャピラリーの画像を示しており、A 4 3 1 標的細胞に対する抗体結合シグナルは、E G F R に特異的なマウス抗体が産生されるにつれて、アッセイの時間経過の間に増加した（中央欄）。A 4 3 1 標的細胞の L i v e G r e e n 染色は同じ期間にわたって低下した（右欄）。

#### 【 0 0 7 4 】

#### 実施例 3 . 哺乳動物細胞に対する酵母ライブラリースクリーニング

最良の分泌酵母プラスミドベクターを決定するために、癌細胞表面上の E G F R に結合するように設計された足場タンパク質を発現する酵母ベクターライブラリーを作成した。このライブラリーは、種々の可溶性発現レベルの足場タンパク質を有する酵母細胞を含んでいた。記載されたアッセイを使用して、所望の足場タンパク質を高発現するプラスミドベクターを回収するために変異体発現ライブラリーをスクリーニングした。この実験において、分泌された足場は c - M y c タグを有し、これは蛍光標識抗体で標識することができる。

材料：

細胞：

足場タンパク質の酵母分泌ライブラリー

A 4 3 1 細胞（高レベルの E G F R を発現するヒト癌細胞株）

検出抗体：

ニワトリ抗 c - M y c

A 1 e x a 4 8 8 で標識された抗ニワトリ二次抗体

細胞培養用培地：

D M E M - 1 0 % F B S

S D - C A A 最小酵母培地

反応バッファー：

S D - C A A 最小酵母培地

方法：

細胞株の増殖および調製酵母ライブラリーを S D - C A A 最小酵母培地（20 g のデキストロース、6 . 7 g の D i f c o 酵母窒素ベース、5 g の B a c t o カザミノ酸、5 . 4 g の N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>、8 . 5 6 g の N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O、脱イオン化 H <sub>2</sub> O に溶解して 1 リットルの体積とした）で増殖させた。増殖後、酵母細胞を P B S A（リン酸緩衝食塩水 + 1 m g / m l B S A）で 2 回洗浄し、S D - C A A に 2 , 4 0 0 細胞 / μ L の最終濃度で懸濁した。

A 4 3 1 細胞を完全培地（10% ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地）中で培養した。A 4 3 1 細胞を P B S A で 2 回洗浄し、酵母細胞を含む、S D - C A A に最終濃度 6 0 0 細胞 / μ L で懸濁した。

アッセイの設定 2 つの細胞型を混合した後、2 つの抗体を反応混合物に添加した：1 : 2 5 0 希釈の未標識一次抗体（ニワトリ抗 c - M y c）および 1 : 2 0 0 希釈の標識二次抗体（抗ニワトリ A 1 e x a 4 8 8）。次いで、この反応混合物をエタノールで滅菌したコロナ処理マイクロキャピラリーアレイ（直径 4 0 μ m、厚さ 1 m m）に装填した。蒸発の防止に役立つように、1% 重量 / 容量のアガロースの 2 m m の厚板をアレイ上に置いた。1 8 時間増殖させた後、サンプルを蛍光顕微鏡および明視野顕微鏡下で画像化した。

マイクロキャピラリーアレイ抽出 T r i t o n U V レーザーを使用して所望のキャピラリーの内容物を抽出した。レーザーは 1 8 ± 2 m s で動作し（n = 5 回の測定）、約 1 0 0 μ J の総エネルギーで 2 . 5 k H z の一連のパルスを送達する。マイクロキャピラリーの内容物をガラス製カバーガラス上に抽出し、次いでそれを酵母増殖培地（液体培地または寒天プレート）に入れて抽出した細胞を増殖させた。

#### 【 0 0 7 5 】

#### サンプルデータ

図 4 A および図 4 B は、明視野イメージング（図 4 A）および蛍光イメージング（図 4 B）を使用して、発現細胞および非発現細胞を有するマイクロキャピラリーを特定するマ

10

20

30

40

50

マイクロキャピラリーアレイの小区分の画像を示す図である。

【0076】

実施例4．マイクロキャピラリーアレイにおける培養ヒト細胞の増殖

図5A～5Gは、マイクロキャピラリーのアレイ内の6日間にわたる増殖培地中でのK562細胞（ヒト不死化骨髄性白血病細胞株）の増殖を示す。アレイの同じ部分の明視野画像を24時間ごとに撮影した。図5A：0日目、図5B：1日目、図5C：2日目、図5D：3日目、図5E：4日目、図5F：5日目、および図5G：6日目。各画像に40μmのスケールバーが示されている。

【0077】

実施例5．哺乳動物レポーター細胞に対するハイブリドーマスクリーニング

特定のシグナル伝達経路を活性化する抗体変異体を同定するために、異なる抗体変異体を分泌するハイブリドーマをレポーター細胞と共にマイクロキャピラリーアレイに添加した。例えば、レポーター細胞は、Qiagenから入手することができる（[http://www.sabiosciences.com/reporter\\_assay\\_product/HTML/CCS-013L.html](http://www.sabiosciences.com/reporter_assay_product/HTML/CCS-013L.html)を参照）。

タンパク質変異体がレポーター細胞に結合してシグナル伝達経路を活性化すると、レポーター細胞が蛍光タンパク質を発現する。活性化された細胞のシグナル蛍光は、望ましいタンパク質変異体を含むマイクロキャピラリーにおいて観察され、それらのマイクロキャピラリーの内容物を単離するために用いられる。

【0078】

実施例6．自動細胞回収システム（ACRS）

この実施例は、上述のスクリーニング方法を使用して大規模マイクロキャピラリーアレイから対象のサンプルを回収するために使用されてきたマルチステージサンプル回収システムを記載する。自動細胞回収システム（「ACRS」）は、マイクロキャピラリーアレイからのサンプルの回収を可能にするために共に働く2層の3つのステージ（1つがx-y、および2つが直線ステージ）の構成である。上部X-Yステージは、マイクロキャピラリーアレイを保持し、アレイ全体が顕微鏡対物レンズによって撮像できるようにアレイを移動させる。底部の2つの直線ステージは捕捉表面（例えば18ウェルスライド）を移動させ、それにより対象のマイクロキャピラリーの内容物が分離された回収容器（例えば、18ウェルスライドの新しいウェル）に回収され得る。全体の構成は、顕微鏡対物レンズの作動距離（7.4mm）に適合し、顕微鏡から構成要素のいずれも除去することなく、マイクロキャピラリーアレイおよび回収アレイの両方の画像化を可能にする。

【0079】

詳細な説明

上述のように、ACRSは、図7Aに示すようなX-Yステージと、図7Bに示すような少なくとも1つのX/Yステージとからなる。ステージは、Nikon Ti-E電動顕微鏡等と連動する。X-Yステージは、マイクロキャピラリーのアレイ等のスクリーニングアレイを保持し、X/Yステージまたは複数のX/Yステージは、18ウェルスライド等のサンプル回収アレイを保持するように構成される。

【0080】

連携する顕微鏡からの光は、スクリーニングアレイ内の各サンプルの内容物、例えばスクリーニングアレイステージ上に保持されたマイクロキャピラリーのアレイ内の各マイクロキャピラリーの内容物を可視化する目的で、ステージの両方の層を通過する。スクリーニングアレイステージと回収アレイステージとが近接しているため、対物レンズは回収アレイ。例えば18ウェルスライドと連携する容器を画像化することもできる。

【0081】

これらのステージは、顕微鏡対物レンズに対して所望の位置に、所望のマイクロスケールサンプル容器、例えばマイクロキャピラリーのアレイ内のマイクロキャピラリー、および所望の捕捉表面、例えば回収アレイ内の回収容器を位置決めするために互いに独立して作動する。例えば、図8に示すように、スクリーニングアレイ10が3つの対象のサンプ

10

20

30

40

50

ル容器、例えば図中 1、2、および 3 とラベル付けされた 3 つのサンプル容器を含むことが分かった場合、図 8 の左上パネルに示されるように、スクリーニングアレイステージを移動させて、第 1 のサンプル容器が抽出ビームの光経路と一直線になるように位置決めし、回収アレイステージを同様に独立して移動させて、回収アレイ 1 4 の第 1 の回収容器が光経路と一直線になるように位置決めする。

【0082】

対象の第 1 のサンプルが第 1 の回収容器に移された後、図 8 の右上のパネルに示すように、スクリーニングアレイステージを X 方向および Y 方向に移動させて、第 2 の対象のサンプルが抽出ビームと一直線になるように位置決めし、回収アレイステージを独立して移動させて、第 2 の回収容器がビームと一直線になるように位置決めする。対象の第 2 のサンプルが第 2 の回収容器に移された後、必要に応じてスクリーニングアレイステージを X 方向および Y 方向に移動させて、対象の第 3 のサンプルが抽出ビームと一直線になるように位置決めすることによってプロセスが繰り返される。図 8 の下部パネルに示すように、回収ステージを独立して移動させて、第 3 の回収容器をビームと一直線になるように位置決めし、サンプルを抽出ビームによって第 3 の回収容器に移す。

10

【0083】

この例では、第 1、第 2、および第 3 の回収容器が直線上に配置されているので、システム内には単一の回収アレイステージのみを必要とする。ユーザーが示される回収アレイ内の他の 2 列の回収容器を使用したい場合、例えば 2 列目の回収容器を抽出ビームと位置合わせするために、回収アレイステージを手動で移動させることができる。しかしながら、好ましくは、システムは、例えば図 6 A ~ 図 6 E のシステムに示されるように、第 1 に対して直角に配置された第 2 の回収アレイステージをさらに含み、第 2 の直線ステージは、第 1 の回収アレイステージの方向と直角方向に、回収アレイを自動的に移動させ、したがって、対象の追加のサンプルの回収アレイの後続の行中に回収することが可能になる。

20

【0084】

具体例を提供してきたが、上記の説明は例示的なものであり、限定的なものではない。前述の実施形態の特徴のいずれか 1 つ以上は、本発明の任意の他の実施形態の 1 つ以上の特徴と任意の様式で組み合わせることができる。さらに、本明細書を検討すると、本発明の多くの変形例が当業者に明らかになるであろう。当業者には明らかなように、本出願の趣旨および範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正および変形をなすことができる。本明細書に記載された特定の実施形態および実施例は例としてのみ提供され、特許請求の範囲が権利を与えられる同等物の全範囲と共に、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

30

【0085】

上記の実施例は、当業者に本発明の組成物、システム、および方法の実施形態をどのように作製および使用するかについての完全な開示および説明を与えるために提供されており、そして本発明者らが自分たちの発明とみなすものの範囲を限定することは意図されていない。当業者に明らかである本発明を実施するための上記の様式の修正は、添付の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。本明細書中で言及されている全ての特許および刊行物は、本発明が関係する当業者の技術水準を示している。

40

【0086】

全ての見出しおよびセクションの指定は、明確さおよび参照目的のためだけに使用されているにすぎず、決して限定的であるとみなされるべきではない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨および範囲に従って、必要に応じて異なる見出しおよびセクションからの様々な態様を組み合わせることの有用性を認識するであろう。

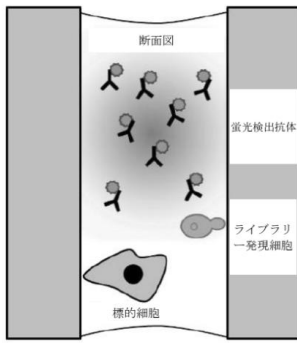
【0087】

全ての特許、特許公開、および他の刊行された参考文献を含む、本明細書に引用された全ての参考文献は、あたかも各個々の刊行物または特許または特許出願が全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されるのと同程度にそれらの全体が全ての目的のために本明細書に参照により組み込まれる。

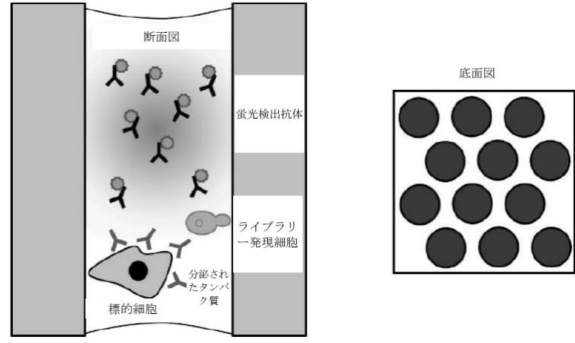
50

【図面】

【図 1 A】

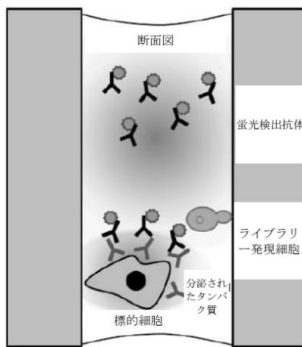


【図 1 B】

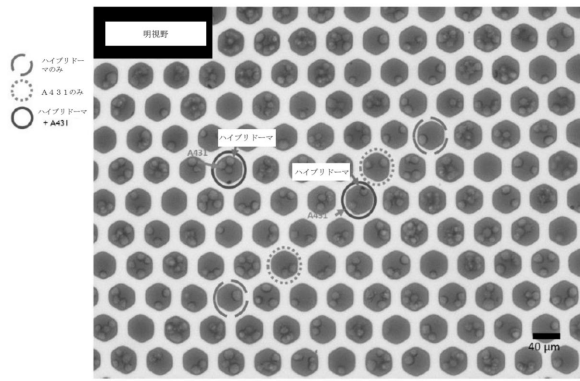


10

【図 1 C】

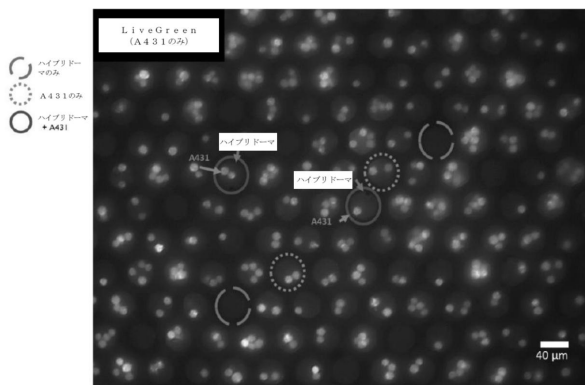


【図 2 A】

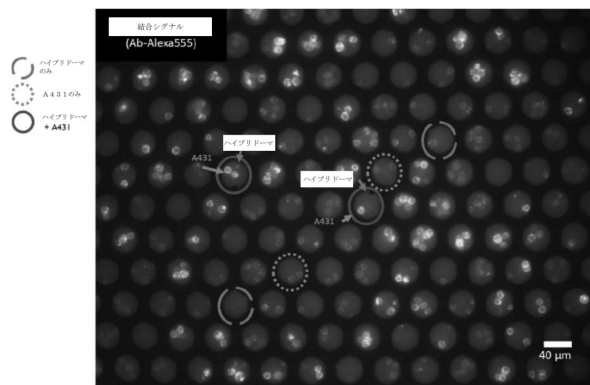


20

【図 2 B】



【図 2 C】

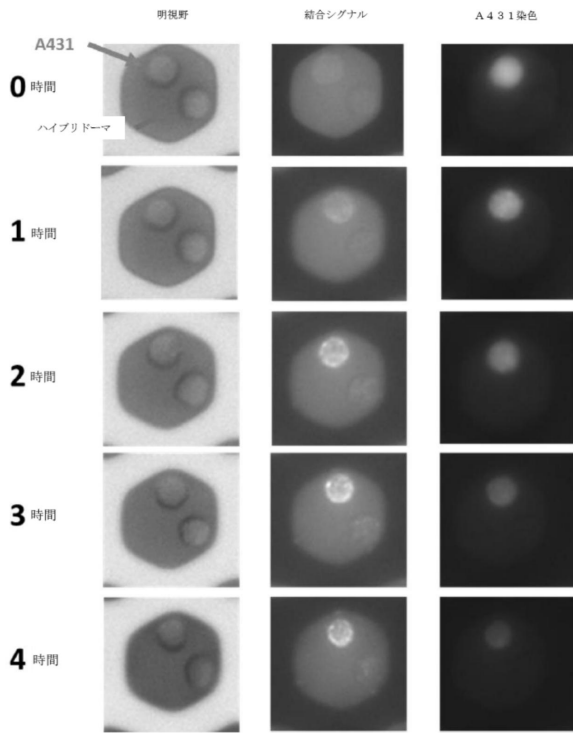


30

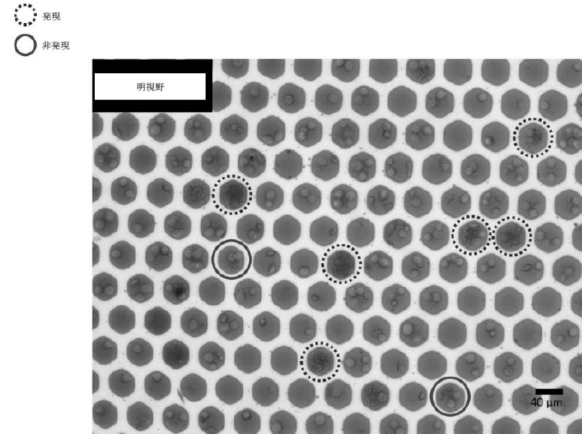
40

50

【 図 3 】



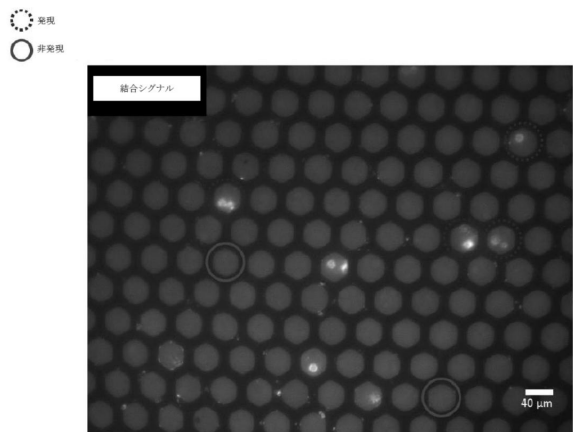
【 図 4 A 】



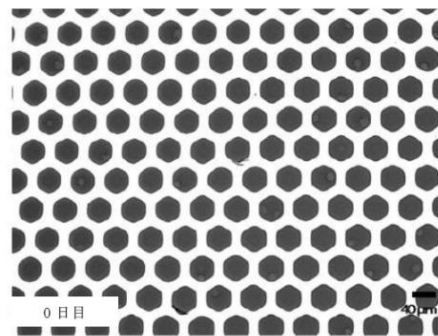
10

20

【 図 4 B 】



【 図 5 A 】

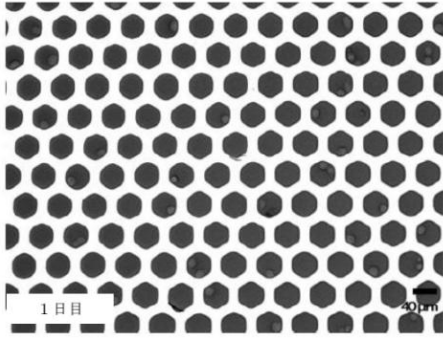


30

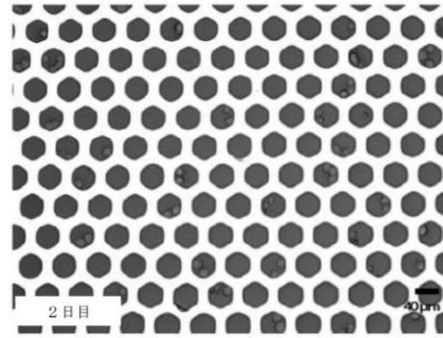
40

50

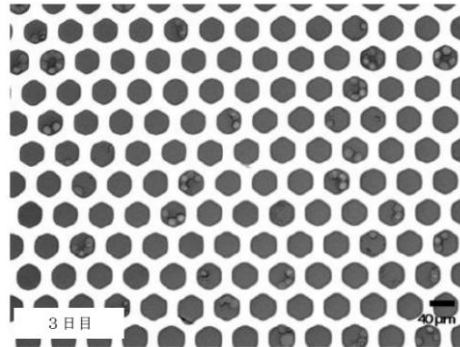
【図 5 B】



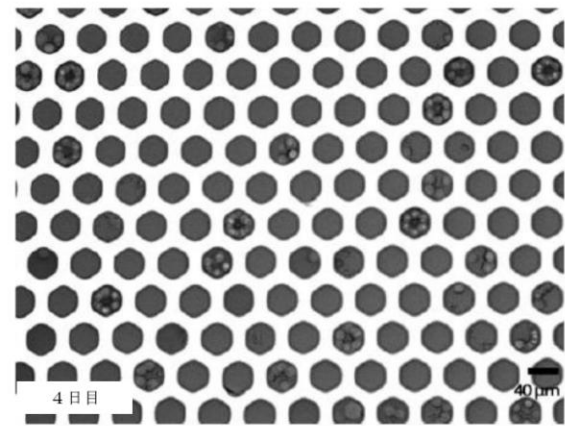
【図 5 C】



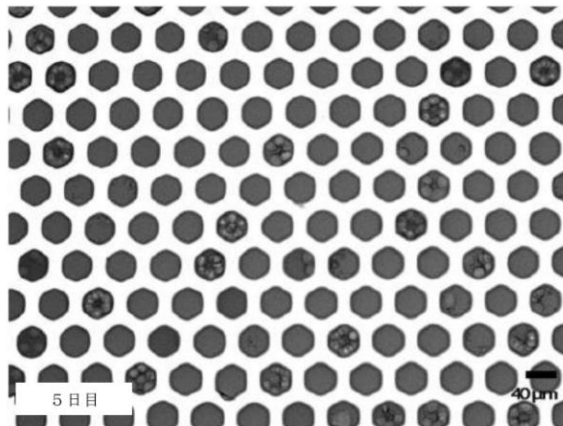
【図 5 D】



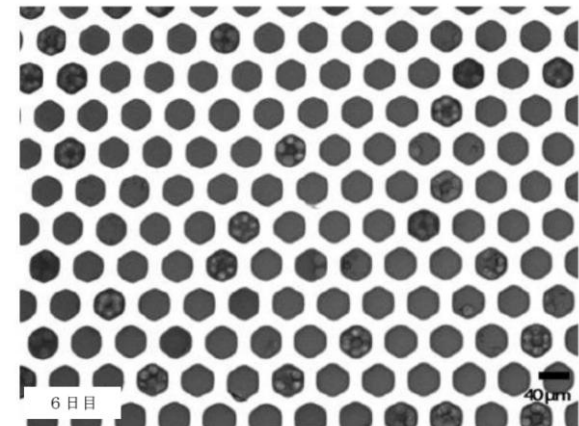
【図 5 E】



【図 5 F】



【図 5 G】



10

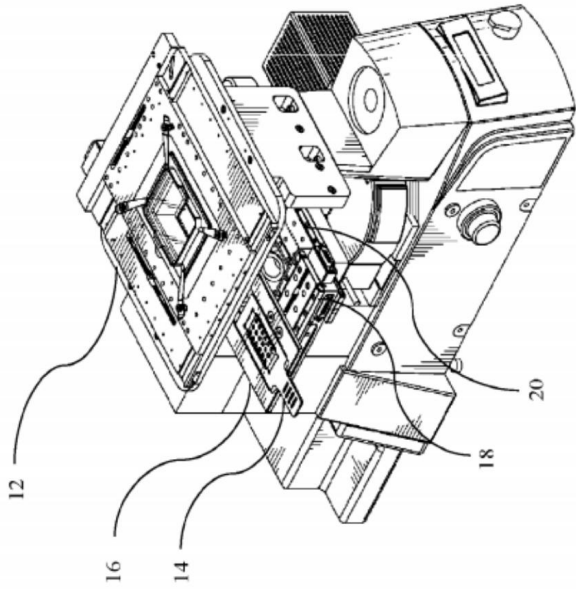
20

30

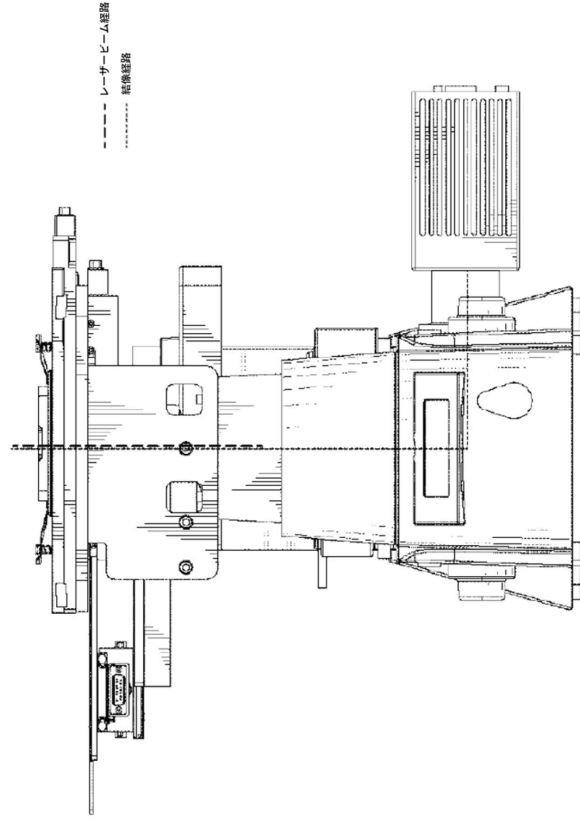
40

50

【図 6 A】



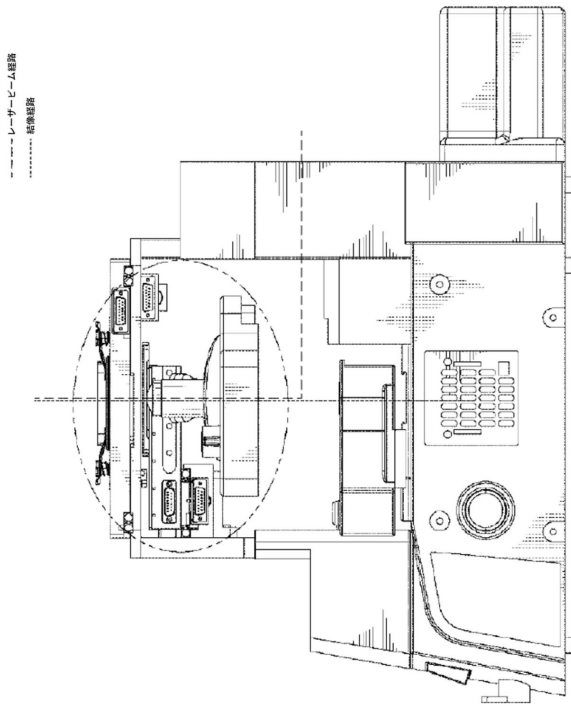
【図 6 B】



10

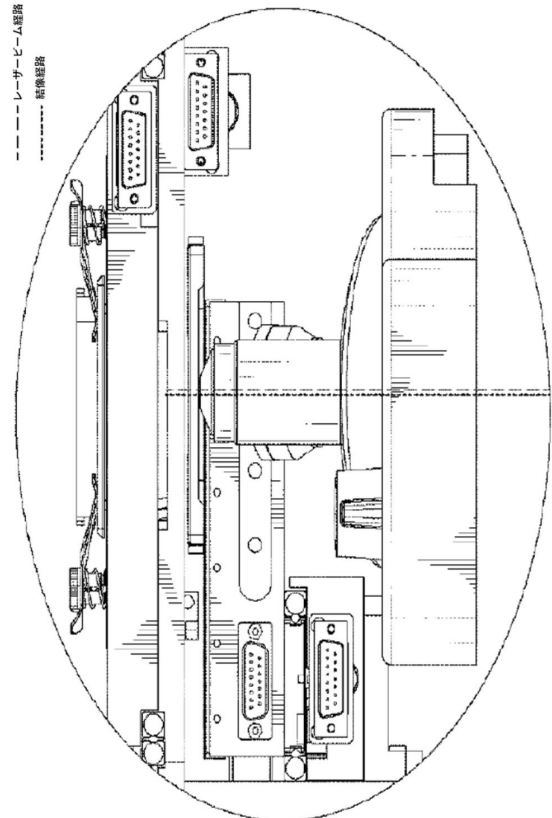
20

【図 6 C】



---レーザービーム経路  
.....視線経路

【図 6 D】



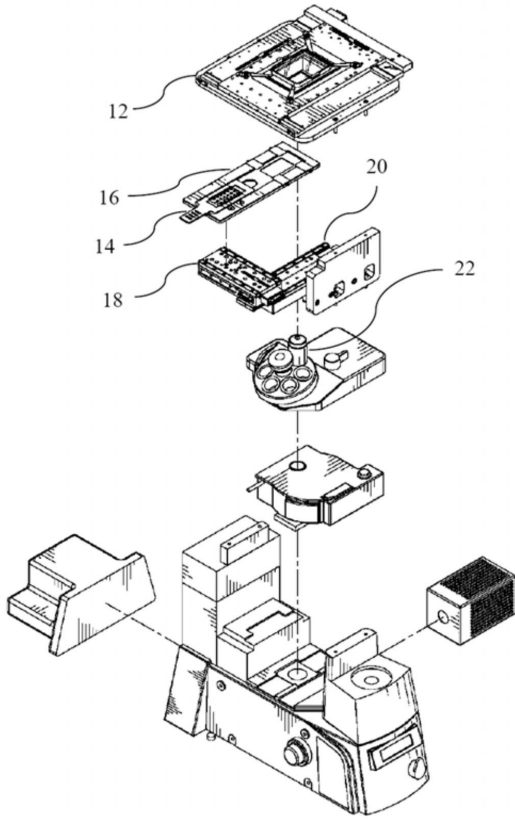
---レーザービーム経路  
.....視線経路

30

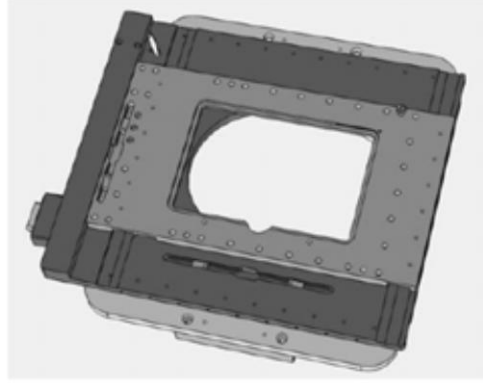
40

50

【 図 6 E 】



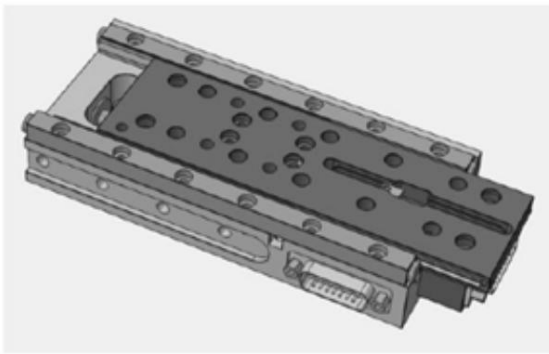
【 図 7 A 】



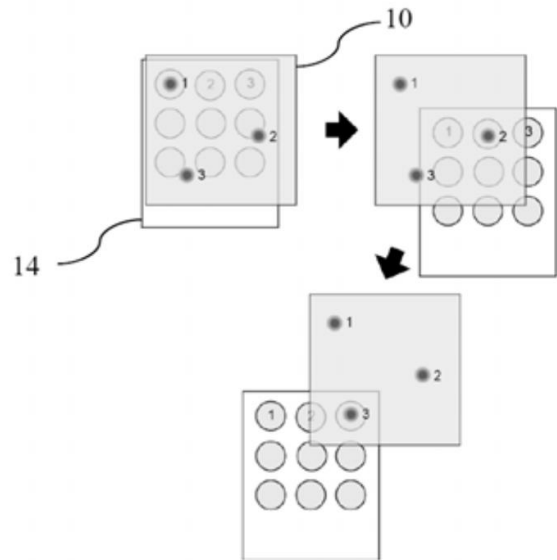
10

20

【 図 7 B 】



【 図 8 】



30

40

## フロントページの続き

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ボブ・チェン

アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォルニア州 イースト・パロ・アルト、ウエスト・ベイショア・ロード 1 9 8 2 番、アパートメント 2 3 6

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 0 4 1 6 1 ( J P , A )

特表 2 0 1 3 - 5 0 7 9 5 9 ( J P , A )

特開 2 0 1 6 - 1 6 3 5 4 9 ( J P , A )

Analyst., 2013, Vol.138, No.3, pp.831-838

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 M 1 / 3 2

C 1 2 M 1 / 0 0

C 1 2 M 1 / 3 4

C 1 2 Q 1 / 6 8 6

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )