

【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28年3月10日(2016.3.10)

【公表番号】特表2015-506699(P2015-506699A)

【公表日】平成27年3月5日(2015.3.5)

【年通号数】公開・登録公報2015-015

【出願番号】特願2014-555774(P2014-555774)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 4 0 B	40/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 M	3/00	(2006.01)
G 0 1 N	33/543	(2006.01)
C 4 0 B	30/06	(2006.01)
C 0 7 K	14/435	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	A
C 4 0 B	40/10	Z N A
C 1 2 Q	1/68	A
C 4 0 B	40/06	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 M	3/00	A
G 0 1 N	33/543	5 9 7
C 4 0 B	30/06	
C 0 7 K	14/435	

【手続補正書】

【提出日】平成28年1月21日(2016.1.21)

【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】

所望の生物学的活性を有する生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバーが異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、

(b) ポリペプチドの発現を許容する条件下で前記核酸分子をインキュベートするステップであって、ポリペプチド分子の集団が前記核酸分子から発現され、

各ポリペプチド分子がそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、インキュベートするステップと、

(c) 前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験するステップと、

(d) 前記細胞において生物学的応答を呈するポリペプチドに会合した核酸分子を単離して、前記生物学的に活性なポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

【請求項2】

前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験することが、約5～100個または約1,000～5,000個の細胞上の前記メンバーポリペプチドを個別に試験することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験することが、前記メンバーポリペプチドをエマルジョンのマイクロカプセル中で単離された生細胞と接触させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

各ポリペプチド分子が、ゲル、マイクロタイターブレートのウェル、またはエマルジョンのマイクロカプセル中でそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

生物学的応答について細胞を試験することが、前記細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、前記細胞による蛍光染料の取り込みまたは排除を検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、標識試薬の前記細胞への結合を検出することを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記標識試薬が抗体である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

生物学的応答を呈するポリペプチドと会合した核酸分子を単離することが、親和性精製または蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記細胞が前記ポリペプチドに対する生物学的応答を呈する場合にのみ、前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子が前記細胞の成分に結合される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記生物学的応答が細胞溶解であり、前記試験細胞の前記成分が細胞内タンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、前記成分に結合する結合部分を用いて前記試験細胞の前記成分を精製することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記細胞を試験することが、前記核酸分子が前記試験細胞の前記成分に結合されるかを決定することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記核酸分子が担体上に固定化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

生物学的応答について細胞を試験することが、前記担体に結合したタグの蛍光、発光、または吸収特性の変化を検出することを含む、請求項 1_6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記担体に結合した前記タグの前記特性の前記変化が、前記所望の生物学的活性を呈する前記試験細胞において遺伝子導入的に発現されるレポーター酵素によって媒介される、請求項 1_7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ビーズまたは前記核酸分子が検出可能な標識を含む、請求項 1_6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記担体が磁気ビーズである、請求項 1_6 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記核酸集団の前記核酸分子がそれぞれ、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答が、細胞死、分化、増殖、または増強された多分化能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答がアポトーシスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記細胞に結合するアネキシン V を検出すること、または前記細胞におけるカスパーゼ活性化を検出することを含む、請求項 2_3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記細胞が、癌細胞、神経細胞、免疫細胞、幹細胞、または人工多能性幹 (i P S) 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記細胞が、レポーター分子の発現のための導入遺伝子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記試験が、1 mL の試験体積当たり少なくとも 1 0 , 0 0 0 個のはっきりと異なるメンバー ポリペプチドの濃度で行われ、前記はっきりと異なるメンバー ポリペプチドが、ゲル中の別個の区画またはエマルジョンのマイクロカプセルに含まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

複数の個々の細胞複合体を含むライプラリ であって、前記ライプラリ の各複合体が 1 個以上のビーズと会合した細胞を含み、前記細胞が組換えポリペプチドを含み、前記 1 個または複数のビーズが前記組換えポリペプチドをコードする核酸分子に結合し、前記ライプラリ の個々の細胞複合体が異なる組換えポリペプチドを含む、ライプラリ。

【請求項 2 9】

所望の活性を有する活性ポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、
(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバー が異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、
(b) ポリペプチドの発現を許容する条件下で前記核酸分子をインキュベートするステップであって、ポリペプチド分子の集団が前記核酸集団の前記核酸分子から発現され、

各ポリペプチド分子がそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、インキュベートするステップと、

(c) 前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する応答について標的分子を試験するステップと、

(d) 前記標的分子に対する応答を提供するポリペプチドと会合した核酸分子を単離して、前記活性ポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

所望の生物学的活性を有する生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の核酸集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバーが異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、

(b) ポリペプチドの発現を許容する条件下で前記核酸分子をインキュベートするステップであって、ポリペプチド分子の集団が前記核酸集団の前記核酸分子から発現され、各ポリペプチド分子がそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、インキュベートするステップと、

(c) 前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験するステップと、

(d) 前記細胞において生物学的応答を呈するポリペプチドに会合した核酸分子を単離して、前記生物学的に活性なポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

(項目2)

前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験することが、単一細胞上の前記メンバーポリペプチドを個別に試験することを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験することが、約5～100個または約1,000～5,000個の細胞上の前記メンバーポリペプチドを個別に試験することを含む、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する生物学的応答について細胞を試験することが、前記メンバーポリペプチドをエマルジョンのマイクロカプセル中で単離された生細胞と接触させることを含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

各マイクロカプセルが、平均1個の前記メンバーポリペプチドを含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

各ポリペプチド分子が、ゲル、マイクロタイタープレートのウェル、またはエマルジョンのマイクロカプセル中でそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞である、項目1に記載

の方法。

(項目8)

生物学的応答について細胞を試験することが、前記細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することを含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、前記細胞による蛍光染料の取り込みまたは排除を検出することを含む、項目2に記載の方法。

(項目10)

前記細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、標識試薬の前記細胞への結合を検出することを含む、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記標識試薬が抗体である、項目10に記載の方法。

(項目12)

生物学的応答を呈するポリペプチドと会合した核酸分子を単離することが、親和性精製または蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記細胞が前記ポリペプチドに対する生物学的応答を呈する場合にのみ、前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子が前記細胞の成分に結合される、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記生物学的応答が細胞溶解であり、前記試験細胞の前記成分が細胞内タンパク質である、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、前記成分に結合する結合部分を用いて前記試験細胞の前記成分を精製することを含む、項目13に記載の方法。

(項目16)

前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記細胞を試験することが、前記核酸分子が前記試験細胞の前記成分に結合されるかを決定することを含む、項目13に記載の方法。

(項目17)

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、項目1に記載の方法。

(項目18)

前記核酸分子が担体上に固定化される、項目1に記載の方法。

(項目19)

生物学的応答について細胞を試験することが、前記担体に結合したタグの蛍光、発光、または吸収特性の変化を検出することを含む、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記担体に結合した前記タグの前記特性の前記変化が、前記所望の生物学的活性を呈する前記試験細胞において遺伝子導入的に発現されるレポーター酵素によって媒介される、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記ビーズまたは前記核酸分子が検出可能な標識を含む、項目18に記載の方法。

(項目22)

前記担体が磁気ビーズである、項目18に記載の方法。

(項目23)

前記核酸集団の前記核酸分子がそれぞれ、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、項目1に記載の方法。

(項目24)

前記細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答が、細胞死、分化、増殖、または増強された多分化能である、項目1に記載の方法。

(項目 25)

前記細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答がアポトーシスである、項目1に記載の方法。

(項目 26)

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記細胞に結合するアネキシンVを検出すること、または前記細胞におけるカスパーゼ活性化を検出することを含む、項目25に記載の方法。

(項目 27)

前記細胞が、癌細胞、神経細胞、免疫細胞、幹細胞、または人工多能性幹(iPS)細胞である、項目1に記載の方法。

(項目 28)

前記細胞が、レポーター分子の発現のための導入遺伝子を含む、項目1に記載の方法。

(項目 29)

前記試験が、1mLの試験体積当たり少なくとも10,000個のはっきりと異なるメンバー・ポリペプチドの濃度で行われ、前記はっきりと異なるメンバー・ポリペプチドが、ゲル中の別個の区画またはエマルジョンのマイクロカプセルに含まれる、項目1に記載の方法。

(項目 30)

所望の生物学的活性を有する生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、

(a) 少なくとも50,000個の異なる分子を含むポリペプチド分子のライブラリを得るステップと、

(b) 前記ポリペプチド分子に対する生物学的応答について生試験細胞上の前記異なるポリペプチド分子を個別に試験するステップと、

(c) 生物学的に活性なポリペプチド分子のサブセットをコードする核酸分子の配列を特定するステップと、を含む、方法。

(項目 31)

生試験細胞上の前記異なるポリペプチド分子を個別に試験することが、単一細胞上の前記異なるポリペプチド分子を個別に試験することを含む、項目30に記載の方法。

(項目 32)

生試験細胞上の前記異なるポリペプチド分子を個別に試験することが、約5～100個の細胞または約1,000～5,000個の細胞上の前記異なるポリペプチド分子を個別に試験することを含む、項目30に記載の方法。

(項目 33)

生試験細胞上の前記異なる分子を個別に試験することが、前記ポリペプチド分子をゲル、ウェル、またはエマルジョンのマイクロカプセル中で単離された生細胞と接触させることを含む、項目30に記載の方法。

(項目 34)

前記異なる分子を個別に試験することが、前記ポリペプチド分子をエマルジョンのマイクロカプセル中で単離された生細胞と接触させることを含む、項目33に記載の方法。

(項目 35)

各マイクロカプセルが、平均1個の前記異なるポリペプチド分子を含む、項目34に記載の方法。

(項目 36)

前記試験が、1mLの試験体積当たり少なくとも10,000個のはっきりと異なるポリペプチドライブラリメンバーの濃度で行われ、前記はっきりと異なるポリペプチドが、エマルジョンの別個のマイクロカプセルに含まれる、項目30に記載の方法。

(項目 37)

前記試験細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞である、項目30に記載の方法。

(項目38)

複数の担体粒子を含むポリペプチドライブリであって、各粒子が、

a) 第1の結合部分によって前記粒子と会合したはっきりと異なる核酸分子の1個以上のコピーと、

b) 前記はっきりと異なる核酸分子によってコードされた複数のポリペプチド分子と、を含み、前記複数のポリペプチドがそれぞれ、第2の結合部分によって前記粒子と会合する、ライブリ。

(項目39)

各粒子が、前記はっきりと異なる核酸分子の2個以上のコピーを含む、項目38に記載のライブリ。

(項目40)

各粒子が、前記はっきりと異なる核酸分子の約100万～2000万個のコピーを含む、項目39に記載のライブリ。

(項目41)

前記複数のポリペプチド分子が、約1億～100億個の分子を含む、項目38に記載のライブリ。

(項目42)

少なくとも50,000個のはっきりと異なる核酸分子を含む、項目38に記載のライブリ。

(項目43)

前記担体粒子が検出可能な標識を含む、項目38に記載のライブリ。

(項目44)

前記担体粒子がビーズである、項目38に記載のライブリ。

(項目45)

各粒子がマイクロカプセルに含まれる、項目38に記載のライブリ。

(項目46)

前記マイクロカプセルが逆ミセルであり、前記ライブリがエマルジョンに含まれる、項目45に記載のライブリ。

(項目47)

前記はっきりと異なる核酸分子が、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、項目38に記載のライブリ。

(項目48)

所望の生物学的活性を有する生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の核酸集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバーが異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、

(b) マイクロカプセルの第1の集団を調製するステップであって、前記マイクロカプセルの第1の集団が、

i) 前記核酸集団の核酸分子と、

ii) 前記ポリペプチドの発現のための成分と、

iii) 前記核酸分子および担体と会合した第1の結合部分と、

iv) 前記核酸分子と会合した第2の結合部分と、を含み、

前記マイクロカプセル集団の個々のメンバーが前記核酸集団のはっきりと異なるメンバーを組み込む、調製するステップと、

(c) マイクロカプセルの前記第1の集団をインキュベートしてポリペプチドの発現を許容するステップであって、発現したポリペプチドが前記第2の結合部分によって結合されてポリペプチド-核酸複合体を形成する、許容するステップと、

(d) マイクロカプセルの第2の集団を得るステップであって、前記マイクロカプセルの第2の集団が、

i) 試験細胞と、

i i) 前記ポリペプチド - 核酸複合体と、を含む、得るステップと、

(e) 前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記試験細胞を試験するステップと、

(g) 前記応答を呈するポリペプチドをコードする核酸分子を単離して、前記生物学的に活性なポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

(項目 4 9)

ステップ (d) の前に前記ポリペプチド - 核酸複合体を精製することをさらに含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

ステップ (d) が、 i i i) 前記ポリペプチドを前記第 2 の結合部分から解離する第 1 の解離剤をさらに含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

ステップ (b) が、 v) 前記核酸分子と会合したさらなる結合部分をさらに含み、ステップ (d) が、 i i i) 前記核酸を前記ビーズから解離する第 2 の解離剤をさらに含み、前記さらなる結合部分が前記核酸を前記細胞に結合させる、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 2)

ステップ (d) が、 i i i) 前記核酸を前記ビーズから解離する第 2 の解離剤をさらに含み、前記核酸が前記細胞に非特異的に結合する、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 3)

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、前記細胞による蛍光染料の取り込みまたは排除を検出することを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、標識試薬の前記試験細胞への結合を検出することを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記標識試薬が抗体である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、親和性精製または蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 8)

マイクロカプセルの前記第 2 の集団を得ることが、マイクロカプセルの前記第 1 の集団を試験細胞を含むマイクロカプセルの集団と融合させることを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 9)

マイクロカプセルの前記第 1 の集団と第 2 の集団を融合させることが、電気合体または親和性支援電気合体の使用を含む、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記試験細胞が前記ポリペプチドに対する生物学的応答を呈する場合にのみ、前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子が前記結合部分により前記試験細胞の前記成分に結合される、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記生物学的応答が細胞溶解であり、前記試験細胞の前記成分が細胞内タンパク質である、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、前記成分に結合する結合部分を用いて前記試験細胞の前記成分を精製することを含む、項目 6

1に記載の方法。(項目63)

前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記核酸分子が前記試験細胞の前記成分に結合されるかを決定することを含む、項目60に記載の方法。

(項目64)

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、項目60に記載の方法。

(項目65)

前記ポリペプチドに対する生物学的応答についての前記試験細胞を試験する前に、核酸分子に結合した前記試験細胞を前記マイクロカプセルから除去することをさらに含む、項目48に記載の方法。

(項目66)

核酸分子に結合した前記試験細胞を前記マイクロカプセルから除去することが、エマルジョンを破壊することを含む、項目65に記載の方法。

(項目67)

前記核酸集団の前記核酸分子がDNA分子である、項目48に記載の方法。

(項目68)

前記ポリペプチドの発現のための前記成分が、転写および翻訳のための成分を含む、項目48に記載の方法。

(項目69)

前記核酸集団の前記核酸分子が前記第1の結合部分によって担体粒子と会合する、項目48に記載の方法。

(項目70)

前記担体粒子がビーズである、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記担体粒子または前記核酸分子が検出可能な標識を含む、項目69に記載の方法。

(項目72)

前記ビーズが磁性である、項目70に記載の方法。

(項目73)

前記マイクロカプセルがエマルジョン中のミセルである、項目48に記載の方法。

(項目74)

前記核酸集団の前記核酸分子がそれぞれ、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、項目48に記載の方法。

(項目75)

前記試験細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答が、細胞死、分化、増殖、または増強された多分化能である、項目48に記載の方法。

(項目76)

前記試験細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答がアポトーシスである、項目48に記載の方法。

(項目77)

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記試験細胞に結合するアネキシンVを検出することを含む、項目76に記載の方法。

(項目78)

前記試験細胞が、癌細胞、免疫細胞、幹細胞、または人工多能性幹(iPS)細胞である、項目48に記載の方法。

(項目79)

前記試験細胞が、レポーター分子の発現のための導入遺伝子を含む、項目48に記載の方法。

(項目80)

発現したポリペプチド、前記発現したポリペプチドをコードする組換え核酸分子、およ

び細胞を含むエマルジョンマイクロカプセルであって、前記ポリペプチドをコードする前記組換え核酸分子が、前記組換え核酸分子と会合した結合部分により前記試験細胞の成分に結合される、エマルジョンマイクロカプセル。

(項目81)

前記結合部分および前記組換え核酸分子がビーズに結合される、項目80に記載のエマルジョンマイクロカプセル。

(項目82)

前記組換え核酸分子が、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、項目80に記載のエマルジョンマイクロカプセル。

(項目83)

単離された細胞であって、前記組換え核酸分子と会合した結合部分により前記細胞の表面に結合した組換え核酸分子を含む、単離された細胞。

(項目84)

複数の個々の細胞複合体を含むライプラリであって、前記ライプラリの各複合体が1個以上のビーズと会合した細胞を含み、前記細胞が組換えポリペプチドを含み、前記1個または複数のビーズが前記組換えポリペプチドをコードする核酸分子に結合し、前記ライプラリの個々の細胞複合体が異なる組換えポリペプチドを含む、ライプラリ。

(項目85)

前記組換えポリペプチド分子または前記1個または複数のビーズが前記細胞の表面に結合される、項目84に記載のライプラリ。

(項目86)

前記組換えポリペプチド分子が、前記細胞の細胞膜、サイトゾル、または核に含まれる、項目84に記載のライプラリ。

(項目87)

1mLの体積当たり少なくとも10,000個のはっきりと異なるポリペプチドライブラリメンバーの濃度を有する、項目84に記載のライプラリ。

(項目88)

前記細胞複合体が標識をさらに含む、項目84に記載のライプラリ。

(項目89)

前記標識が、前記ビーズ、前記核酸、または前記細胞に結合される、項目88に記載のライプラリ。

(項目90)

異なる組換えポリペプチドを含む細胞複合体が互いに単離される、項目84に記載のライプラリ。

(項目91)

異なる組換えポリペプチドを含む細胞複合体が、ゲル、マイクロタイタープレートのウェル、またはエマルジョンのマイクロカプセルに含まれる、項目90に記載のライプラリ。

(項目92)

前記1個または複数のビーズが、前記核酸分子の結合のための第1の結合部分と、前記組換えポリペプチド分子の結合のための第2の結合部分と、を含む、項目84に記載のライプラリ。

(項目93)

前記細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞である、項目84に記載のライプラリ。

(項目94)

前記細胞が生存細胞である、項目84に記載のライプラリ。

(項目95)

異なる組換えポリペプチドを含む少なくとも10,000個のはっきりと異なる複合体を含む、項目84に記載のライプラリ。

(項目96)

各複合体が、前記組換えポリペプチドの少なくとも約1億個のコピーを含む、項目84に記載のライプラリ。

(項目97)

所望の生物学的活性を有する生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の核酸集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバーが異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、

(b) マイクロカプセルの第1の集団を調製するステップであって、前記マイクロカプセルの第1の集団が、

i) 前記核酸集団の核酸分子と、

ii) 前記ポリペプチドの発現のための成分と、

iii) 前記核酸と会合した結合部分と、を含み、

前記マイクロカプセル集団の個々のメンバーが前記核酸集団のはっきりと異なるメンバーを組み込む、調製するステップと、

(c) マイクロカプセルの前記第1の集団をインキュベートして、ポリペプチドの発現を許容するステップと、

(d) 試験細胞を含むマイクロカプセルの第2の集団を得るステップと、

(e) マイクロカプセルの前記第1の集団と第2の集団を融合させて、マイクロカプセルの第3の集団を提供するステップであって、前記第3の集団の個々のメンバーが、発現したポリペプチド、前記発現したポリペプチドをコードする核酸分子、および前記試験細胞を含み、前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子が、前記結合部分により前記試験細胞の成分に結合される、提供するステップと、

(f) 前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記試験細胞を試験するステップと、

(g) 前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離して、前記生物学的に活性なポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

(項目98)

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することを含む、項目97に記載の方法。

(項目99)

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、前記細胞による蛍光染料の取り込みまたは排除を検出することを含む、項目98に記載の方法。

(項目100)

前記試験細胞の光学または蛍光特性の変化を検出することが、標識試薬の前記試験細胞への結合を検出することを含む、項目98に記載の方法。

(項目101)

前記標識試薬が抗体である、項目100に記載の方法。

(項目102)

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、親和性精製または蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む、項目97に記載の方法。

(項目103)

マイクロカプセルの前記第1の集団またはマイクロカプセルの前記第2の集団が、それらの外面上に親和性タグを含む、項目97に記載の方法。

(項目104)

マイクロカプセルの前記第1の集団と第2の集団を融合させることが、電気合体の使用を含む、項目97に記載の方法。

(項目105)

マイクロカプセルの前記第1の集団と第2の集団を融合させることが、親和性支援電気

合体の使用を含む、項目 104 に記載の方法。

(項目 106)

前記試験細胞が前記ポリペプチドに対する生物学的応答を呈する場合にのみ、前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子が前記結合部分により前記試験細胞の前記成分に結合される、項目 97 に記載の方法。

(項目 107)

前記生物学的応答が細胞溶解であり、前記試験細胞の前記成分が細胞内タンパク質である、項目 106 に記載の方法。

(項目 108)

前記応答を呈する前記試験細胞の前記成分に結合した核酸分子を単離することが、前記成分に結合する結合部分を用いて前記試験細胞の前記成分を精製することを含む、項目 107 に記載の方法。

(項目 109)

前記ポリペプチドに対する生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記核酸分子が前記試験細胞の前記成分に結合されるかを決定することを含む、項目 106 に記載の方法。

(項目 110)

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、項目 106 に記載の方法。

(項目 111)

前記ポリペプチドに対する生物学的応答についての前記試験細胞を試験する前に、核酸分子に結合した前記試験細胞を前記マイクロカプセルから除去することをさらに含む、項目 97 に記載の方法。

(項目 112)

核酸分子に結合した前記試験細胞を前記マイクロカプセルから除去することが、エマルジョンを破壊することを含む、項目 111 に記載の方法。

(項目 113)

前記核酸集団の前記核酸分子が DNA 分子である、項目 97 に記載の方法。

(項目 114)

前記ポリペプチドの発現のための前記成分が、転写および翻訳のための成分を含む、項目 97 に記載の方法。

(項目 115)

前記核酸集団の前記核酸分子がビーズ上に固定化される、項目 97 に記載の方法。

(項目 116)

前記ビーズまたは前記核酸分子が検出可能な標識を含む、項目 115 に記載の方法。

(項目 117)

前記ビーズが磁性である、項目 115 に記載の方法。

(項目 118)

前記マイクロカプセルがエマルジョン中のミセルである、項目 97 に記載の方法。

(項目 119)

前記核酸集団の前記核酸分子がそれぞれ、膜輸送ドメインをコードする配列のセグメントを含む、項目 97 に記載の方法。

(項目 120)

前記試験細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答が、細胞死、分化、増殖、または増強された多分化能である、項目 97 に記載の方法。

(項目 121)

前記試験細胞における前記ポリペプチドに対する前記生物学的応答がアポトーシスである、項目 97 に記載の方法。

(項目 122)

生物学的応答について前記試験細胞を試験することが、前記試験細胞に結合するアネキシン V を検出することを含む、項目 121 に記載の方法。

(項目123)

前記試験細胞が、癌細胞、免疫細胞、幹細胞、または人工多能性幹(iPS)細胞である、項目97に記載の方法。

(項目124)

前記試験細胞が、レポーター分子の発現のための導入遺伝子を含む、項目97に記載の方法。

(項目125)

所望の活性を有する活性ポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法であって、
(a) ポリペプチドをコードする配列を含む核酸分子の集団を得るステップであって、前記集団の個々のメンバーが異なるポリペプチドをコードする、得るステップと、

(b) ポリペプチドの発現を許容する条件下で前記核酸分子をインキュベートするステップであって、ポリペプチド分子の集団が前記核酸集団の前記核酸分子から発現され、各ポリペプチド分子がそれをコードする前記核酸分子の少なくとも1個のコピーと会合する、インキュベートするステップと、

(c) 前記集団の個々のメンバーポリペプチドに対する応答について標的分子を試験するステップと、

(d) 前記標的分子に対する応答を提供するポリペプチドと会合した核酸分子を単離して、前記活性ポリペプチドをコードする前記核酸分子を提供するステップと、を含む、方法。

(項目126)

前記標的分子が、酵素、受容体、または抗原である、項目125に記載の方法。

(項目127)

前記応答が、前記標的分子のメンバーポリペプチドへの結合、前記標的分子のリガンドへの結合の阻害、前記標的分子の酵素活性の阻害、または前記標的分子の酵素活性の活性化である、項目125に記載の方法。

(項目128)

個々のメンバーポリペプチドに対する応答について標的分子を試験することが、ゲル、マイクロタイタープレートのウェル、またはエマルジョンのマイクロカプセル中の前記個々のメンバーポリペプチドを試験することを含む、項目125に記載の方法。

(項目129)

100万～1,000万個の核酸分子および10億～200億個のポリペプチド分子に結合した官能化表面を含む、担体ビーズ。

(項目130)

前記核酸分子がビオチン・アビジン相互作用によって前記ビーズに結合される、項目129に記載のビーズ。

(項目131)

前記ポリペプチド分子が、前記ポリペプチド分子のHisタグ配列による前記ビーズ上の荷電N端基の結合によって前記ビーズに結合される、項目129に記載のビーズ。

(項目132)

前記ビーズが、架橋アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはシリカビーズである、項目129に記載のビーズ。

(項目133)

少なくとも50億、100億、もしくは150億個のポリペプチド分子、または少なくとも500万、1,000万、もしくは1,500万個の核酸分子を含む、項目129に記載のビーズ。

(項目134)

前記核酸分子または前記ポリペプチド分子がすべて本質的に同一の配列を含む、項目129に記載のビーズ。

(項目135)

前記ポリペプチド分子が前記核酸分子によってコードされる、項目134に記載のビーズ。

ズ。

(項目 136)

少なくとも約 50,000 個の項目 135 に記載のビーズを含むライプラリであって、各ビーズが前記ライプラリの他のビーズと比較してユニークな配列を含む核酸分子に結合される、ライプラリ。

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な例が本発明の好ましい実施形態を示すが、これらは、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるため、例としてのみ提供されていることを理解されたい。