

【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。

【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、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1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1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1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1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1に記載の方法。

【請求項 15】

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 16】

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 17】

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 18】

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 19】

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 20】

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 21】

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 22】

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 23】

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 24】

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 25】

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、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

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 27】

前記試験が、1 mL 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、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

複数の個々の細胞複合体を含むライブラリであって、前記ライブラリの各複合体が 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、前記ライブ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、ライブラリ。

【請求項 29】

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 2 5)

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 2 6)

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 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

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、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 8)

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 2 9)

前記試験が、1 m L 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、項目 1 に記載の方
法。

(項目 3 0)

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 5 0 , 0 0 0 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 3 1)

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 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

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 ~ 1 0 0 個
の細胞または約 1 , 0 0 0 ~ 5 , 0 0 0 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 3 0 に記載の方法。

(項目 3 3)

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 3 0 に記載の方法。

(項目 3 4)

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 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

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 3 4 に記
載の方法。

(項目 3 6)

前記試験が、1 m L 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 3 0 に記載の方法。

(項目 3 7)

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 3 0
に記載の方法。

(項目 3 8)

複数の担体粒子を含むポリペプチドライブラリであって、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、ライブラリ。

(項目 3 9)

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 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 0)

各粒子が、前記はっきりと異なる核酸分子の約 1 0 0 万 ~ 2 0 0 0 万個のコピーを含む、項目 3 9 に記載のライブラリ。

(項目 4 1)

前記複数のポリペプチド分子が、約 1 億 ~ 1 0 0 億個の分子を含む、項目 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 2)

少なくとも 5 0 , 0 0 0 個のはっきりと異なる核酸分子を含む、項目 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 3)

前記担体粒子が検出可能な標識を含む、項目 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 4)

前記担体粒子がビーズである、項目 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 5)

各粒子がマイクロカプセルに含まれる、項目 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 6)

前記マイクロカプセルが逆ミセルであり、前記ライブラリがエマルジョンに含まれる、項目 4 5 に記載のライブラリ。

(項目 4 7)

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 3 8 に記載のライブラリ。

(項目 4 8)

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、

i i) 前記ポリペプチドの発現のための成分と、

i i i) 前記核酸分子および担体と会合した第 1 の結合部分と、

i v) 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 6 3)

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 6 0 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 5)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 6 6)

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 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記核酸集団の前記核酸分子が DNA 分子である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 6 8)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 6 9)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記担体粒子がビーズである、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

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 6 9 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記ビーズが磁性である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 3)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 7 4)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 7 5)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 7 6)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 7 7)

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 7 6 に記載の方法。

(項目 7 8)

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 (i P S) 細胞である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 7 9)

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 4 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

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 8 1)

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 8 0 に記載のエマルジョンマイクロカプセル。

(項目 8 2)

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 8 0 に記載のエマルジョンマイクロカプセル。

(項目 8 3)

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 8 4)

複数の個々の細胞複合体を含むライブラリであって、前記ライブラリの各複合体が 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、前記ライブ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、ライブラリ。

(項目 8 5)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 8 6)

前記組換えポリペプチド分子が、前記細胞の細胞膜、サイトソル、または核に含まれる、項目 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 8 7)

1 mL 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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 8 8)

前記細胞複合体が標識をさらに含む、項目 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 8 9)

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 8 8 に記載のライブラリ。

(項目 9 0)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 1)

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 9 0 に記載のライブラリ。

(項目 9 2)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 3)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 4)

前記細胞が生存細胞である、項目 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 5)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 6)

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 8 4 に記載のライブラリ。

(項目 9 7)

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、

i i) 前記ポリペプチドの発現のための成分と、

i i i) 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 9 8)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 9 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 9 8 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

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 9 8 に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記標識試薬が抗体である、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 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、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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

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 1 0 4 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

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 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

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 1 0 7 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

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 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 1 0)

前記核酸分子が検出可能なタグに結合される、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

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 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記核酸集団の前記核酸分子が DNA 分子である、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 1 6)

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 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 7)

前記ビーズが磁性である、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 8)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 1 9)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 2 0)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 2 1)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 2 2)

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 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 3)

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 (i P S) 細胞である、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 1 2 4)

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 9 7 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

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 1 2 6)

前記標的分子が、酵素、受容体、または抗原である、項目 1 2 5 に記載の方法。

(項目 1 2 7)

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 1 2 5 に記載の方法。

(項目 1 2 8)

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 1 2 5 に記載の方法。

(項目 1 2 9)

1 0 0 万 ~ 1 , 0 0 0 万個の核酸分子および 1 0 億 ~ 2 0 0 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 1 3 0)

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 1 2 9 に記載のビーズ。

(項目 1 3 1)

前記ポリペプチド分子が、前記ポリペプチド分子の H i s タグ配列による前記ビーズ上での荷電 N i 基の結合によって前記ビーズに結合される、項目 1 2 9 に記載のビーズ。

(項目 1 3 2)

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 1 2 9 に記載のビーズ。

(項目 1 3 3)

少なくとも 5 0 億、1 0 0 億、もしくは 1 5 0 億個のポリペプチド分子、または少なくとも 5 0 0 万、1 , 0 0 0 万、もしくは 1 , 5 0 0 万個の核酸分子を含む、項目 1 2 9 に記載のビーズ。

(項目 1 3 4)

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 1 2 9 に記載のビーズ。

(項目 1 3 5)

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 1 3 4 に記載のビーズ。

ズ。

(項目 1 3 6)

少なくとも約 5 0 , 0 0 0 個の項目 1 3 5 に記載のビーズを含むライブラリであって、各ビーズが前記ライブ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、ライブラリ。

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。