

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 29 年 1 月 19 日 (2017.1.19)

【公表番号】特表 2016-500255 (P2016-500255A)

【公表日】平成 28 年 1 月 12 日 (2016.1.12)

【年通号数】公開・登録公報 2016-002

【出願番号】特願 2015-545835 (P2015-545835)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成 28 年 12 月 1 日 (2016.12.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) (a) 細胞表面で異種タンパク質を発現するように、かつ (b) 第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、あるベクターで形質転換されていることにより、少なくとも 2 つの異なるタイプの第一の異種タンパク質を発現する、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

(i i) 細胞表面で第二の異種タンパク質を発現するように、かつ第二の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、第二のベクターで形質転換されており、単一タイプの第二の異種タンパク質を発現する、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞とを含み、

i) 第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞によって発現される各ベクターが、発現された異種タンパク質に対する独特な所定の 15 ~ 35 ヌクレオチド配列を含むか、または

i i) 第一及び第二の蛍光タンパク質の両者の共存が、F A C S 分析により決定される

システム。

【請求項 2】

第一の複数の細胞の任意の個々の細胞が、細胞表面の唯一の異種タンパク質を発現する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

複数の第一の異種タンパク質の異なるタイプが、所定の野生型タンパク質の各突然変異体である、請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

第二の異種タンパク質が、野生型タンパク質である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 5】

第一の複数の異なるタンパク質の異種タンパク質の各タイプが、1、2、3、4 又は 5

アミノ酸残基の点突然変異により複数の異種タンパク質の互いのタイプと異なっている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 6】

第一の又は第二の異種タンパク質が、イムノグロブリンスーパーファミリータンパク質、TNFレセプタータンパク質、サイトカイン、ケモカイン、1型膜貫通レセプタータンパク質、2型膜貫通レセプタータンパク質、イオンチャネルタンパク質、膜輸送タンパク質、Toll様レセプター、Gタンパク質共役レセプター、増殖因子レセプター、ネクチン、インターロイキン、又はインターロイキンレセプターである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】

第一の又は第二の異種タンパク質が、PD - 1ポリペプチド、PD - L1ポリペプチド、PD - L2ポリペプチド、B7 - 1ポリペプチド、B7 - 2ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CTLA - 4ポリペプチド、ICOSポリペプチド、またはICOS - Lポリペプチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 8】

独特な配列が、1つ以上のユニバーサルプライマーにより鎖延長することが可能である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 9】

第一又は第二の蛍光タンパク質が、異なる色である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 10】

各複数の細胞が、複数の哺乳動物細胞または複数の昆虫細胞である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 11】

候補リガンドタンパク質又はペプチドが第二のタンパク質又はペプチドに結合するかどうかを決定するための方法であって、

第一の異種タンパク質を第二の異種タンパク質に結合させる条件下で、候補リガンドタンパク質又はペプチドを請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のシステムにおいて第一の複数の細胞の第一の異種タンパク質として発現させ、かつ第二のタンパク質又はペプチドを請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のシステムにおいて第二の異種タンパク質として発現させる段階、並びに

任意で洗浄して非結合の第一の異種タンパク質をいずれも除去する段階、

その後、第一及び第二の異種タンパク質が両方とも共存する細胞を回収する段階、並びに

任意で回収された細胞から核酸を得る段階、及び核酸をシーケンシングして、それに含まれる独特な 15 ~ 35ヌクレオチド配列を同定することで、第二のタンパク質又はペプチドに結合した独特な 15 ~ 35ヌクレオチドに対応する候補リガンドタンパク質又はペプチドを同定する段階

を含む、前記方法。

【請求項 12】

第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合に及ぼす、第一のタンパク質の所定のアミノ酸残基の影響を決定するための方法であって、

第一のタンパク質に対して1つ以上の点突然変異により変異されたタンパク質を、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のシステムの第一の浮遊培養適合細胞株の複数の中の複数の異なるタイプの異種タンパク質として発現させる段階、並びに

該複数を、第二のタンパク質及び第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のシステムの第二の複数の細胞の第二の異種タンパク質の形態の第二のタンパク質と接触させる段階、並びに

第一及び第二の蛍光タンパク質の両方の共存を示す細胞を回収する段階、

回収された細胞から核酸を得る段階、及び核酸をシーケンシングしてそれに含まれる

独特な 15 ~ 35 ヌクレオチド配列を同定することで、第二のタンパク質又はペプチドに結合した第一のタンパク質を同定する段階、並びに

第二のタンパク質又はペプチドに結合したタンパク質のレベルを、所定の参照レベルと比較する段階を含み、

第二のタンパク質又はペプチドに結合したタンパク質のレベルが所定の参照レベルよりも多ければ、タンパク質中で変異された 1 つ又は複数の残基が、第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合を増大させていることが示され、第二のタンパク質又はペプチドに結合したタンパク質のレベルが所定の参照レベルよりも少なければ、タンパク質中で変異された 1 つ又は複数の残基が、第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合を阻害していることが示される、前記方法。

【請求項 13】

所定のレベルが、対照であり、任意で、所定のレベルが、第二のタンパク質に結合する未変異の第一のタンパク質のレベルをアッセイすることにより得られる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

第一及び第二の蛍光タンパク質の両方の共存を示す細胞が、FACS 分析により回収される、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

(a) 各々が第一の蛍光タンパク質に融合した第一の異種ポリペプチドを発現する、第一の複数の浮遊培養適合細胞と、

(b) i) 検出可能な標識部分を含むポリペプチドリinkerを介してマイクロビーズに連結されている、第一の異種ポリペプチドに対するリガンドまたは共レセプターである第二のポリペプチドを含む、マイクロビーズ、または

ii) 第一の異種ポリペプチドに対するリガンドまたは共レセプターである第二のポリペプチドに融合した、検出可能な標識部分を含むイムノグロブリン (Ig) Fc を含む、チャレンジ成分とを含む、システム。

【請求項 16】

第一の複数の細胞が、i) 表面に固定されているか、または ii) 液体培地内に浮遊している、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 17】

第一の複数の細胞が、空間的に制限される方法で表面に固定されている、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 18】

第一の異種ポリペプチドが、細胞間の相互作用を仲介するポリペプチド、イムノグロブリンスーパーファミリーポリペプチド、TNFスーパーファミリーポリペプチド、TNFレセプタースーパーファミリーポリペプチド、Gタンパク質共役レセプター、増殖因子レセプター、ネクチン、インターロイキンレセプター、イオンチャネル、T細胞共刺激レセプター、T細胞共刺激レセプターリガンド、又はサイトカインレセプターである、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 19】

第一の異種ポリペプチドが、PD-L1ポリペプチド、PD1ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、B7-1ポリペプチド、CD200Rポリペプチド、又はCD200ポリペプチドである、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 20】

第一の異種ポリペプチドが、第一の異種ポリペプチドに独特の所定の 15 ~ 35 ヌクレオチド配列を含む発現ベクターによってコードされ、該独特の配列が 1 つ以上のユニバーサルプライマーにより鎖延長することが可能である、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 1】

第一の複数の細胞の各々が第一の蛍光ポリペプチドに融合した異なる第一の異種ポリペプチドを発現し、異なる第一の異種ポリペプチドの各々が他の第一の異種ポリペプチドと 1 ~ 2 5 アミノ酸異なる、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 2】

チャレンジ成分が複数の異なる第二の異種ポリペプチドを含み、異なる第二の異種ポリペプチドの各々が他の第二の異種ポリペプチドと 1 ~ 2 5 アミノ酸異なる、請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 3】

第一の複数の細胞が、哺乳動物細胞または昆虫細胞である、請求項 1 5 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 4】

標的ポリペプチドに結合するポリペプチドを同定する方法であって、

a) 各々が第一の蛍光タンパク質に融合した第一の異種ポリペプチドを発現する第一の複数の浮遊培養適合細胞を、チャレンジ成分に接触させる段階であって、チャレンジ成分が、

i) 検出可能な標識部分を含むポリペプチドリinkerを介して、マイクロビーズに共有結合している、第一の異種ポリペプチドに対するリガンドまたは共レセプターである第二のポリペプチドを含む、マイクロビーズ、または

i i) 第一の異種ポリペプチドに対するリガンドまたは共レセプターである第二のポリペプチドに融合した、検出可能な標識部分を含むイムノグロブリン (I g) F c を含む、段階、および

b) 第二のポリペプチドが第一の異種ポリペプチドに結合しているかどうかを決定する段階

を含む、前記方法。

【請求項 2 5】

チャレンジ成分がマイクロビーズを含み、検出可能な標識部分が第一の蛍光ポリペプチドと識別可能な第二の蛍光ポリペプチドであり、決定する段階が第一の蛍光タンパク質および第二のポリペプチドからの蛍光の検出を含み、第一の複数の細胞中のある細胞上の第一の蛍光ポリペプチドおよび第二のポリペプチドの両方の検出が、マイクロビーズに付着している第二のポリペプチドが第一の異種ポリペプチドに結合していることを示す、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

第一の複数の細胞が哺乳動物細胞または昆虫細胞である、請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

P D - 1 に特異的に結合する P D - L 1 ポリペプチド突然変異体であって、該 P D - L 1 ポリペプチドが G 1 y 1 1 9 または G 1 y 1 2 0 のアミノ酸残基点突然変異を含み、G 1 y 1 1 9 および G 1 y 1 2 0 が、S E Q I D N O : 4 の残基 1 0 4 および 1 0 5 にそれぞれ対応する、P D - L 1 ポリペプチド突然変異体。

【請求項 2 8】

点突然変異が G 1 1 9 A、G 1 1 9 D、または G 1 1 9 R を含む、請求項 2 7 に記載の P D - L 1 ポリペプチド突然変異体。

【請求項 2 9】

点突然変異が G 1 2 0 A または G 1 2 0 D を含む、請求項 2 7 に記載の P D - L 1 ポリペプチド突然変異体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(i) 細胞表面で第一の異種標的タンパク質又はペプチドを発現するように、そして第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、あるベクターで形質転換された第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、及び細胞表面で第二の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、そして第二の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、第二のベクターで形質転換された1つ以上の第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、(i i) 表面に、候補リガンドタンパク質若しくはペプチドのいずれかに対する抗体、又は標的タンパク質又はペプチドに対する抗体を貼付させた複数の磁気マイクロビーズと、を含むシステムが提供される。候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合するかどうかを決定する方法であって、候補リガンドタンパク質又はペプチドと標的タンパク質又はペプチドを結合させる条件下で、候補リガンドタンパク質又はペプチドを本発明のシステムにおいて第二の複数の細胞の第二の異種タンパク質として発現させ、そして標的タンパク質又はペプチドを本発明のシステムのシステムにおいて第一の異種タンパク質として発現させること、並びに第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方と複合体化された任意のマイクロビーズを回収すること、を含み、第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されれば、候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合していることが示され、第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されなければ、候補リガンドタンパク質が標的タンパク質又はペプチドに結合していないことが示される、方法も提供される。

[本発明1001]

(i) (a) 第一の所定の異種タンパク質、及び (b) 第一の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された第一の複数の細胞と、

(i i) (a) 第二の所定の異種タンパク質、及び (b) 第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された少なくとも第二の複数の細胞とを含む細胞マイクロアレイであって、

第一及び第二の複数の細胞が、該マイクロアレイの固体表面に接着されており、第一と第二の複数の細胞が、該固体表面の空間的に別個の位置に存在する、前記細胞マイクロアレイ。

[本発明1002]

(i) 異種タンパク質の1つのための候補タンパク質若しくはペプチドリガンドと、(i i) 異種タンパク質の1つに結合した第三の蛍光タンパク質とを含む融合タンパク質をさらに含むか、又は異種タンパク質の1つのためのペプチド若しくはタンパク質リガンドを含む化合物をさらに含む、前記細胞マイクロアレイであって、

該化合物が、非ペプチド結合により結合された第三の蛍光タンパク質を有し、細胞マイクロアレイの異種タンパク質の1つに結合されている、本発明1001の細胞マイクロアレイ。

[本発明1003]

第三の複数の細胞を対照としてさらに含む、前記細胞マイクロアレイであって、第三の複数の細胞が、第一の蛍光タンパク質を発現するように任意で形質転換されているが、第一又は第二の所定の異種タンパク質では形質転換されていない、本発明1001又は1002の細胞マイクロアレイ。

[本発明1004]

前記複数の細胞がそれぞれ、複数の哺乳動物細胞である、本発明1001、1002又は1003の細胞マイクロアレイ。

[本発明1005]

哺乳動物細胞が、単離されたヒト細胞である、本発明1001、1002、1003又は1004の細胞マイクロアレイ。

[本発明1006]

前記細胞が、ヒト胎児腎（H E K）細胞株の細胞である、本発明1001、1002、1003又は1004の細胞マイクロアレイ。

[本発明1007]

前記細胞が、H E K 293細胞株の細胞である、本発明1001、1002、1003、1004又は1006の細胞マイクロアレイ。

[本発明1008]

前記マイクロアレイが、少なくとも10の異なる複数の細胞を含み、複数の細胞がそれぞれ、所定の異種タンパク質及び第一の蛍光タンパク質を発現するように形質転換されており、該異種タンパク質が、マイクロアレイ内の他の複数の形質転換された細胞それぞれにより発現される異種タンパク質とは異なる、本発明1001～1007のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1009]

前記マイクロアレイが、少なくとも100の異なる複数の細胞を含み、複数の細胞がそれぞれ、所定の異種タンパク質及び第一の蛍光タンパク質を発現するように形質転換されており、該異種タンパク質が、マイクロアレイ内の他の複数の形質転換された細胞それぞれにより発現される異種タンパク質とは異なる、本発明1001～1008のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1010]

第一のタンパク質及び／又は蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質又は黄色蛍光タンパク質である、本発明1001～1009のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1011]

第三の蛍光タンパク質が、赤色蛍光タンパク質である、本発明1002～1010のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1012]

前記複数の細胞がそれぞれ、第一の所定の異種タンパク質及び第一の蛍光タンパク質を発現するように形質転換されているに過ぎず、任意の他の異種タンパク質を発現するには形質転換されていない、本発明1001～1011のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1013]

第一の所定の異種タンパク質が、マルチサブユニット異種タンパク質のあるサブユニットであり、前記複数の細胞が、マルチサブユニット異種タンパク質の1つ以上の残りのメンバーも発現するように形質転換されている、本発明1001～1011のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1014]

第一の所定の異種タンパク質が、発現される際に、C末端を介して第一の蛍光タンパク質に付着される、本発明1001～1013のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1015]

第一の所定の異種タンパク質が、発現される際に、膜貫通アンカーペプチドに付着される、本発明1001～1013のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1016]

第一の異種タンパク質及び蛍光タンパク質をコードする第一の複数の発現構築物を、マイクロアレイの固体表面に貼付すること、並びに第二の異種タンパク質及び蛍光タンパク質をコードする少なくとも第二の複数の発現構築物を、貼付された第一の複数の発現構築物とは異なる空間的に別個の位置の固体表面で、マイクロアレイの固体表面に貼付すること、並びにトランスフェクション剤の存在を含む条件下で、発現構築物を複数の細胞と接触させ、それにより各発現構築物によるそれぞれ空間的に別個の位置にある細胞の少なくとも一部のトランスフェクションを可能にすることにより、前記細胞マイクロアレイが、組み立てられる、本発明1001～1015のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1017]

発現構築物が、pEGFP-N1発現構築物を含む、本発明1016の細胞マイクロアレイ。

[本発明1018]

発現構築物が、CMVプロモータを含む、本発明1016又は1017の細胞マイクロアレイ。

[本発明1019]

前記細胞が、昆虫細胞である、本発明1001、1002、1003、又は1008～1018のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1020]

前記細胞が、ショウジョウバエS2細胞である、本発明1019の細胞マイクロアレイ。

[本発明1021]

第一及び/又は第二の異種タンパク質が、イムノグロブリンスーパーファミリータンパク質、TNFレセプタータンパク質、サイトカイン、ケモカイン、1型膜貫通レセプタータンパク質、2型膜貫通レセプタータンパク質、イオンチャネルタンパク質、又は膜輸送タンパク質である、本発明1001～1020のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1022]

第一及び/又は第二の異種タンパク質が、Toll様レセプター、TNFレセプター、GPCR、増殖因子レセプター、ネクチン、インターロイキン、又はインターロイキンレセプターである、本発明1001～1020のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1023]

第一及び/又は第二の異種タンパク質が、哺乳動物のものである、本発明1001～1022のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1024]

第一及び/又は第二の異種タンパク質が、細胞膜に局在化した位置に発現される、本発明1001～1022のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1025]

第一及び/又は第二の所定の異種タンパク質が、分泌タンパク質、膜貫通タンパク質、又は細胞表面タンパク質である、本発明1001～1024のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1026]

前記細胞マイクロアレイが、異種タンパク質を発現するように形質転換された、500以上の異なる複数の細胞を含み、複数の細胞がそれぞれ、他の複数の形質転換細胞により発現された異種タンパク質と互いに異なる異種タンパク質を発現する、本発明1001～1025のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1027]

異種タンパク質が、分泌タンパク質であり、膜貫通ヘリックスに融合されて発現される、本発明1001～1026のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1028]

第一の蛍光タンパク質と第二の蛍光タンパク質が、同じタイプであり、第三の蛍光タンパク質が、異なるタイプのものである、本発明1001～1027のいずれかの細胞マイクロアレイ。

[本発明1029]

第一の異種タンパク質及び第一の蛍光タンパク質をコードする第一の複数の発現構築物を、マイクロアレイの固体表面に貼付する段階、並びに

第二の異種タンパク質及び第二の蛍光タンパク質をコードする少なくとも第二の複数の発現構築物を、貼付された第一の複数の発現構築物とは異なる空間的に別個の位置でマイクロアレイの固体表面に貼付する段階、並びに

細胞を固体表面に接着させるように、かつそれぞれ空間的に別個の位置にある細胞の少なくとも一部に各発現構築物によるトランスフェクションを起こさせるために、トランスフェクション剤の存在を含む条件下で、発現構築物を複数の細胞と接触させる段階を含む、本発明1001～1028のいずれかの細胞マイクロアレイを作製するための方法。

[本発明1030]

ライゲーション非依存性クローニング (LIC) を用いて、発現構築物を調製する、本発明1029の方法。

[本発明1031]

候補タンパク質又はペプチドが第二のタンパク質又はペプチドに結合するかどうかを決定する方法であって、

第二のタンパク質を本発明1001～1028のいずれかの細胞マイクロアレイの異種タンパク質として発現させる段階、及び細胞マイクロアレイを第三の蛍光タンパク質又はペプチドに貼付された候補タンパク質又はペプチドと接触させる段階、候補タンパク質又はペプチドと接触させた細胞マイクロアレイを洗浄して、非結合候補タンパク質又はペプチドを除去する段階、及び洗浄後に細胞マイクロアレイに結合された任意の候補タンパク質又はペプチドが存在するかどうかを決定する段階を含み、

第一の異種タンパク質で形質転換された細胞に対応する第一の空間的位置に洗浄後の細胞マイクロアレイに結合された候補タンパク質又はペプチドが存在すれば、候補タンパク質又はペプチドが第一の異種タンパク質に結合していることが示され、洗浄後の第一の空間的位置に細胞マイクロアレイに結合された候補タンパク質又はペプチドが存在しなければ、候補タンパク質又はペプチドが異種タンパク質に結合していないことが示される、前記方法。

[本発明1032]

洗浄後に細胞マイクロアレイに結合された任意の候補タンパク質又はペプチドが存在するかどうかを決定する段階が、第三の蛍光タンパク質の蛍光を測定すること、及び細胞マイクロアレイでの位置を決定することにより実行され、

第三の蛍光タンパク質と、第一又は第二の蛍光タンパク質が空間的に別個の位置に共存することにより、第一のタンパク質又はペプチドが、空間的に別個の位置に対応する異種タンパク質に結合されていることが示される、本発明1031の方法。

[本発明1033]

(i) マイクロアレイの固体表面、及び、細胞表面で候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第一の C - 末端細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、浮遊培養適合細胞株と、

(i i) 少なくとも (a) 所定の異種タンパク質を細胞表面で発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、第二の複数の細胞、又は (b) 異種タンパク質を表面に貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数のマイクロビーズと

を含むシステムであって、(a) 又は (b) が、前記マイクロアレイの固体表面に貼付されている、前記システム。

[本発明1034]

(c) 異なる所定の異種タンパク質を細胞表面で発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、1つ以上のさらなる複数の細胞、又は

(d) 異なる所定の異種タンパク質を表面に貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、1つ以上のさらなる複数のマイクロビーズ

をさらに含み、(c) 又は (d) が、複数の (a) 及び / 又は (b) とは空間的に別個の位置でマイクロアレイ固体表面に貼付されている、本発明1033のシステム。

[本発明1035]

異種タンパク質が、プロテイン A 分子を介してマイクロビーズに貼付されている、本発明1033又は1034のシステム。

[本発明1036]

細胞表面で候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように形質転換された浮遊培養適合細胞株が、候補リガンドタンパク質又はペプチドをコードする核酸構築物で一過性にトランスフェクトされている、本発明1033、1034又は1035のシステム。

[本発明1037]

異種タンパク質が、マイクロビーズに付着された抗体により結合させることによりマイ

クロビーズに貼付されている、本発明1033～1036のいずれかのシステム。

[本発明1038]

第一の蛍光タンパク質と第二の蛍光タンパク質が、異なる色である、本発明1033～1037のいずれかのシステム。

[本発明1039]

一方の蛍光タンパク質が、緑色であり、他方の蛍光タンパク質が、赤色である、本発明1038のシステム。

[本発明1040]

前記複数の細胞が、複数の哺乳動物細胞である、本発明1033～1039のいずれかのシステム。

[本発明1041]

前記細胞が、単離されたヒト細胞である、本発明1033～1040のいずれかのシステム。

[本発明1042]

前記細胞が、ヒト胎児腎（H E K）細胞株の細胞である、本発明1033～1041のいずれかのシステム。

[本発明1043]

前記細胞が、H E K 293細胞株の細胞である、本発明1033～1042のいずれかのシステム。

[本発明1044]

所定の異種タンパク質が、マルチサブユニット異種タンパク質のあるサブユニットであり、前記複数の細胞が、マルチサブユニット異種タンパク質の1つ以上の残りのメンバーも発現するように形質転換されている、本発明1033～1043のいずれかのシステム。

[本発明1045]

所定の異種タンパク質が、分泌タンパク質、膜タンパク質、又は細胞表面タンパク質である、本発明1033～1044のいずれかのシステム。

[本発明1046]

所定の異種タンパク質が、発現される際に、C末端を介して蛍光タンパク質に付着される、本発明1033～1045のいずれかのシステム。

[本発明1047]

所定の異種タンパク質が、分泌タンパク質であり、発現される際に、膜貫通アンカーペプチド又はタンパク質に付着される、本発明1033～1046のいずれかのシステム。

[本発明1048]

発現構築物が、p E G F P - N1発現構築物及び / 又はC M Vプロモータを含む、本発明1033～1047のいずれかのシステム。

[本発明1049]

異種タンパク質が、イムノグロブリンスーパーファミリータンパク質、T N Fレセプタータンパク質、サイトカイン、ケモカイン、1型膜貫通レセプタータンパク質、2型膜貫通レセプタータンパク質、イオンチャネルタンパク質、又は膜輸送タンパク質である、本発明1033～1048のいずれかのシステム。

[本発明1050]

異種タンパク質が、T o l l様レセプター、T N Fレセプター、G P C R、増殖因子レセプター、ネクチン、インターロイキン、又はインターロイキンレセプターである、本発明1033～1049のいずれかのシステム。

[本発明1051]

異種タンパク質が、哺乳動物のものである、本発明1033～1050のいずれかのシステム。

[本発明1052]

異種タンパク質が、細胞膜に局在化した位置で発現される、本発明1033～1051のいずれかのシステム。

[本発明1053]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが、第二のタンパク質又はペプチドに結合するか

どうかを決定する方法であって、

本発明1033～1052のいずれかのシステムの浮遊培養適合細胞株の複数において候補リガンドタンパク質又はペプチド及び第一の蛍光タンパク質を発現させる段階、並びに

前記細胞株の複数を、(a)異種タンパク質及び第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された第二の複数の細胞、又は(b)異種タンパク質及び第二の蛍光タンパク質を表面に貼付させた複数のマイクロビーズ、と接触させる段階、並びに

洗浄して非結合候補リガンドタンパク質又はペプチドを除去する段階、並びに

FACS分析又は磁気分離により第一及び第二の両方の蛍光タンパク質の共存を示す細胞を同定する段階

を含み、

細胞が空間的に別個の位置の第一及び第二の両方の蛍光タンパク質の共存を示していれば、第一のタンパク質又はペプチドが空間的に別個の位置に対応する異種タンパク質に結合していることが示される、前記方法。

[本発明1054]

第一及び第二の両方の蛍光タンパク質の共存が、FACS分析により決定される、本発明1053の方法。

[本発明1055]

細胞表面で第一の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するようにあるベクターで形質転換された、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、該ベクターが第一の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドに対する独特な所定の15～35ヌクレオチド配列を含み、独特な配列が1つ以上のユニバーサルプライマーにより鎖延長することが可能である、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

細胞表面で第二の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように第二のベクターで形質転換された、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、第二のベクターが第二の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドに対する別の独特な所定の15～35ヌクレオチド配列を含む、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

(i)細胞表面でレセプタータンパク質若しくはペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、第二の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含む、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、又は(ii)表面にレセプタータンパク質を貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズとを含むシステム。

[本発明1056]

細胞表面で第一の異種タンパク質を発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するようにあるベクターで形質転換された、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、該ベクターが第一の異種タンパク質に対する独特な所定の15～35ヌクレオチド配列を含み、独特な配列が1つ以上のユニバーサルプライマーにより鎖延長することが可能である、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

細胞表面で第二の異種タンパク質を発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように第二のベクターで形質転換された、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、第二のベクターが第二の異種タンパク質に対する別の独特な所定の15～35ヌクレオチド配列を含む、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

(i)細胞表面で候補リガンドタンパク質若しくはペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、第二の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含む、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、又は(ii)表面に候補リガンドタンパク質若しくはペプチドを貼付させ、かつ第二の蛍光

タンパク質を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズとを含むシステム。

[本発明1057]

ユニバーサルプライマーが、T7フォワード及びリバーズユニバーサルプライマーを含む、本発明1055又は1056のシステム。

[本発明1058]

ペプチド細胞表面エピトープが、FLAGエピトープ(DYKDDDK)である、本発明1055、1056又は1057のシステム。

[本発明1059]

磁気分子物質を含む抗FLAGエピトープ抗体をさらに含み、該抗体がFLAGエピトープに結合されている、本発明1058のシステム。

[本発明1060]

磁気分子物質が、超常磁性鉄含浸ビーズである、本発明1059のシステム。

[本発明1061]

独特な所定の15～35ヌクレオチド配列が、28ヌクレオチド長である、本発明1055～1060のいずれかのシステム。

[本発明1062]

表面に候補リガンドタンパク質又はペプチドを貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズを含む、本発明1055～1061のいずれかのシステム。

[本発明1063]

細胞表面で候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、1つ以上の更なる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞を含み、第二の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含む、本発明1055～1061のいずれかのシステム。

[本発明1064]

表面に候補リガンドタンパク質又はペプチドを貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズを、少なくとも1つのウェルが含み、表面に異なる候補リガンドタンパク質又はペプチドを貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、異なる複数の磁気マイクロビーズを、第二のウェルが含み、マルチウェルプレートを含む、本発明1056～1063のいずれかのシステム。

[本発明1065]

細胞表面で候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、更なる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞を、少なくとも1つのウェルが含み、更なる複数の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含み、細胞表面で候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、異なる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞を、第二のウェルが含み、異なる複数の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含む、マルチウェルプレートを含む、本発明1055～1063のいずれかのシステム。

[本発明1061]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが、第二の所定のタンパク質に結合するかどうかを決定する方法であって、

第二の所定のタンパク質を本発明1055～1060のいずれかのシステムの異種タンパク質として発現させる段階、及び

(i)細胞表面で候補リガンドタンパク質若しくはペプチドを発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、第二の浮遊培養適合細胞株が、安定して発現されるペプチド細胞表面エピトープを含む、1つ以上のさらなる複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、又は

(i i) 表面に候補リガンドタンパク質若しくはペプチドを貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズ

の候補リガンドタンパク質又はペプチドと接触させる段階；

第二の複数の細胞の1つ以上に又は複数の磁気マイクロビーズに結合された第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞のいずれかを、磁気引力により分離する段階；

そのような分離された細胞間又は細胞 - マイクロビーズのコンジュゲートからDNAを得て、存在するならばDNA中の独特な配列を、ユニバーサルプライマーを用いて増幅させる段階；

独特な配列の複数のコピーをシーケンシングして独特な配列の存在を確認する段階；

そのように同定された独特な配列をデータベースに対して比較して、独特な所定の15～35ヌクレオチド配列を特異的異種タンパク質又はペプチドに相関させ、それによりそのように相関された任意の異種タンパク質又はペプチド結合を同定し、それにより特異的異種タンパク質又はペプチドを、候補タンパク質又はペプチドに結合しているとして同定する段階

を含む、前記方法。

[本発明1062]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが、プロテインA分子を介してマイクロビーズに貼付されている、本発明1061の方法。

[本発明1063]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが、マイクロビーズに付着された抗体により結合させることによりマイクロビーズに貼付されている、本発明1061又は1062の方法。

[本発明1064]

第一の蛍光タンパク質と第二の蛍光タンパク質が、異なる色である、本発明1061～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

一方の蛍光タンパク質が、緑色であり、他方の蛍光タンパク質が、赤色である、本発明1061～1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

前記複数の細胞が、複数の哺乳動物細胞である、本発明1061～1065のいずれかの方法。

[本発明1067]

哺乳動物細胞が、単離されたヒト細胞である、本発明1061～1066のいずれかの方法。

[本発明1068]

哺乳動物細胞が、ヒト胎児腎（HEK）細胞株の細胞である、本発明1061～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

哺乳動物細胞が、HEK293細胞株の細胞である、本発明1068の方法。

[本発明1070]

所定の異種タンパク質が、マルチサブユニット異種タンパク質のあるサブユニットであり、前記複数の細胞が、マルチサブユニット異種タンパク質の1つ以上の残りのメンバーも発現するように形質転換されている、本発明1061～1069のいずれかの方法。

[本発明1071]

所定の異種タンパク質が、発現される際に、C末端を介して蛍光タンパク質に付着される、本発明1061～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

所定の異種分泌タンパク質が、発現される際に、膜貫通アンカーペプチドに付着される、本発明1061～1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

異種タンパク質が、イムノグロブリンスーパーファミリータンパク質、TNFレセプタータンパク質、サイトカイン、ケモカイン、1型膜貫通レセプタータンパク質、2型膜貫通レセプタータンパク質、イオンチャネルタンパク質、又は膜輸送タンパク質である、本発

明1061～1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

異種タンパク質が、T o l l様レセプター、TNFレセプター、GPCR、増殖因子レセプター、ネクチン、インターロイキン、又はインターロイキンレセプターである、本発明1061～1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

異種タンパク質が、哺乳動物のものである、本発明1061～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

異種タンパク質が、細胞膜に局在化した位置で発現される、本発明1061～1075のいずれかの方法。

[本発明1077]

(i) マイクロアレイの固体表面と、

(i i) (a) 複数の異なるタンパク質の各タンパク質タイプが、1～25アミノ酸残基の点突然変異により複数のタンパク質の他のタイプそれぞれと異なる、複数の異なる第一の異種タンパク質のうちの単一タイプを、複数の細胞の細胞表面で、および

(b) 第一の細胞質発現蛍光タンパク質を

発現するように形質転換された浮遊培養適合細胞株の複数の細胞と、

(i i i) 少なくとも(1)所定の第二の異種タンパク質を細胞表面で発現するように、かつ第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された、第二の複数の細胞、又は(2)浮遊培養適合細胞株に関して異種の第二のタンパク質を表面に貼付させ、かつ第二の蛍光タンパク質を貼付させた、複数のマイクロビーズと
を含み、(1)又は(2)が、前記マイクロアレイの固体表面に貼付されている、システム

。

[本発明1078]

前記複数の第一の異種タンパク質の異なるタイプが、野生型タンパク質の各突然変異体である、本発明1077のシステム。

[本発明1079]

第二の異種タンパク質が、野生型タンパク質である、本発明1078のシステム。

[本発明1080]

複数の異なるタンパク質の各タンパク質タイプが、1、2、3、4又は5アミノ酸残基の点突然変異により複数のタンパク質の互いのタイプと異なっている、本発明1077、1078又は1079のシステム。

[本発明1081]

複数の異なるタンパク質の各タンパク質タイプが、1アミノ酸残基の点突然変異により複数のタンパク質の互いのタイプと異なっている、本発明1077、1078又は1079のシステム

。

[本発明1082]

第一又は第二の蛍光タンパク質が、緑色である、本発明1077～1081のいずれかのシステム。

[本発明1083]

他の蛍光タンパク質が、赤色である、本発明1077～1082のいずれかのシステム。

[本発明1084]

野生型タンパク質中の残基を、野生型タンパク質と第二のタンパク質との物理的相互作用に影響を及ぼすものであると決定する方法であって、

野生型タンパク質に関して変異されたタンパク質を、本発明1077～1083のいずれかのシステムの浮遊培養適合細胞株の複数のうちの異なる複数として発現させる段階、並びに

前記複数を、第二のタンパク質及び第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された本発明1077～1083のいずれかのシステムの第二の複数の細胞の形態の第二のタンパク質と、又は(b) 表面に第二のタンパク質及び第二の蛍光タンパク質を貼付させた複数のマイクロビーズと、接触させる段階、並びに

洗浄して非結合細胞を除去する段階、並びに

F A C S 分析により第一及び第二の両方の蛍光タンパク質の共存を示す細胞を同定する段階

を含み、空間的に別個の位置において細胞が第一及び第二の両方の蛍光タンパク質の共存を示していれば、空間的に別個の位置に対応する共存する浮遊培養適合細胞株の細胞上のタンパク質中で変異された1つ又は複数の残基が、野生型タンパク質と第二のタンパク質との物理的相互作用に必要なでないことが示される、前記方法。

[本発明1085]

野生型タンパク質及び第二のタンパク質が、互いに物理的に相互作用することが公知である、本発明1084の方法。

[本発明1086]

第一及び第二の蛍光タンパク質の両方の共存が、F A C S 分析により決定される、本発明1085の方法。

[本発明1087]

(i) (a) 細胞表面で異種タンパク質を発現するように、かつ (b) 第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、あるベクターで形質転換された、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞であって、該ベクターが発現された異種タンパク質に対する独特な所定の15~35ヌクレオチド配列を含むことで、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞が少なくとも2つの異なるタイプの第一の異種タンパク質を発現する、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

(i i) 細胞表面で第二の異種タンパク質を発現するように、かつ第二の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように、第二のベクターで形質転換されており、単一タイプの第二の異種タンパク質を発現する、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞とを含むシステム。

[本発明1088]

第一の複数の細胞の任意の個々の細胞が、細胞表面の唯一の異種タンパク質を発現する、本発明1087のシステム。

[本発明1089]

第二の異種タンパク質が、膜レセプターである、本発明1087又は1088のシステム。

[本発明1090]

第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞中で発現された異種タンパク質のそれぞれが、分泌されたペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質である、本発明1087、1088又は1089のシステム。

[本発明1091]

複数の第一の異種タンパク質の異なるタイプが、所定の野生型タンパク質の各突然変異体である、本発明1087、1088、1089又は1090のシステム。

[本発明1092]

第二の異種タンパク質が、野生型タンパク質である、本発明1087~1091のいずれかのシステム。

[本発明1093]

第一の複数の異なるタンパク質の異種タンパク質の各タイプが、1、2、3、4又は5アミノ酸残基の点突然変異により複数の異種タンパク質の互いのタイプと異なっている、本発明1087~1092のいずれかのシステム。

[本発明1094]

複数の異なるタンパク質の各タンパク質タイプが、1アミノ酸残基の点突然変異により複数の異種タンパク質の互いのタイプと異なっている、本発明1087~1093のいずれかのシステム。

[本発明1095]

独特な配列が、1つ以上のユニバーサルプライマーにより鎖延長することが可能である、本発明1087~1094のいずれかのシステム。

[本発明1096]

第一又は第二の蛍光タンパク質が、緑色である、本発明1087～1095のいずれかのシステム。

[本発明1097]

他の蛍光タンパク質が、赤色である、本発明1096のシステム。

[本発明1098]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが第二のタンパク質又はペプチドに結合するかどうかを決定する方法であって、

第一の異種タンパク質を第二の異種タンパク質に結合させる条件下で、候補リガンドタンパク質又はペプチドを本発明1087～1097のいずれかのシステムにおいて第一の複数の細胞の第一の異種タンパク質として発現させ、かつ第二のタンパク質又はペプチドを本発明1087～1097のいずれかのシステムにおいて第二の異種タンパク質として発現させる段階、並びに

任意で洗浄して非結合の第一の異種タンパク質をいずれも除去する段階、

その後、第一及び第二の異種タンパク質が両方とも共存する細胞を回収する段階、

回収された細胞から核酸を得る段階、及び核酸をシーケンシングして、それに含まれる独特な15～35ヌクレオチド配列を同定することで、第二のタンパク質又はペプチドに結合した独特な15～35ヌクレオチドに対応する候補リガンドタンパク質又はペプチドを同定する段階

を含む、前記方法。

[本発明1099]

第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合に及ぼす、第一のタンパク質の所定のアミノ酸残基の影響を決定する方法であって、

第一のタンパク質に対して1つ以上の点突然変異により変異されたタンパク質を、本発明1087～1097のシステムの第一の浮遊培養適合細胞株の複数の中の複数の異なるタイプの異種タンパク質として発現させる段階、並びに

該複数を、第二のタンパク質及び第二の蛍光タンパク質を発現するように形質転換された本発明1087～1097のシステムの第二の複数の細胞の第二の異種タンパク質の形態の第二のタンパク質と接触させる段階、並びに

第一及び第二の蛍光タンパク質の両方の共存を示す細胞を回収する段階、

回収された細胞から核酸を得る段階、及び核酸をシーケンシングしてそれに含まれる独特な15～35ヌクレオチド配列を同定することで、第二のタンパク質又はペプチドに結合された第一のタンパク質を同定する段階、並びに

第二のタンパク質又はペプチドに結合されたタンパク質のレベルを、所定の参照レベルと比較する段階

を含み、

第二のタンパク質又はペプチドに結合されたタンパク質のレベルが所定の参照レベルよりも多ければ、タンパク質中で変異された1つ又は複数の残基が、第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合を増大させていることが示され、第二のタンパク質又はペプチドに結合されたタンパク質のレベルが所定の参照レベルよりも少なければ、タンパク質中で変異された1つ又は複数の残基が、第二のタンパク質への第一のタンパク質の結合を阻害していることが示される、前記方法。

[本発明1100]

所定のレベルが、対照である、本発明1099の方法。

[本発明1101]

所定のレベルが、第二のタンパク質に結合する未変異の第一のタンパク質のレベルをアッセイすることにより得られる、本発明1099の方法。

[本発明1102]

第一及び第二の蛍光タンパク質の両方の共存を示す細胞が、FACS分析により回収される、本発明1098～1101のいずれかの方法。

[本発明1103]

(i) 細胞表面で第一の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するようにあるベクターで形質転換された、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、及び細胞表面で第二の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第二の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように第二のベクターで形質転換された、第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と

(i i) 表面に標的タンパク質、ペプチド、又は抗体を貼付させた、複数の磁気マイクロビーズとを含む、システム。

[本発明1104]

2つの候補リガンドタンパク質又はペプチドの1つ以上が標的タンパク質、ペプチド、又は抗体に結合するかどうかを決定する方法であって、

第一の異種タンパク質及び第二の異種タンパク質を、標的タンパク質、ペプチド、又は抗体に結合させる条件下で、第一の候補リガンドタンパク質又はペプチドを、本発明1103のシステムにおいて第一の複数の細胞の第一の異種タンパク質として発現させ、かつ第二の候補リガンドタンパク質又はペプチドを、本発明1103のシステムにおいて第二の異種タンパク質として発現させる段階、並びに

第一の蛍光タンパク質発現細胞と複合体化されかつ / 又は第二の蛍光タンパク質発現細胞と複合体化された任意のマイクロビーズを回収する段階、並びに

複合体中の候補リガンドタンパク質を同定する段階を含み、

第一の蛍光タンパク質発現細胞の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されれば、第一の候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合していることが示され、第二の蛍光タンパク質発現細胞の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されれば、第二の候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合していることが示され、第一の蛍光タンパク質発現細胞又は第二の蛍光タンパク質発現細胞の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されなければ、それぞれ第一の候補リガンドタンパク質が標的タンパク質又はペプチドに結合していないこと、及び第二の候補リガンドタンパク質が標的タンパク質又はペプチドに結合していないことが示される、前記方法。

[本発明1105]

(i) 細胞表面で第一の異種標的タンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第一の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するようにあるベクターで形質転換された、第一の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞、及び細胞表面で第二の異種候補リガンドタンパク質又はペプチドを発現するように、かつ第二の細胞質発現蛍光タンパク質を発現するように第二のベクターで形質転換された、1つ以上の第二の複数の浮遊培養適合細胞株の細胞と、

(i i) 候補リガンドタンパク質若しくはペプチドのいずれかに対する抗体又は標的タンパク質若しくはペプチドに対する抗体を表面に貼付させた、複数の磁気マイクロビーズとを含むシステム。

[本発明1106]

候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合するかどうかを決定する方法であって、

候補リガンドタンパク質又はペプチドと標的タンパク質又はペプチドを結合させる条件下で、候補リガンドタンパク質又はペプチドを本発明1105のシステムにおいて第二の複数の細胞の第二の異種タンパク質として発現させ、かつ標的タンパク質又はペプチドを本発明1105のシステムにおいて第一の異種タンパク質として発現させる段階、並びに

第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方と複合体化された任意のマイクロビーズを回収する段階を含み、

第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されれば、候補リガンドタンパク質又はペプチドが標的タンパク質又はペプチドに結合していることが示され、第一の蛍光タンパク質発現細胞及び第二の蛍光タンパク質発現細胞の両方の複合体に付着されたマイクロビーズが回収されなければ、候補リガンドタンパク質が標的タンパク質又はペプチドに結合していないことが示される、前記方法。