

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4503290号
(P4503290)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 18 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2003-545810 (P2003-545810)	(73) 特許権者	597166578
(86) (22) 出願日	平成14年11月18日(2002.11.18)		メディカル リサーチ カウンシル
(65) 公表番号	特表2005-509436 (P2005-509436A)		イギリス国 ダブリュー1ビー 1エイエル
(43) 公表日	平成17年4月14日(2005.4.14)		ル ロンドン, パーク クレセント 20
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005216	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02003/044187		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成15年5月30日(2003.5.30)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成17年10月24日(2005.10.24)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	0127564.3	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成13年11月16日(2001.11.16)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100114591
前置審査			弁理士 河村 英文
		(74) 代理人	100118407
			弁理士 吉田 尚美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳濁液組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機能的なインビトロ真核生物発現系を含有する複数のマイクロカプセルを含む親水性相、疎水性相、及び界面活性剤を含み、前記界面活性剤が酸化剤およびタンパク質変性剤を含まないシリコンベースの界面活性剤である油中水滴型乳濁液。

【請求項 2】

前記シリコンベースの界面活性剤が、ポリシロキサン - ポリセチル - ポリエチレングリコールコポリマーである、請求項 1 に記載の乳濁液。

【請求項 3】

前記界面活性剤が v / v 濃度で油相の 4 % である、請求項 1 または 2 に記載の乳濁液。

10

【請求項 4】

前記乳濁液が、インビトロ真核生物発現系を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の乳濁液。

【請求項 5】

前記真核生物発現系が、哺乳動物細胞溶解物の全部または一部を含む、請求項 4 に記載の乳濁液。

【請求項 6】

前記溶解物が網状赤血球溶解物である、請求項 5 に記載の乳濁液。

【請求項 7】

前記溶解物がウサギ網状赤血球溶解物である、請求項 5 に記載の乳濁液。

20

【請求項 8】

前記乳濁液中の遺伝子産物の発現および/または活性レベルが、乳濁液形成前の発現系によって達成可能な遺伝子産物のレベルの少なくとも1%である、請求項1~7のいずれかに記載の乳濁液。

【請求項 9】

前記乳濁液中の遺伝子産物の発現および/または活性レベルが、乳濁液形成前の発現系によって達成可能な遺伝子産物のレベルの少なくとも10%である、請求項8に記載の乳濁液。

【請求項 10】

前記乳濁液が、30で少なくとも1時間のインキュベーションのあいだ安定である、請求項1~9のいずれかに記載の乳濁液。

10

【請求項 11】

前記疎水性相が、鉱物油を含む、請求項1~10のいずれかに記載の乳濁液。

【請求項 12】

酸化剤およびタンパク質変性剤を含まないシリコーンベースの界面活性剤の存在下で、真核生物発現系を含む親水性組成物と疎水性組成物とを攪拌する工程を含む、請求項1~11のいずれかに記載の油中型乳濁液の形成方法。

【請求項 13】

前記界面活性剤が、前記疎水性組成物中に存在する、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

請求項1~11のいずれかに記載の乳濁液を形成する工程と、発現系によって遺伝子産物を発現させる工程と、任意選択的に該遺伝子産物を精製する工程とを含む、遺伝子産物を得る方法。

20

【請求項 15】

(a) 請求項1~11のいずれかに記載の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに遺伝因子を区画化する工程と、

(b) 前記遺伝因子を発現させて前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、

(c) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する前記遺伝因子を分類する工程とを含む、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする一つまたは複数の遺伝因子を単離する方法。

30

【請求項 16】

(a) 発現させて遺伝子産物を形成させるのに必要な遺伝因子および成分を含む水溶液を形成する工程と、

(b) 前記遺伝因子を含む個別のマイクロカプセルを形成するために前記溶液をマイクロカプセル化する工程と、

(c) 前記マイクロカプセルを前記遺伝因子の発現に適切な条件に曝露して、その遺伝子産物の形成を進行させる工程と

を含み、前記マイクロカプセルが請求項1~11のいずれか1項に記載の乳濁液から形成される、遺伝因子を区画化し、区画内で遺伝因子を発現させてその遺伝子産物を形成させる方法。

40

【請求項 17】

(a) 遺伝子産物をコードする遺伝因子を調製する工程と、

(b) 前記遺伝因子を請求項1~11のいずれか1項に記載の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに区画化する工程と、

(c) 前記遺伝因子を発現させて、前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、

(d) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類する工程と、

(e) 前記所望の活性を有する遺伝子産物を発現させる工程とを含む、遺伝子産物の調製方法。

50

【請求項 18】

- (a) 遺伝子産物をコードする遺伝因子のレパートリーを調製する工程と、
 (b) 前記遺伝因子を請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに区画化する工程と、
 (c) 前記遺伝因子を発現させて、前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、
 (d) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類する工程と、
 (e) 前記所望の活性を有する遺伝子産物を化合物または複数の化合物に接触させて該化合物による遺伝子産物の活性の調整をモニターする工程と
 を含む、遺伝子産物の活性を調整することができる化合物をスクリーニングする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、転写 / 翻訳反応物の区画化に適切な乳濁液およびこのような乳濁液の使用方法に関する。特に、乳濁液は、インビトロ真核生物転写 / 翻訳反応物の区画化に有用である。

【背景技術】

【0002】

油中水滴型乳濁液に基づいた区画化方法は、レパートリー選択法での使用のために最近開発された (Tawfik & Griffiths, 1998, Ghadessyら, 2001)。区画化により、各遺伝子およびそのコードされる産物 (細胞を介して送達されるか (Ghadessyら, 2001)、インサイチューで発現する (Tawfik & Griffiths, 1998)) が個別の物理的に異なる水性区画に分離され、それにより選択プロセス時に遺伝子型および表現型が確実に関連付けられる。

20

【0003】

WO99/02671 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) は、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする一つまたは複数の遺伝因子の単離方法を記載している。遺伝因子を、最初にマイクロカプセルに区画化し (乳化によって形成されることが好ましい)、その後、転写および / または翻訳されてマイクロカプセル内にその各遺伝子産物 (RNA またはタンパク質) が産生される。あるいは、乳濁液のマイクロカプセル内に遺伝因子を封入し、細胞機構を使用して遺伝子産物を転写および / または翻訳 (発現) させることができる。その後、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類することができる。例えば、いくつかの場合、分類は、マイクロカプセルの変化を誘導する所望の活性に起因し得る。他の場合、分類は、遺伝因子の変化を誘導する所望の活性に起因し得る。

30

【0004】

WO99/02671号に開示の方法は、細菌内で十分に作用する。細胞内区画化 (cellular subcompartmentalisation) アプローチを、原則的に、真核細胞 (例えば、酵母、昆虫、哺乳動物の細胞) を含めるように拡大することができるが、いくつかの適用では、インビトロでの真核生物の転写 / 翻訳系を使用してマイクロカプセルに直接的にインサイチューで発現させることが望ましい。

40

【0005】

乳濁液中で細菌 S30 抽出物を使用した原核生物酵素 (Haemetylase) の首尾の良い発現が以前に報告されている (Tawfik D. & Griffiths A.D., 1998)。しかし、このような方法は、目的のいくつかのタンパク質で適切ではない (例えば、細菌抽出物を使用して機能的形態でしばしば発現することができない巨大なドメインタンパク質およびリボ核タンパク質)。

【0006】

したがって、インビトロでの真核生物転写 / 翻訳系を使用してマイクロカプセル中で直接的にインサイチューで発現させることができる方法は当分野に貢献すると予想すること

50

ができる。

【発明の開示】

【0007】

したがって、本発明の第1の態様では、機能的なインピトロ真核生物発現系を含有する複数のマイクロカプセルを含む疎水性相および親水性相の界面活性剤を含み、前記界面活性剤が化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤である乳濁液を提供する。

【0008】

このような方法の開発では、本発明者らは、乳濁液中の場合に真核生物系、特にウサギ網状赤血球溶解物系の有効な転写/翻訳能力の維持における問題に繰り返し遭遇した。以下に記載のように、原核生物発現系と共に使用した乳濁液組成物の多数の改変によりこの

10

ような能力が首尾よく付与された。しかし、驚いたことに、化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤を乳濁液組成物中で使用した場合、真核生物の転写/翻訳系の転写効率が著しく改良されることが見出された。

【0009】

乳濁液によれば、細胞ベース系の多数の欠点を回避しながら、真核生物発現系の区画化による遺伝子型と表現型とを結合させることができる。したがって、例えば、細胞から抽出または分泌する必要なく遺伝子産物が得られる。

【0010】

したがって、本発明の第2の態様では、

(a) 本発明の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに遺伝因子を区画化する工程と

20

(b) 前記遺伝因子を発現させて前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、

(c) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類する工程とを含む、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする一つまたは複数の遺伝因子を単離する方法を提供する。

【0011】

第3の態様では、本発明は、

(a) 遺伝子産物をコードする遺伝因子を調製する工程と、

(b) 前記遺伝因子を本発明の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに区画化する工程と、

30

(c) 前記遺伝因子を発現させて、前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、

(d) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類する工程と、

(e) 前記所望の活性を有する遺伝子産物を発現させる工程とを含む、遺伝子産物の調製方法を提供する。

【0012】

本発明のこの態様によれば、工程(a)は、好ましくは、各遺伝因子が潜在的に異なる遺伝子産物をコードする遺伝因子のレパートリーを調製する工程を含む。レパートリーを、ファージディスプレイなどの方法による選択を意図するライブラリーの作製のために使用される技術などの従来の技術によって作製することができる。所望の活性を有する遺伝子産物を、本発明にしたがってレパートリーから選択することができる。

40

【0013】

本発明の第4の態様は、本発明の第2の態様の方法を使用して選択されたか、本発明の第3の態様によって調製された産物を提供する。この文脈で使用される、「産物」は、これらの態様によって選択または調製された遺伝子産物または遺伝因子(またはその中に含まれる遺伝情報)をいうことができる。

【0014】

第5の態様では、本発明は、

(a) 遺伝子産物をコードする遺伝因子のレパートリーを調製する工程と、

50

(b) 前記遺伝因子を本発明の乳濁液から形成されたマイクロカプセルに区画化する工程と、

(c) 前記遺伝因子を発現させて、前記マイクロカプセル内に各遺伝子産物を産生させる工程と、

(d) 所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子を分類する工程と、

(e) 前記所望の活性を有する遺伝子産物を化合物に接触させて前記化合物による遺伝子産物の活性の調整をモニターする工程とを含む、遺伝子産物の活性を調整することができる化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0015】

本発明の文脈では、界面活性剤を、ペルオキシダーゼおよびアルデヒドなどの酸化剤ならびにタンパク質変性剤を実質的に含まない場合、「化学的に不活性」と見なす。従来のソルビタンモノオレエート(Span(商標)80;ICI)およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween(商標)80;ICI)乳化剤のいずれかと比較して、40%未満、好ましくは50%未満、より好ましくは60%未満、70%未満、80%未満、90%未満、95%未満、または98%未満の酸化剤およびタンパク質変性剤を有する界面活性剤を、酸化剤および変性剤を「実質的に含まない」と見なす。

【0016】

用語「単離」、「分類」、および「選択」ならびにその変形形態を本明細書中で使用する。本発明の「単離」は、単離プロセス前に会合していた少なくとも一つの物質を遊離させるように、不均一な集団(例えば、混合物)から構成要素(entity)を分離するプロセスをいう。好ましい実施形態では、「単離」は、本質的に構成要素を均一にするための精製をいう。構成要素の分類とは、望ましくない構成要素から所望の構成要素を優先的に単離するプロセスをいう。これが所望の構成要素の単離をいう限り、用語「単離」および「分類」は、等価である。本発明の方法により、所望の遺伝因子を含む遺伝因子のプール(ライブラリーまたはレパートリー)から所望の遺伝因子が分類される。その特定の性質によって構成要素を単離するプロセス(分類プロセスを含む)をいうために「選択」を使用する。

【0017】

本発明の方法の好ましい実施形態では、本質的に以下の4つの技術のうちの一つ(詳細については、WO99/02671を参照のこと)において、遺伝因子の分類を行うことができる。

【0018】

(I) 第1の実施形態では、全体としてマイクロカプセルを検出することができる遺伝子産物またはその誘導体の活性にしたがってマイクロカプセルを分類する。したがって、本発明は、所望の活性を有する遺伝子産物が遺伝子産物およびこれをコードする遺伝因子を含むマイクロカプセルを分類することができるマイクロカプセルの変化またはマイクロカプセル内の一つまたは複数の分子の改変を誘導する、本発明の第2の態様の方法を提供する。したがって、この実施形態では、マイクロカプセルを、その中に含まれる遺伝因子から発現される遺伝子産物の活性によって互いに物理的に分類し、所望の活性の遺伝子産物を含むマイクロカプセルを選択的に富化することが可能になる。

【0019】

(II) 第2の実施形態では、一つまたは複数の共通の区画へのマイクロカプセルのプーリング後に遺伝因子を分類する。この実施形態では、その後の工程で選択可能な方法で、所望の活性を有する遺伝子産物により遺伝子産物をコードする(そして、同一のマイクロカプセル中に存在する)遺伝因子が改変される。反応を停止させ、各マイクロカプセルの全ての成分がプールされるようにマイクロカプセルを破壊する。改変された遺伝因子の選択により、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝因子を富化することができる。したがって、本発明は、工程(b)で、所望の活性を有する遺伝子産物がこれをコードする遺伝因子を改変して遺伝因子を単離することができる、本発明の第2の態様の方法を提供する。勿論、改変は、遺伝因子に対する遺伝子産物の直接的作用に起因するという

10

20

30

40

50

点で直接的であるか、一連の反応（そのうちの一つまたは複数が所望の活性を有する遺伝子産物を含む）により遺伝因子が改変されるという点で間接的であり得ると理解すべきである。

【 0 0 2 0 】

（ I I I ）第 3 の態様では、一つまたは複数の共通の区画へのマイクロカプセルのプーリング後に遺伝因子を分類する。この実施形態では、所望の活性を有する遺伝子により、遺伝子産物およびこれをコードする遺伝因子を含むマイクロカプセルの変化が誘導される。この変化は、検出された場合、マイクロカプセル内の遺伝子の改変が誘発される。反応を停止させ、各マイクロカプセルの全ての内容物がプールされるようにマイクロカプセルを破壊する。改変された遺伝因子の選択により、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝因子を富化することができる。したがって、本発明は、工程（ b ）で所望の活性を有する遺伝子産物により検出されたマイクロカプセルの変化が誘導され、マイクロカプセル内の遺伝因子の改変が誘発されて単離することができる、本発明の第 2 の態様の方法を提供する。マイクロカプセルで検出された変化は、一連の反応のうちの所望の活性を有する遺伝子産物を含む一つまたは複数により変化が検出される、遺伝子産物の直接的作用または間接的作用に起因し得ると理解すべきである。

10

【 0 0 2 1 】

（ I V ）第 4 の態様では、遺伝因子を、例えば、少なくとも二つの個別の反応が起こる条件に遺伝因子を曝露するための少なくとも二つの工程を含む多工程手順によって分類することができる。当業者に明らかなように、本発明の第 1 のマイクロカプセル化工程により、遺伝因子が発現（転写、転写および/または翻訳、または複製など）される条件が得られなければならない。これらの条件下では、例えば、遺伝子産物がこれらの条件下で活性を示すことができないか、発現系が阻害活性を含むので、特定の遺伝子産物の活性を選択することができない。したがって、本発明は、工程（ b ）が遺伝因子を発現してマイクロカプセル内にその各遺伝子産物を産生する工程と、遺伝子産物をこれをコードする遺伝因子と連結させて形成された複合体を単離する工程とを含む、本発明の第 2 の態様の方法を提供する。これにより、遺伝因子およびその会合した遺伝子産物をマイクロカプセルから単離し、その後遺伝子産物の活性によって分類することができる。好ましい実施形態では、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝因子の単離前に、複合体をさらなる区画化工程に供する。有利にマイクロカプセル化されるこのさらなる区画化工程により、異なる条件下で（遺伝因子およびその各遺伝子産物が物理的に連結する環境下）、さらなる反応が起こる。上記の実施形態（ I ）、（ I I ）、または（ I I I ）に従って遺伝因子の最終的な分類を行うことができる。

20

30

【 0 0 2 2 】

他の手段（ファージディスプレイ、ポリソームディスプレイ、RNA - ペプチド融合、またはlacリプレッサーペプチド融合など）によって遺伝子産物に連結した遺伝因子を使用して「二次カプセル化」も行うことができる。

【 0 0 2 3 】

選択された遺伝因子を、その後のおそらくよりストリンジントな反復工程（本発明の方法の全部または選択された工程のみを再度適用する）における分類ラウンドにも供することができる。適切な条件の調整により、より適切な活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝因子を、各選択ラウンド後に単離することができる。

40

【 0 0 2 4 】

さらに、第 1 ラウンドの分類後に単離された遺伝因子を、変異誘発に供し、その後上記本発明の方法の工程の反復によって分類を反復することができる。各変異誘発ラウンド後、遺伝子産物の活性を増強させるような方法で、いくつかの遺伝因子を改変した。

【 0 0 2 5 】

さらに、選択した遺伝因子を、遺伝因子およびその産物をさらに特徴付けられるように発現ベクターにクローン化することができる。複数の適切なベクターが、当業者に公知である。複製起点、任意選択的に遺伝因子の発現のためのプロモーター、および任意選択的

50

にプロモーターのレギュレーターを有するベクター（例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、またはファージベクター）を得ることができる。ベクターは、選択マーカー遺伝子（例えば、哺乳動物ベクターのためのネオマイシン耐性遺伝子）を含み得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

[乳濁液]

乳濁液は、一方の相が他方の相に微視的またはコロイドサイズの液滴として分散した二つの非混和性液相の不均一系である（Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1984）。本発明の乳濁液は、マイクロカプセルを形成することができなければならない。

10

【0027】

非混和性液体の任意の適切な組み合わせから乳濁液を作製することができる。本発明の乳濁液は、細かく分割された液滴（分散した内相または不連続な相）の形態で存在する相としての親水性相（生体成分を含む）およびこれらの液滴が懸濁した基質（非分散性の連続相または外相）としての疎水性の非混和性液体（「油」）を有する。このような乳濁液を、「油中水滴型」（W/O）と呼ぶ。これは、生体成分を含む水相全体が個別の液滴（内相）中に区画化されるという利点を有する。疎水性の油である外相は、一般に、生体成分を含まないので不活性である。

【0028】

乳濁液の作製には、一般に、相の共存を強いる力学的エネルギーの印加が必要である。攪拌機（電磁攪拌機、プロペラ攪拌機、およびタービン攪拌機、パドルデバイス、および泡だて器など）、ホモジナイザー（ローター・ステーターホモジナイザー、高圧弁ホモジナイザー、およびジェットホモジナイザーを含む）、コロイドミル、超音波、および「膜乳化」デバイスを含む種々の機械装置を使用する種々のこれを行うための方法が存在する（Becher, 1957; Dickinson, 1994）。

20

【0029】

望ましくは、乳濁液は、30 で少なくとも1時間のインキュベーションにおいて安定である。いくつかの場合、特にPCRまたは他の増幅手順でサーマルサイクリングを使用する場合、より高い温度で安定であることが好ましい。

【0030】

[界面活性剤]

本発明の乳濁液は、一つまたは複数の界面活性剤（界面活性剤）の添加によって安定化される。これらの界面活性剤を乳化剤といい、相の分離を回避する（少なくとも遅延させる）ために水/油境界面で作用する。油中水滴型乳濁液の作製に多数の油および多数の乳化剤を使用することができる（最新の資料に、16,000種を超える界面活性剤が列挙されており、その多くが乳化剤として使用されている）（Ash and Ash, 1993）。

30

【0031】

しかし、実施例に記載のように、非イオン性界面活性剤（Schick, 1966）などの乳濁液への適用で従来から使用されている界面活性剤（例えば、ソルピタンモノオレート（Span（商標）80; ICI）およびポリオキシエチレンソルピタンモノオレート（Tween（商標）80; ICI））は、ウサギ網状赤血球溶解物を使用した有効なインビトロでの真核生物発現に適切ではない。

40

【0032】

しかし、本明細書に記載のように、化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤を使用した場合、このような発現を維持することができる。

【0033】

好ましくは、乳濁液の化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤は、シリコンコポリマーである。

【0034】

50

より好ましくは、界面活性剤は、ポリシロキサン - ポリセチル - ポリエチレングリコールコポリマー（セチルジメチコンコポリマー）（例えば、Abil（登録商標）EM90（Goldschmidt））を含む。

【0035】

化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤を、乳濁液組成物中の唯一の界面活性剤として提供するか、いくつかの界面活性剤の一つとして提供することができる。例えば、異なる界面活性剤の混合物を使用することができる。

【0036】

好ましい実施形態では、界面活性剤はv/v濃度で乳濁液の油相の0.5~20%、好ましくは1~10%、より好ましくは3~5%である。

【0037】

非常に好ましい実施形態では、界面活性剤がv/v濃度で油相の4%である。

【0038】

本発明の非常に好ましい実施形態では、約3~5%（v/v）のポリシロキサン - ポリセチル - ポリエチレングリコールコポリマーを含む鉱物油を含む界面活性剤の存在下で、好ましくは、油相：水相の比が2.5：1で油相に水相を滴下することによって乳濁液を作製する。

【0039】

界面活性剤は、最初、疎水性組成物と共に存在し得る。したがって、界面活性剤および疎水性組成物を含む組成物は、本発明のさらなる態様を示す。

【0040】

あるいは、界面活性剤を、その後の段階（例えば、疎水性相と親水性相との混合中または混合後）で添加することができる。

【0041】

この実施形態では、疎水性組成物と共にキット中に界面活性剤を提供することができる。キットはまた、任意選択的に、ウサギ網状赤血球溶解物などの真核生物発現系および/または疎水性相と親水性相とを混合するためのデバイスを含み得る。本発明の乳濁液を得るための使用説明書をさらに含み得る。

【0042】

あるいは、界面活性剤は、最初は、親水性組成物と共に存在し得る。

【0043】

[マイクロカプセル]

用語「マイクロカプセル」は、「区画（compartment）」と同義語であり、この用語を交換可能に使用する。本質的にマイクロカプセルは、境界の画定により遺伝因子によってコードされる遺伝子産物の機能によって遺伝因子が分類される本明細書中に記載の分子機構成成分の交換が制限される人工的な区画である。

【0044】

乳濁液によって形成されたマイクロカプセルは、本発明を実施するための適切な物理的性質を必要とする。特に、各マイクロカプセルの成分を、周囲のマイクロカプセルの成分から単離しなければならない。

【0045】

好ましくは、本発明の方法で使用されるマイクロカプセルを非常に多数生成することができ、それにより遺伝子産物のレパートリーをコードする遺伝子のライブラリーを区画化することができる。マイクロカプセルの機能は、核酸および核糖によってコードされる対応するポリペプチドを同時に局在化することができることである。好ましくは、プレートおよび産物のストランドが他のマイクロカプセルへ分散することを実質的に制限するマイクロカプセルの能力によってこれを行う。

【0046】

第2に、本発明の方法は、乳濁液中に形成されたマイクロカプセルあたり限定数の遺伝因子のみが存在することが必要である。これにより、各遺伝因子の遺伝子産物が他の遺伝

10

20

30

40

50

因子から確実に単離される。したがって、遺伝因子と遺伝子産物との間のカップリングは高度に特異的である。各遺伝因子の遺伝子産物が、全ての他の遺伝因子の産物から単離されるので、マイクロカプセルあたり平均一つまたはそれ以下の遺伝因子またはマイクロカプセルあたり二つまたはそれ以上の単一の遺伝因子のコピー（核酸とコードされる遺伝子産物の活性との間の関連ができるだけ強力である）を使用した濃縮係数が最大である。しかし、たとえ平均してマイクロカプセルあたり一つまたはそれ以下の遺伝因子の理論的に最適な条件を使用しないとしても、マイクロカプセルあたり5、10、50、100、または1000またはそれ以上の遺伝因子の比が巨大なライブラリーの分類に有利であることを証明することができる。その後の分類ラウンド（遺伝因子分布が異なる新たなカプセル化を含む）により、遺伝因子がより厳格に分類される。好ましくは、マイクロカプセルあたり一つまたはそれ以下の遺伝因子が存在する。

10

【0047】

第3に、マイクロカプセルの形成および組成物は、真核生物のインビトロ発現系を使用する遺伝因子の発現機構の機能および遺伝子産物の活性を損なうべきではない。

【0048】

したがって、乳濁液によって形成されたマイクロカプセルは、これら3つの要件を満たさなければならない。当業者に明らかなように、適切な乳濁液は、本発明の各適用における要件の的確な性質に依存して変化し得る。

【0049】

好ましいマイクロカプセルのサイズは、本発明に従って実施されるべき任意の各選択プロセスの的確な要件に依存して変化する。全ての場合では、主な検討材料は、有効な転写/翻訳を達成するために必要な各区画中の成分の濃度である。これと、遺伝子ライブラリーのサイズ、富化、または分類手順に関連し得る他の要件とのバランスをとることができる。

20

【0050】

小さなマイクロカプセルが得られた場合、少量の乳濁液中に非常に多数の個別のマイクロカプセルを得ることができる。さらに、小さなマイクロカプセルを得ることにより所与のマイクロカプセル内に唯一の遺伝子産物型が産生される可能性の増加によって選択性が増大する。したがって、核酸とコードされる遺伝子産物の活性との結合をできるだけ強固に保持するために、区画あたり平均一つの転写および/または翻訳される遺伝因子しか存在しないことが好ましい。しかし、理論的に最適であるマイクロカプセルあたり平均1個またはそれ以下の遺伝因子という条件を使用しなくても、マイクロカプセルあたり5、10、50、100、または1000倍またはそれ以上の遺伝因子の比も巨大ライブラリーの分類に有利であることを証明することができる。異なる遺伝因子分布の新たなカプセル化を含むその後の分類ラウンドにより、遺伝因子のより厳格な分類が可能である。好ましくは、マイクロカプセルあたりわずか平均一つの遺伝因子が存在する。

30

【0051】

望ましくは、マイクロカプセルの平均体積は、 $5.2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ 未満（直径10 μm 未満の球状のマイクロカプセルに相当）、より望ましくは $6.5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ 未満（直径5 μm 未満の球状のマイクロカプセルに相当）、さらにより望ましくは約 $4.2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ （直径約2 μm 未満の球状のマイクロカプセルに相当）である。

40

【0052】

マイクロカプセル中のDNAまたはRNA有効濃度を、当業者に周知の種々の方法によって人為的に増加させることができる。これらには、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）などの体積排除化合物の添加ならびに大腸菌（Roberts, 1969; Blattner and Dahlberg, 1972; Robertsら, 1975; Rosenbergrら, 1975）、真核生物、例えば（Weilら, 1979; Manleyら, 1983）、およびバクテリオファージ（T7、T3、およびSP6など（Meltonら, 1984））などの細菌由来のものを含むRNAポリメラーゼを使用した転写；ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Saikiら, 1988）；Qレプリカーゼ増

50

幅 (Mieleś、1983; Cahillś、1991; Chetverin and Spirin、1995; Katanaevś、1995); リガーゼ連鎖反応 (LCR) (Landegrenś、1988; Barany、1991); ならびに自律配列複製系 (Fahyś、1991) および鎖置換複製 (Walkerś、1992) を含む種々の遺伝子増幅技術が含まれる。乳濁液およびインビトロ転写または転写 - 翻訳系の組み合わせが熱安定性を示す場合、サーマルサイクリングを有利に使用した遺伝子増幅技術 (PCR および LCR など) を使用することができる。

【0053】

有効な局所核酸濃度の増加により、マイクロカプセルをより有効に使用することができる。したがって、たった約 $5.2 \times 10^{-16} \text{m}^3$ 未満 (直径 $10 \mu\text{m}$ 未満の球体に相当) までの体積を有するマイクロカプセルを多くの目的で使用することができるが、所望であれば、より大きな体積のマイクロカプセルも勿論使用することができる。

10

【0054】

マイクロカプセルのサイズは、マイクロカプセル中で起こることが必要とされる生化学反応の全ての必要な成分を有効に収容できる大きさでなければならない。例えば、インビトロでは、転写反応および転写 - 翻訳の組み合わせ反応は共にしばしば総ヌクレオシド三リン酸濃度が約 2mM であることが必要である。

【0055】

遺伝子を 500 塩基長の単一の短い RNA 分子に転写するために、これは、マイクロカプセルあたり最低 500 分子のヌクレオシド三リン酸 (8.33×10^{-22} モル) が必要であることも留意することができる。 2mM の溶液を構成するために、この分子数を、 4.17×10^{-19} リットル ($4.17 \times 10^{-22} \text{m}^3$) の体積 (球体の場合、直径 93nm) のマイクロカプセル内に含めなければならない。

20

【0056】

さらに、特に翻訳に関する反応の場合、翻訳を引き起こすために必要な真核生物リボソーム自体の直径が約 30nm であることに留意すべきである。従って、好ましいマイクロカプセルの下限は直径が約 $0.1 \mu\text{m}$ (100nm) である。

【0057】

したがって、マイクロカプセルの体積は、好ましくは、直径 $0.1 \mu\text{m}$ と $10 \mu\text{m}$ との間の球体に相当する $5.2 \times 10^{-22} \text{m}^3$ と $5.2 \times 10^{-16} \text{m}^3$ との間、より好ましくは約 $5.2 \times 10^{-19} \text{m}^3$ と $6.5 \times 10^{-17} \text{m}^3$ との間 ($1 \mu\text{m}$ と $5 \mu\text{m}$ との間) である。

30

【0058】

一定の適用には小マイクロカプセルが好ましい (WO 99/02671 号に開示の方法など) が、本発明は小マイクロカプセルの提供に決して限定されないことおよび転写および翻訳系は巨大なマイクロカプセルでも機能することに留意することが重要である。

【0059】

乳濁液のマイクロカプセルサイズを、選択系の要件に従って乳濁液を形成するために使用した乳化条件の調整によって簡単に変化させることができる。

【0060】

区画サイズを、1) 混合時間の増加、2) W/O 比の変化、3) 界面活性剤濃度の変化によって (乳濁液の安定性および RRL の不活化の範囲内で) 変化させることができる。

40

【0061】

乳濁液中のマイクロカプセルのサイズ分布は、当業者に公知の任意の方法によって決定することができる。例えば、レーザー回折 (例えば、Coulter LS230 Particle Size Analyser を使用して) または顕微鏡試験を使用してサイズ分布を評価することができる。

【0062】

[発現]

本明細書中で使用される、「発現」は、遺伝因子中に含まれる核酸がその遺伝子産物に変換されることを示すためにその最も広い意味で使用される。したがって、核酸が DNA

50

である場合、「発現」は、DNAのRNAへの転写をいい、このRNAがタンパク質をコードする場合、「発現」は、RNAのタンパク質への翻訳をいうこともできる。核酸がRNAである場合、「発現」は、このRNAのさらなるRNAコピーへの複製、RNAのDNAへの逆転写、任意選択的には、このDNAのさらなるRNA分子への転写、任意選択的には、産生された任意のRNA種のタンパク質への翻訳をいうことができる。従って、好ましくは、「発現」は、転写、逆転写、複製、および翻訳からなる群から選択される一つまたは複数のプロセスによって行われる。

【0063】

したがって、遺伝因子の「発現」は、遺伝子産物を遺伝因子と同一のマイクロカプセル内に含めるように、DNA、RNA、もしくはタンパク質、または本発明のマイクロカプセル中に非天然の塩基またはアミノ酸（遺伝子産物）を含む核酸もしくはタンパク質のいずれかを指称することができる。

10

【0064】

[発現系]

転写および/または翻訳に必要な生物を含む場合、任意の適切なインビトロ真核生物発現系を本発明の乳濁液で 사용할 ことができる。グリコシル化が望ましい場合、必要に応じて、所望のグリコシル化パターンを達成するために、一つまたは複数のグリコシラーゼが存在することもできる。

【0065】

発現系は、例えば、細胞溶解物または抽出物の全部または一部を含み得る。例えば、小麦胚芽抽出物を使用することができ(Ander sonら、1983)、これはPromegaから市販されている。しかし、望ましくは、細胞溶解物は、哺乳動物細胞溶解物である。網状赤血球溶解物であってもよい。好ましい網状赤血球溶解物は、ウサギ網状赤血球溶解物(「RRL」)である。RRL系は十分にキャラクタライズされており(例えば、Pelham and Jackson, 1976を参照のこと)、Promegaから市販されている。

20

【0066】

しかし、他の細胞抽出物から調製した任意の従来の真核生物発現系を使用することができる。抽出物は、RNAの翻訳に必要な全ての成分(例えば、リボソーム、tRNA、アミノアシル-tRNA合成酵素、抽出物がアミノ酸で補足されることが好ましい開始、伸長、および終結因子など、ATP、GTP、クレアチンリン酸、およびクレアチンホスホキナーゼ、Mg²⁺などの他の補因子)を含むはずである。

30

【0067】

本発明の乳濁液の使用によって、乳濁液中に存在するインビトロ真核生物発現系を使用した遺伝因子の明らかな発現および/または遺伝子産物の活性を得ることが可能である。発現および/または活性は、望ましくは、乳濁液の形成前の発現系で達成可能な遺伝子産物のレベルの少なくとも1%のレベルである。より好ましくは、前記レベルおよび/活性の少なくとも10%、20%、または30%である。

【0068】

[遺伝因子]

「遺伝因子」は、核酸を含む分子または分子構築物である。本発明の遺伝因子は、任意の核酸(例えば、DNA、RNA、またはその任意の類似体(天然または人工))を含み得る。

40

【0069】

任意の適切な遺伝子産物をコードする核酸を、インビトロ転写および/または翻訳系で 使用することができる。コード配列に加えて、核酸は、例えば、転写および/または翻訳に必要なプロモーター、オペレーター、エンハンサー、翻訳および転写開始および終結配列、ポリアデニル化配列、スプライス部位、上流および下流の調節領域などを含み得る。いくつかの場合、特定の段階のみで確実に発現させるために誘導および/または温度感受性プロモーターを使用することが好ましい。

50

【0070】

遺伝因子の核酸成分を、さらに、一つまたは複数の分子または構造（ポリペプチド、ペプチド、化学物質および基、ならびに磁性ビーズなどの固相支持体などを含む）に共有結合または非共有結合させることができる。本発明の方法では、これらの構造または分子を、所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝因子の分類および/または単離を補助するようにデザインすることができる。

【0071】

以下から明らかのように、多くの場合、ポリペプチドまたは他の分子群または構造は、遺伝因子をタグ化するために遺伝子産物に直接または間接的に結合するか反応するリガンドまたは基質である。これにより、遺伝子産物の活性に基づいて遺伝因子を分類可能である。

10

【0072】

リガンドまたは基質を、当業者に自明の種々の手段によって核酸に連結することができる（例えば、Hermanson, 1996を参照のこと）。任意のタグは、遺伝因子をその後を選択するのに十分である。タグ化された遺伝因子を優先的に分離、増幅、または生存可能な任意の方法によって分類することができる。例としては、結合（例えば、Dynabeads（商標）を使用した磁性分離に基づく技術を含む）および分解に対する耐性（例えば、制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼによる）による選択が含まれる。

【0073】

核酸分子をリガンドまたは基質に連結することができる一つの方法は、ビオチン化である。ビオチンと核酸とが共有結合するように5'ビオチン化プライマーを使用したPCR増幅によってこれを行うことができる。ビオチン化された核酸を、非常に高い親和性で核酸に結合するアビジンまたはストレプトアビジンでコートしたポリスチレンマイクロビーズ（直径0.035~0.2μm）にカップリングすることができる。ビオチン化基質の添加または共有結合などの任意の適切な方法によって基質またはリガンドからこのビーズを誘導することができる。

20

【0074】

あるいは、ビオチン化された核酸を、サイログロブリン（669Kd）またはフェリチン（440Kd）などの巨大なタンパク質分子と複合体化したアビジンまたはストレプトアビジンにカップリングすることができる。この複合体を、例えば、リジンのアミノ基への共有結合またはビオチン-アビジンなどの非共有相互作用によって基質またはリガンドから誘導することができる。基質は、遺伝因子に連結しない形態で存在し得るが、（例えば、「閉じ込められた（caged）ビオチン類似体」（Sundbergら、1995；Pirrung and Huang、1996））の光活性化などのさらなる活性化工程を必要とする不活性な「タグ」を含む。次いで、選択された触媒により、基質が産物に変換される。次いで、「タグ」を活性化し、「タグ化された」基質および/または産物を、核酸と複合体化したタグ結合分子（例えば、アビジンまたはストレプトアビジン）と結合することができる。したがって、基質と「タグ」を介して核酸に結合した産物との比は、溶液中の基質と産物との比を反映する。

30

40

【0075】

別の方法は、産物特異的抗体（または他の産物特異的分子）に核酸をカップリングすることである。このシナリオでは、基質（または基質の一つ）は、遺伝因子に連結していない各マイクロカプセル中に存在するが、分子「タグ」（例えば、ビオチン、DIG、またはDNP）を有する。選択された触媒が基質を産物に変換させる場合、産物は「タグ」を保持し、産物特異的抗体によってマイクロカプセル中に捕捉される。この方法では、基質を産物に変換することができる酵素をコードするか産生する場合、遺伝因子のみが「タグ」と会合するようになる。

【0076】

全ての反応が停止してマイクロカプセルを合わせた場合、活性な酵素をコードする遺伝

50

因子を、「タグ」と結合するか特異的に反応する抗体または他の分子を使用して富化することができる。基質および産物の両方が分子タグを有するが、活性な遺伝子産物をコードする遺伝因子のみが同時精製される。

【0077】

非常に好ましい適用では、本発明の方法は、遺伝因子ライブラリーの分類に有用である。したがって、本発明は、遺伝子産物のレパートリーをコードする遺伝因子ライブラリーから遺伝因子を単離する、本発明の前記態様の方法を提供する。本明細書中で、用語「ライブラリー」、「レパートリー」、および「プール」を、遺伝因子ライブラリーが遺伝子産物のレパートリーをコードするように、当分野の通常の意味にしたがって使用する。一般に、ライブラリーは、遺伝因子のプールから構築され、分類を容易にする性質を有する。

10

【0078】

本発明を使用した遺伝因子ライブラリーからの遺伝因子の最初の選択には、ほとんどの場合、非常に多数の種々の遺伝因子のスクリーニングが必要である。遺伝因子のライブラリーを、以下を含む種々の異なる方法で作製することができる。

【0079】

天然に存在する遺伝因子のプールを、ゲノムDNAまたはcDNAからクローン化することができる(Sambrookら、1989)、例えば、免疫化または非免疫化ドナー由来の抗体遺伝子のPCR増幅レパートリーによって作製されたファージ抗体ライブラリーが機能的抗体フラグメントの非常に有効な供給源であることが証明されている(Winterら、1994; Hoogeboom、1997)。遺伝子のライブラリーを、遺伝子の全て(例えば、Smith、1985; Parmley and Smith、1988を参照のこと)もしくは一部(例えば、Lawmanら、1991を参照のこと)または遺伝子のプール(例えば、Nissimら、1994を参照のこと)をコードすることまたは無作為またはドープ処理合成オリゴヌクレオチドによって作製することもできる。種々のインビボ技術(大腸菌mutD5などの細菌の「変異誘発株」の使用(Liaoら、1986; Yamagishiら、1990; Lowら、1996); Bリンパ球の抗体高頻度変異系の使用(Yelamosら、1995)を含む)による遺伝因子または遺伝因子のプールへの変異の「無作為な」導入によってライブラリーを作製することもできる。変異誘発化合物およびイオン化またはUV照射(Friedbergら、1995を参照のこと)または変異誘発塩基類似体の組み込み(Freeze、1959; Zaccoloら、1996)によって、インビボおよびインビトロでランダムな変異を導入することもできる。例えば、変異性ポリメラーゼの使用によって、重合中にインビトロで遺伝子に「ランダム」変異を導入することもできる(Leungら、1989)。

20

30

【0080】

相同組換えの使用によって、インビボ(Kowalczykowskiら、1994を参照のこと)またはインビトロ(Stemmer、1994a; Stemmer、1994b)でさらなる多様性を導入することができる。

【0081】

[遺伝子産物]

したがって、本発明を使用して、特異的な所望の遺伝子産物類を産生するか、スクリーニングのための種々の範囲の遺伝子産物類(部分的であり得るか、完全に公知ではない)を産生することができる。

40

【0082】

用語「遺伝子産物」を、本明細書中で、ポリペプチドだけでなくRNA遺伝子産物も含まれるような最も広い意味で使用する。したがって、転写および翻訳産物の両方だけでなく転写産物のみも含まれる。

【0083】

好ましい遺伝子産物は、真核細胞(特に、哺乳動物細胞またはヒト細胞)に天然に存在するが、原核細胞には存在しないポリペプチドまたは野生型真核生物ポリペプチドと比較

50

して一つまたは複数のアミノ酸が変化したこのようなポリペプチドの変異形態である。変異形態は、例えば、スクリーニングのための多様性の作製に有用である。しかし、アミノ酸が変化した場合、このような変化の数は限定されることが好ましく、例えば、野生型ポリペプチドと比較して50未満、25未満、10未満、または5未満のアミノ酸が変化する。変異形態は、例えば、野生型ポリペプチドの一つまたは複数の生物活性のアンタゴニストまたはアゴニストとして作用することができる。したがって、これらは、構造と機能の関係の研究、スクリーニング、創薬プログラムなどで有用であり得る。任意の適切な方法によって核酸に変異を導入することができる。例えば、所望の配列を変化させた核酸配列を、部位特異的変異誘発によって得ることができる。次いで、これを使用して、その配列中に対応する変化を有するRNAまたはポリペプチドを発現させることができる。あるいは、所与の変異を含むように核酸を合成することができる。突然変異誘発物質および/または照射の使用によって変異を得ることもできる。

10

【0084】

一定の適用のために、発現系を使用して、真核細胞（好ましくは、哺乳動物細胞またはヒト細胞）の核酸の複製、修復、維持、または複製に有用な遺伝子産物を発現することができる。したがって、遺伝子産物は、例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素、リガーゼ、またはテロメラーゼとしての活性を有し得る。一つを超えるこのような活性を有し得る。核酸修復に関与する場合、プルーフリーディング活性を有し得る。

【0085】

乳濁液の疎水相によって形成される区画であって、発現系を含む区画中で遺伝子産物を産生することができる。

20

【0086】

[選択手順]

触媒活性、調節活性、または結合活性を使用してRNA、DNA、またはタンパク質遺伝子産物分子を選択する方法を設定することができる。

【0087】

(i) 親和性選択

特定のリガンドに親和性を有する遺伝子産物の選択の場合、遺伝因子を、リガンドを介してマイクロカプセル中の遺伝子産物に連結することができる。したがって、リガンドに親和性を示す遺伝子産物のみが遺伝因子自体に結合し、それにより、活性な産物を産生する遺伝因子のみが選択工程で保持される。したがって、この実施形態では、遺伝因子は、遺伝子産物のリガンドに連結する遺伝子産物をコードする核酸を含む。

30

【0088】

この実施形態では、選択すべき全ての遺伝子産物は、選択されるべき推定結合ドメインおよび共通の特徴（タグ）を含む。各マイクロカプセル中の遺伝因子は、リガンドに物理的に連結される。遺伝因子から産生された遺伝子産物がリガンドに親和性を示す場合、リガンドと結合し、これをコードする同一の遺伝因子に物理的に連結し、遺伝因子が「タグ化」される。反応後、全てのマイクロカプセルを合わせ、全遺伝因子および遺伝子産物を一つの環境内に共にプールする。所望の結合を示す遺伝子産物をコードする遺伝因子を、「タグ」と特異的に結合するか特異的に反応する分子を使用した親和性精製によって選択することができる。

40

【0089】

別の実施形態では、リガンドに結合する遺伝子産物が、例えば、さらなる結合パートナーからリガンドを単に隠すことに基づいて遺伝因子を分類することができる。この可能性において、遺伝因子は、親和性精製工程時に保持されるよりもむしろ選択的に溶出され、一方で他の遺伝因子が結合する。

【0090】

別の実施形態では、本発明は、工程（ b ）で遺伝子産物がこれをコードする遺伝因子に結合する、本発明の第2の態様の方法を提供する。次いで、遺伝子産物を、結合した遺伝因子と共に所望の活性を有する遺伝子産物へのリガンドの結合の結果として分類する。例

50

えば、全ての遺伝産物は、遺伝因子に共有結合または非共有結合する不変領域および所望の結合活性を得るために多様化する第2の領域を含み得る。

【0091】

親和性による分類は、結合することができるような条件下での二つの結合対メンバーの存在に依存する。この目的のために任意の結合対を使用することができる。本明細書中で使用される、用語「結合対」は、互いに結合することができる任意の分子対をいう。本発明で使用することができる結合対の例には、抗原および抗原に結合することができる抗体またはそのフラグメント、ビオチン - アビジン / ストレプトアビジン対 (Savageら, 1994)、カルシウム依存性結合ポリペプチドおよびそのリガンド (例えば、カルモジュリンおよびカルモジュリン結合ペプチド (Stofkoら, 1992; Montigianiら, 1996))、構築されてロイシンジッパーを形成するポリペプチド対 (Tripetら, 1996)、ヒスチジン (典型的には、ヘキサヒスチジンペプチド) およびキレート化された Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、および Ni^{2+} (例えば、Ni-NTA; Hochuliら, 1987)、RNA結合およびDNA結合タンパク質 (Klug, 1995) (亜鉛フィンガーモチーフを含むもの (Klug and Schwabe, 1995) を含む)、ならびにDNAメチルトランスフェラーゼ (Anderson, 1993) およびその核酸結合部位が含まれる。

10

【0092】

しかし、一定の親和性ベースの選択方法の実用性は制限され得る。詳細には、低程度から中程度の親和性相互作用では、相互作用の半減期は、相互作用を検出するために必要な時間と比較して非常に短い場合が多い。

20

【0093】

したがって、本発明の一つの実施形態では、選択方法は、多数の相互作用が起こることによる細胞間相互作用の親和性の増加に基づく。得られた多数の相互作用 (アビディティ (avidity) と呼ばれる) によって増大した明らかな親和性の増加は、同一の分子複合体内で二つまたはそれ以上の結合相互作用が起こった場合に、第2の相互作用またはさらなる相互作用に費やすさらなるエントロピーの対価 (entropic price) が非常に少なくてもよいという事実に起因する。これは、多価リガンドを固定した一つの結合部位を介して結合した時に自由度がほとんど喪失しているためである。しかし、解離が起こり得る前に全ての相互作用が破壊されるはずであるので、アビディティは、解離速度 (k_{off}) に特に劇的な効果を有し得る。

30

【0094】

したがって、この実施形態では、相互作用する分子を、分子間で多価の相互作用が起こり、それにより対応する1価の相互作用と比較して任意の形成された複合体の安定性が増大することによって選択することができる。

【0095】

好ましくは、第1および/または第2の相互作用分子 (例えば、結合する遺伝子産物およびリガンド分子) を、その結合価を増大するように改変した。好ましくは、一つまたは複数の反応基は、遺伝子産物 (および/またはリガンド) 分子が互いに会合して多価遺伝子産物複合体および/または多価リガンド分子複合体を形成するように、遺伝子産物またはリガンド分子上またはその両方に存在する。次いで、多価複合体を、本発明によって結合について選択することができる。好ましくは、反応基は、相互作用の際に共有結合を形成する。

40

【0096】

本明細書中で使用される、用語「多価複合体」は、(i) 少なくとも二つの遺伝子産物の分子または少なくとも一つの多価遺伝子産物の分子および(ii) 少なくとも二つの遺伝子産物の分子がリガンド分子と相互作用するか、少なくとも一つの多価遺伝子産物が少なくとも二つの結合価を介してリガンド分子と相互作用する多価リガンド分子を含む分子複合体を意味する。

【0097】

50

このようなアビディティ選択手順では、リガンド分子は好ましくは多価である。例えば、リガンド分子がポリペプチドである場合、リガンド分子は、多量体を形成する第3のポリペプチドとの融合タンパク質として発現されることによって多価であり得る。

【0098】

遺伝子産物および/またはリガンド分子は、これらの中で形成された複合体の精製を補助するため、および/または分析および同定のために遺伝子産物および/またはリガンド分子の回収を補助するためにタグ（例えば、ビオチンまたはmycエピトープタグまたは部分）を含み得る。

【0099】

リガンド分子は、典型的には、二量体などの多量体であるか、本発明の方法で使用する反応条件下でホモ多量体を形成することができる。あるいは、リガンド分子は、ヘテロ多量体であり得る。多量体であるが、その構成要素であるサブユニットが通常多量体を形成しないように操作されたポリペプチドであるリガンド分子を使用することが好ましい。共有結合した多量体を形成するために二つまたは複数の分子の化学結合によってこれを行うことができる。あるいは、ポリペプチドであり、ポリペプチドである遺伝子産物に結合するリガンド分子の場合、分子を第3のポリペプチドとの融合物として発現することができ、第3のポリペプチドはホモ多量体を形成して有効に融合したリガンドポリペプチド配列を多量体化する。適切な第3のポリペプチド（本明細書中で、「フック（hook）」ポリペプチドという）の例は、二量体を形成するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）である。好ましいフックポリペプチドにより、良好な発現レベルの可溶性産物が得られる。一つの実施形態では、細菌ペリプラズムへの分泌に適切なフックポリペプチド（例えば、3つの表面Cys残基の除去後のGST（Tudyka and Skerra, 1997））が好ましい。複数のリガンド分子としてリガンド分子を得ることができる。

【0100】

本発明の特に好ましい実施形態では、遺伝子産物は、第1のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドであり、このポリヌクレオチドは、第1のポリペプチドが本発明のスクリーニング方法において選択される場合に、選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が物理的に連結するか非常に近接し、容易に回収することができ、例えば、配列決定して選択したポリペプチドの同一性が決定されるように対応するポリペプチドに会合している。これを達成するために、本発明の使用乳濁液あたり平均してたった一つのポリヌクレオチドが存在するように多数の第1のポリヌクレオチドを区画中に存在させることができる。

【0101】

本発明の方法で 사용할 ことができるアビディティベースの選択方法のさらなる詳細は、同時係属中のGB特許出願第0114856.8号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載されている。

【0102】

(ii) 触媒

触媒を選択する場合、各マイクロカプセル中の遺伝因子は、反応基質を含み得る。遺伝因子が触媒として作用することができる遺伝子産物をコードする場合、遺伝子産物は基質の産物への変換を触媒する。したがって、反応後、遺伝因子は、触媒反応産物に物理的に連結する。マイクロカプセルを合わせて反応物質をプールした場合、触媒分子をコードする遺伝因子を、産物に特異的な任意の性質の選択によって富化することができる。

【0103】

例えば、産物に特異的に結合する分子（例えば、抗体）を使用した親和性精製によって富化することができる。同様に、遺伝子産物は、例えば、核酸のメチル化（または脱メチル化）または変異によって制限エンドヌクレアーゼなどのヌクレアーゼによる抗原に耐性を与えるか感受性を示させる、遺伝因子の核酸成分の改変効果を有し得る。

【0104】

あるいは、同一のマイクロカプセル中で起こるその後の反応物への第1の反応物のカッ

10

20

30

40

50

プリングによって、間接的に選択することができる。これを行うことができる二つの一般的な方法が存在する。第1に、第1の反応産物を、第1の反応の基質と反応しない分子と反応するか結合することができる。第2に、カップリング反応は、第1の反応産物の存在下のみで進行する。次いで、活性な遺伝因子を、第2の反応産物の性質についての選択によって精製することができる。

【0105】

あるいは、選択された反応産物は、第2の酵素触媒反応の基質または補因子であり得る。第2の反応を触媒する酵素を、インサイチューでマイクロカプセル中に翻訳するか、マイクロカプセル化前に反応混合物に組み込むことができる。第1の反応が進行した場合のみでカップリングした酵素は選択可能な産物を作製する。

10

【0106】

それぞれ基質として前反応の産物を使用して複数の酵素を組み込むために、このカップリング概念を組み立てることができる。これにより、固定基質と反応しない酵素を選択可能である。一つの反応産物が第2の反応または選択可能な産物を誘導する一連の反応の触媒または補因子である場合、シグナル増幅によって感度が増大されるようにデザインすることもできる（例えば、Johannsson and Bates, 1988; Johannsson, 1991を参照のこと）。さらに、酵素カスケード系は、酵素アクチベーターの産生または酵素インヒビターの破壊に基づくことができる（Mizera, 1989を参照のこと）。カップリングはまた、同一の産物を作製し、一工程で実施できない複雑な化学的形質転換物の選択が可能である全酵素群に共通の選択系を使用することができるという利点を有する。

20

【0107】

したがって、このようなカップリング方法により、段階的様式での新規のインビトロ「代謝経路」の進化、最初の一工程およびその後の工程の選択および改良が可能である。選択戦略は、経路の最終産物に基づき、その結果、各反応工程のために新規の選択系を設定することなく全ての前の工程を単独または連続的に進化させることができる。

【0108】

別の様式では、

- (1) 遺伝因子を発現させてその各遺伝子産物を得る工程と、
- (2) 遺伝子産物を触媒して基質を所望の活性によって直接選択可能であるか不可能である産物に変換する工程と、
- (3) 任意選択的に、第1の反応物を各反応物が前の反応の産物によって調整される一つまたは複数のその後の反応物にカップリングさせて、選択可能な最終産物を作製する工程と、
- (4) a) 産物が遺伝因子に会合したままの方法で、基質を遺伝因子にカップリングする工程、または
 - b) 産物上に保持される基質に結合された適切な分子「タグ」によって遺伝因子に選択可能な産物を反応させるか結合させる工程、または
 - c) 産物特異的の反応または産物との相互作用によって遺伝因子に選択可能な産物（基質ではない）をカップリングする工程のいずれかによって遺伝因子に触媒の選択可能な産物を連結する工程と、
- (5) 特異的の反応もしくは産物との相互作用または触媒産物に結合した適切な分子「タグ」を使用した親和性精製のいずれかによって結合する遺伝因子と共に触媒の産物を選択する工程とを含み、工程(1)～(4)において各遺伝因子および各遺伝子産物は本発明の乳濁液から形成されたマイクロカプセル内に含まれる、所望の触媒活性を有する遺伝子産物をコードする一つまたは複数の遺伝子の単離方法を提供する。

30

40

【0109】

(iii) 調節

類似の系を使用して、酵素の調節特性を選択することができる。

【0110】

50

生化学的プロセスのアクチベーターまたはインヒビターとして作用するレギュレーター分子の選択の場合、生化学的プロセスの成分を、各マイクロカプセル中にインサイチューで翻訳するか、マイクロカプセル化前に反応混合物に組み込むことができる。選択された遺伝因子がアクチベーターをコードする場合、触媒と共に上記の調節された反応の産物について選択することができる。インヒビターを所望する場合、調節された反応の基質に特異的な化学的性質について選択することができる。

【0111】

したがって、

(1) 遺伝因子を発現させてその各遺伝子産物を得る工程と、
 (2) 選択可能な分子を作製または生存する方法で、所望の活性によって遺伝子産物により生化学反応またはカップリングされた反応物の配列を活性化または阻害する工程と、
 (3) a) 選択可能な分子またはこれから誘導される基質を遺伝因子に結合させる工程、または

10

b) 産物上に保持された基質に結合した適切な分子「タグ」によって選択可能な産物を遺伝因子と反応させるか結合させる工程、または

c) 産物特異的の反応または産物との相互作用によって遺伝因子に触媒産物（基質ではない）をカップリングする工程とのいずれかによって選択可能な分子を遺伝因子に連結する工程と、

(4) 特異的の反応もしくは選択可能な産物との相互作用または触媒産物に結合した適切な分子「タグ」を使用した親和性精製のいずれかによって結合する遺伝因子と共に選択可能な産物を選択する工程とを含み、工程(1)～(4)において各遺伝因子および各遺伝子産物は本発明の乳濁液から形成されたマイクロカプセル内に含まれる、所望の調節活性を示す遺伝子産物をコードする一つまたは複数の遺伝因子の分類方法を提供する。

20

【0112】

(iv) マイクロカプセル分類

本発明は、使用される分類技術によって可能なインタクトなマイクロカプセルの分類を提供する。したがって、所望の遺伝子産物によって誘導される変化が起こるかマイクロカプセル表面に産物自体が発生するか、マイクロカプセルの外側で検出可能である場合にマイクロカプセルを分類することができる。遺伝子産物の直接的作用によって変化するか、一つまたは複数が所望の活性を有する遺伝子産物を含む一連の反応により間接的に変化することができる。例えば、遺伝子産物はその表面にディスプレイされ、それにより試薬に接近可能なようにマイクロカプセルを構成することができる。マイクロカプセルが膜状マイクロカプセルである場合、遺伝子産物をターゲティングするか、マイクロカプセルの膜に分子をターゲティングすることができる。例えば、融合または連結した分子のマイクロカプセル膜への組み込みを支持する膜局在化配列（膜タンパク質由来のものなど）の使用によってこれを行うことができる。あるいは、油中水滴型乳濁液などの相区画化によってマイクロカプセルが形成される場合、マイクロカプセルの境界に存在するようにカプセル相外でより可溶性の高い部分を有する分子自体が配置される。

30

【0113】

しかし、本発明の好ましい態様では、マイクロカプセルの光学特性（例えば、吸収または発光特性）の変化（例えば、マイクロカプセルに関連する吸収、発光、リン光、または蛍光の変化をもたらす反応に起因するマイクロカプセルの光学特性の変化）に依存する分類系にマイクロカプセル分類を適用する。このような特性の全ては、用語「光学的な」に含まれる。このような場合、マイクロカプセルを、発光、蛍光、またはリン光活性化分類によって分類することができる。非常に好ましい実施形態では、蛍光活性化分類を使用して、カプセル中の蛍光分子の産生によって所望の活性を有する遺伝子産物を産生するマイクロカプセルを分類する。例えば、遺伝子産物自体は、蛍光性（例えば、GFPなどの蛍光タンパク質）であり得る。あるいは、遺伝子産物により、別の分子への結合または別の分子との反応などによって別の分子の蛍光を誘導または改変することができる。

40

【0114】

50

(v) マイクロカプセルの同定

マイクロカプセル表面で起こるか、出現するか、または第(i v)節(マイクロカプセル分類)に記載のように外側から検出可能である所望の遺伝子産物により、誘導変化によってマイクロカプセルを同定することができる。同定された場合、この変化を使用して、区画内で遺伝子の改変を誘発する。本発明の好ましい態様では、マイクロカプセルの同定は、マイクロカプセル内で発光、リン光、または蛍光を発生する反応に起因するマイクロカプセルの光学的特性の変化に依存する。マイクロカプセル内の遺伝子の改変を、発光、リン光、または蛍光の同定によって誘発する。例えば、発光、リン光、または蛍光の同定により、遺伝因子を改変させる光子(または他の粒子もしくは波動)を使用した区画の照射を誘発することができる。迅速な細胞分類についての類似の手順が以前に記載されている(K e i j ら, 1994)。遺伝因子の改変は、例えば、光不安定性保護基によって閉じ込められた分子「タグ」の遺伝因子へのカップリングに起因し得る(適切な波長の光子での照射によってケージが除去される)。その後、全てのマイクロカプセルを合わせ、一つの環境下に遺伝因子をプールする。所望の活性を示す遺伝子産物をコードする遺伝因子を、「タグ」に特異的に結合するか特異的に反応する分子を使用した親和性精製によって選択することができる。

10

【0115】

(v i) 多工程手順

本発明によれば、全ての転写/複製および/または翻訳プロセスを必要とせず、一工程で選択が進行する(一つのマイクロカプセル中で全ての反応が起こる)ことも認識される。選択手順は、二つまたはそれ以上の工程を含んでもよい。第1に、遺伝因子ライブラリーの各遺伝因子の転写/複製および/または翻訳が第1のマイクロカプセル内で起こり得る。次いで、各遺伝子産物を、(同一のマイクロカプセル中に存在する)これをコードする遺伝因子に連結する。次いで、マイクロカプセルを破壊し、任意選択的にその各遺伝子産物に結合した遺伝因子を精製する。あるいは、乳化に依存しない方法を使用して、遺伝因子をその各遺伝子産物に結合することができる。例えば、ファージディスプレイ(S m i t h, G . P., 1985)、ポリソームディスプレイ(M a t t h e a k k i s ら, 1994)、RNA-ペプチド融合(R o b e r t s a n d S z o s t a k, 1997)、またはl a cリプレッサーペプチド融合(C u l l ら, 1992)。

20

【0116】

手順の第2の工程では、その遺伝子産物に結合した各精製遺伝因子を、選択すべき反応成分を含む第2のマイクロカプセルに入れる。次いで、この反応を開始させる。反応完了後、マイクロカプセルを再度破壊し、改変された遺伝因子を選択する。多数の各成分および反応工程が含まれる複雑な多工程反応の場合、最初の作製工程および遺伝因子との遺伝子産物の結合と遺伝因子の選択可能な変化が得られる最後の工程との間に一つまたは複数の介在工程を行うことができる。

30

【0117】

(v i i) インサイチューでのレポーター遺伝子発現の活性化による選択

遺伝因子によってコードされる所望の結合、触媒、または調節活性により全てのマイクロカプセル中に存在する「レポーター遺伝子」発現の活性化を直接または間接的に誘導されるように系を設定することができる。所望の活性を有する遺伝子産物のみがレポーター遺伝子発現を活性化する。レポーター遺伝子発現に起因する活性により、本明細書中に記載の任意の方法によって遺伝因子(またはこれを含む区画)が選択される。

40

【0118】

例えば、レポーター遺伝子の活性化は、「2ハイブリッド系」に類似の様式での遺伝子産物の結合活性の結果であり得る(F i e l d s a n d S o n g, 1989)。活性化はまた、所望の遺伝子産物によって触媒される反応産物に起因し得る。例えば、反応産物は、レポーター遺伝子の転写インデューサーであり得る。例えば、アラビノースを使用して、a r a B A Dプロモーター由来の転写を誘導することができる。所望の遺伝子産物の活性によっても転写因子を改変し、レポーター遺伝子を発現させることができる。例え

50

ば、所望の遺伝子産物がキナーゼまたはホスファターゼである場合、転写因子がリン酸化または脱リン酸化されて、レポーター遺伝子発現を活性化することができる。

【0119】

(vii) 増幅

本発明のさらなる態様によれば、方法は、遺伝因子のさらなる増幅工程を含み得る。所望の遺伝子産物をコードする遺伝因子を富化する手段として選択的増幅を使用することができる。

【0120】

上記の全構成では、遺伝因子中に含まれる遺伝物質を増幅し、反復工程でこのプロセスを繰り返すことができる。ポリメラーゼ連鎖反応 (Saikiら, 1988) または種々の他の遺伝子増幅技術 (Q レプリカーゼ増幅 (Cahill, Foster and Mahan, 1991; Chetverin and Spirin, 1995; Katanaev, Kurmasov and Spirin, 1995); リガーゼ連鎖反応 (LCR) (Landgrenら, 1988; Barany, 1991); 自律配列複製系 (Fahy, Kwok and Gingeras, 1991) および鎖置換増幅 (Walkerら, 1992) が含まれる) の一つの使用によって増幅することができる。

10

【実施例1】

【0121】

[従来の乳濁液は、有効な真核生物のインビトロ翻訳を支持しない]

4.5% v/v のソルビタンモノオレート (Span, Fluka; 85548) および 0.4% v/v のポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Tween 80, Sigma Ultra; P-8074)、および 0.05% v/v の t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (Triton-X 100, Sigma) を含む鉱物油 (Sigma; M-3516) を含む油相処方物 (「元のCSR混合物」) を使用して、RRL 発現反応を乳化した。プラスミドテンプレートから、ホタルルシフェラーゼを発現する TNT T7 クイックカップリング転写/翻訳系 (Promega) を使用して全ての RRL 反応を行った。80% RRL (v/v)、メチオニン 0.02 mM、およびルシフェラーゼプラスミドテンプレート (1 µg) を含む 50 µl の発現反応を氷上で設定した。これの 40 µl アリコートをし、持続的に攪拌しながら (1000 rpm) 100 µl の氷冷油相に滴下する (5秒あたり1滴) ことによって乳化した。最後の1滴の添加後 (約20秒後)、さらに3~4分間攪拌しつづけた。

20

30

【0122】

乳化した反応物を、30°C で1時間インキュベートし、上記のエーテルを使用して抽出した。ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega) を使用して96ウェルプレートリーダー中でルシフェラーゼ活性を測定した。単に活性を比較することができるようにエーテルで非乳化反応物も抽出した。これにより、乳濁液内の発現レベルが非乳化反応によるレベルよりも典型的には0.1%と非常に低いことが示された。

【0123】

1.5% (v/v) Span 80 (SIGMA) を含む鉱物油 (SIGMA) を含む「還元」油相処方物を使用して、特に20 µMまでのDTTの添加によって収率が0.7%までわずかに改良された。元のCSR油混合物を使用したDTTの封入は、乳濁液の形成に非常に悪影響を与えた。混合時間を変化させたいくつかの水相:油相比を試験した。上記の条件により、インキュベーション時間を超えて乳濁液の完全性が保持される最も高い活性が得られた。

40

【0124】

したがって、Span 80のみ、またはTween 80とTriton X-100との組み合わせに基づいた「古典的な」乳化処方物を使用したRRL反応物の乳化により、酵素ホタルルシフェラーゼの発現によって判断したところ、インビトロ翻訳活性が完全に喪失された (乳濁液の外側の発現として1%未満 (表2))。

【0125】

50

さらに、本発明者らは、おそらく油相成分に起因するヘミン酸化を示す乳化後（図1を参照のこと）約数分以内に暗桃色から錆びた褐色（rusty brown）へのRRLのヘミン成分の色の変化に留意した。

【実施例2】

【0126】

[抗酸化剤は、有効な真核生物インビトロ翻訳を修復しない]

哺乳動物の翻訳は、特に、細胞ストレスに反応するeIF-2キナーゼファミリーによって調節される（Dever, 1999, TIBS, 24, 398~403に概説）。eIF-2キナーゼは、センサードメインおよび保存されたeIF-2キナーゼドメインを含む。その機能は、センサードメインが受けた刺激に反応したeIF-2（下方翻訳（down translation）を遮断する）のリン酸化である。これは、細胞ストレス環境において細胞を資源の浪費（タンパク質翻訳は、大量の細胞エネルギーを消費する）から保護するか、ウイルスゲノムの発現の防止による抗ウイルス防御として役立つ。異なるストレスシグナル型に反応する4つの異なるキナーゼが公知である（表1）。

10

【0127】

【表1】

ストレス応答性eIF2キナーゼ

名称	活性化シグナル
HRI	酸化ストレス（低ヘム）
PKR	ウイルス感染（dsRNA）
GCN2	枯渇（低アミノ酸、非負荷tRNA）
PERK	熱ストレス、ウイルス感染（非折りたたみタンパク質）

20

【0128】

本発明者らは、（RRLにおけるヘミンの変色によって得られる）翻訳の完全な遮断についての一つの理由は、油由来の酸化種の水相への分散によって生じた酸化ストレスと推論した。

30

【0129】

変色および翻訳の阻害を担う成分は、Span 80およびTween 80界面活性剤の両方に含まれるが、鉱物油には含まれないと特定された。

【0130】

本発明者らは、油相（BDH、BDA）および/または水相（DTT、アスコルビン酸）内に抗酸化剤または還元化合物を提供することによる酸化還元の変化の緩衝化を試みた。さらに、本発明者らは、乳化前に油相（鉱物油界面活性剤混合物）またはSpan 80と（ポリスチリルメチル）トリメチルアンモニウムホウ化水素ビーズ（Novabiochem）またはDTTとの2種のみ反応によって油相から酸化種を除去することを試みた。変色を示すが（図1）、これにより翻訳効率はわずかに改善された（表2）。さらに、ホウ化水素ビーズでの油相の処理により、界面活性剤/油相の乳濁液形成特性が減少してより不安定な乳濁液が得られるようであった。

40

【0131】

DTT（最終濃度20μM）のみによって、非乳化反応物と比較して乳濁液内の発現レベルが僅かであるが継続して改良された（表2）。より高いDTTレベルでは、RRL発現レベルに悪影響を与えることが証明された（図示せず）。一般に、DTTも乳濁液を不安定化させることが証明されている。

50

【実施例 3】

【0132】

[cAMP および 2 - AP は共に真核生物インビトロ翻訳を有効に行うことができない]
 本発明者らは、cAMP または 2 - アミノプリン (2 - AP) を使用して eIF2 キナーゼ経路の直接阻害を試みた。cAMP のみを使用した場合に少し改良されるが、DTT の有利な効果ほど付加的ではないことが証明された (図示せず)。cAMP および 2 - AP は共にむしろ eIF2 キナーゼの非特異的インヒビターであり (現在利用可能な特異的インヒビターは存在しない)、おそらく RRL 翻訳系内の他のプロセスを妨害する。

【実施例 4】

【0133】

[HSP70 および HSP90 はともに真核生物インビトロ翻訳を有効に行うことができない]

より高濃度の DTT により残存するさらなる翻訳活性を救済することができないという事実により、酸化以外の要因が翻訳阻害に寄与するはずであることが示唆された。一つの疑いは、乳化プロセス (すなわち、親水性の水相と疎水性の油相との激しい混合) に影響を受けるタンパク質変性であった。実際、BSA (おそらく、凍結融解によって精製されたいくつかの変性タンパク質を含む) の添加により乳化しなくても翻訳が遮断されることがこれまでに知られている (Matts ら, 1993, Biochemistry, 32, 7323 ~ 7328)。本発明者らは、乳化を用いるか用いない Matts 93 の結果を確認した。本発明者らは、シャペロン (特に、HSP70 および HSP90 (SIGMA)) での RRL 溶解物の補足による効果の緩衝化も試みた。これにより、タンパク質を変性から保護することが公知の少量 (5%) のグリセロールの添加 (示さず) によって同等またはそれ以上であり得る小さな (付加的でない) 改善のみ再度得られた (示さず)。

【実施例 5】

【0134】

[新規の油相および油中水滴型乳濁液の開発]

このレベルの活性を考慮して、乳化プロセスにおける酸化ストレスまたはタンパク質変性を引き起こす可能性を減少させる新規の油相处方物を同定することを試みた。

【0135】

Span 80 ベースの乳濁液を使用した活性の改善の試みが失敗した後、本発明者らは、新規の界面活性剤を試験した。

【0136】

実施例 1 に記載のように乳化反応を行ったが、反応で使用した界面活性剤 (Span 80、Tween 80、および Triton) をシリコンベースの界面活性剤に代えた。これらのうち、化学的に不活性なシリコンベースの界面活性剤でうまくいくことが見出された。

【0137】

鉱物油中に 4% (v/v) で使用したポリシロキサン - ポリセチル - ポリエチレングリコールコポリマー (ABIL EM90) (Goldschmidt) により有意に改良された。攪拌時間の減少 (1.5 分) 以外は実施例 1 に記載の乳化により、非乳化反応よりも発現レベルが 39% まで劇的に増加した (表 2)。この乳濁液は、インキュベーション期間中安定で、顕微鏡による観察によって大部分の区画の直径が 2 ~ 5 ミクロンの範囲であることが明らかとなった (図 2)。

【0138】

10

20

30

40

【表 2】

非乳化の、および2つの異なる混合時間（3分および4分）で乳化したウサギ網状赤血球抽出物で発現したルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性（光単位：light unit（LU））

	非乳化	乳化： 混合時間	CSR乳濁液 混合物	1.5%Span80を 含む鉱物油	4%Abil
-DTT	326789	3分	945	832	127828
+DTT	231318		N.A.*	1632	78970
活性%			0.2%	0.2%/0.6%	39%/34%
	バックグラウンド： 249				

*不安定な乳濁液

	非乳化	乳化： 混合時間	CSR乳濁液 混合物	1.5%Span80を 含む鉱物油	4%Abil
-DTT	154442	4分	327	338	40155
+DTT	101702		N.A.*	843	29493
活性%			0.13%	0.15%/0.7%	26%/29%
	バックグラウンド： 114				

*不安定な乳濁液

【実施例 6】

【0139】

[新規の油相を使用した乳濁液中でのヒトテロメラーゼの発現]

テロメラーゼは、真核生物の染色体の末端に見出される特異的DNA構造である。これらには、3'末端（DNA複製で使用されたRNAプライマーの除去後の左側）にRNA成分およびタンパク質成分を含む特定の酵素テロメラーゼが付加されている。ヒトでは、この酵素は、ヒトテロメアRNA（hTR）およびヒトテロメラーゼポリペプチド（hTERT）を含み、6量体反復（TTAGGG）の反復コピーが染色体の末端に付加されている。テロメラーゼ活性は、腫瘍成長および抑制ならびに老化およびプログラム細胞死に
30

【0140】

構築および機能の両方のために特定のシャペロン（例えば、HSP90）および補助因子が必要なので、おそらく現時点では原核生物において機能的形態でテロメラーゼはうまく発現されていない。しかし、真核細胞およびウサギ網状赤血球溶解物インビトロ翻訳系でも発現することができる（Weinrichら、1997、Nat. Genet.、17、498～502・Beattieら、1998、8、177～180）。

【0141】

実施例5の油相を、RRL中での機能的ヒトテロメラーゼ発現について試験した。pCITE4a（Novagen）のIRESの縦列クローン化下流中のwt hTERTおよびhTRまたはpCITE4aの変異型（IRESが欠失している（pCITE-E））またはテロメラーゼの不活性欠失変異体に個別にクローン化したhTRを有するpCITE4aにクローン化したhTERTのいずれかをコードする線状T7駆動テンプレートを、各親プラスミドおよびプライマーCITET7ba（5'-GTTTTTCCCAGT CACGACGTTGTA A-3'）およびCITEterfo（5'-CCGGATA TAGTTCCTCCTTTCAGC-3'）を使用したPCR増幅によって調製した。

【0142】

発現反応物（50μl）は、RRL（80%v/v）、テロメラーゼ構築物（図3の説
40 50

明を参照のこと)、メチオニン(1 mM)、テロメラーゼ基質(TS(テロメラーゼ基質)プライマー(5' - AATCCGTCGAGCAGAGTT - 3'))(Intergen) 1 μM)、PCRエンハンサー(Promega)(3 μl)、dNTP(25 μM)、DTT(20 μM)を含んでいた。上に正確に記載の冷却条件(氷上)を乳濁液が形成し、30 で1.5時間インキュベートした。次いで、乳濁液を、200 μlのクロロホルム-イソアミルアルコールで抽出し、その後、1体積のフェノール-クロロホルムを含む水相で抽出した。

【0143】

テロメラーゼ反応産物をエタノール沈殿させ、20 μl滅菌水に再懸濁した。次いで、PCRベースのTRAP(Kim 94)アッセイ(Intergen)を使用して、乳濁液中に形成されたテロメラーゼ伸長産物を検出した。テロメラーゼ活性により、特徴的なラダー(6 bp間隔で各反復)が得られた(図3を参照のこと)。

10

【0144】

結果は、乳濁液中のWTテンプレートからの機能的に活性なテロメラーゼの発現を示した。テロメラーゼ遺伝子付加を省略するか不活性な欠失変異を使用したコントロール実験により、負の結果が得られた(図3)。

【0145】

[引用文献]

【表 3 A】

- Anderson, C.W., Straus, J.W. and Dudock, B. S. (1983) *Methods Enzymol*, 101, 635-44.
- Anderson, J.E. (1993) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 3, 24-30.
- 5 Ash, M. and Ash, I. (1993) *Handbook of industrial surfactants*. Gower, Aldershot.
- Barany, F. (1991) *PCR Methods Applic.*, 1, 5-16.
- Becher, P. (1957) *Emulsions: theory and practice*. Reinhold, New York.
- Blattner, F.R. and Dahlberg, J.E. (1972) *Nature New Biol*, 237, 227-32.
- Cahill, P., Foster, K. and Mahan, D. E. (1991) *Clin Chem*, 37, 1482-5. 10
- 10 Chetverin, A.B. and Spirin, A.S. (1995) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 51, 225-70.
- Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1865-9.
- Dever TE., *Trends Biochem Sci*. (1999), 24, 398-403
- Dickinson, E. (1994) In Wedlock, D.J. (ed.), *Emulsions and droplet size control*. Butterworth-Heine-mann, Oxford, Vol. pp. 191-257.
- 15 Fahy, E., Kwoh, D.Y. and Gingeras, T.R. (1991) *PCR Methods Appl*, 1, 25-33.
- Fields, S. & Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Freese, E. (1959) *J. Mol. Biol*, 1, 87. 20
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington D.C.
- 20 Ghadessy et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4552-4557
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A. (1987) *J Chromatogr*, 411, 177-84.
- Hoogenboom, H. R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
- 25 Johannsson, A. (1991) In Price, C.P. and Newman, D.J. (ed.), *Heterogeneous enzyme immunoassays*. Stockton Press, New York, Vol. pp. 295-325.
- Johannsson, A. and Bates, D.L. (1988) In Kemeny, D.M. and Challacombe, S.i. (ed.) , *Amplification by second enzymes*. John Wiley, Chichester, Vol. pp. 85-106. 30
- 30 Katanaev, V.L., Kurnasov, O.V. and Spirin, A.S. (1995) *Febs Lett*, 359, 89-92
- Kim, NW & Wu, F (1994), *Nucleic Acid Res*, 25, 2595-2597
- Klug, A. (1995) *Ann N Y Acad Sci*, 758, 143-60.
- Klug, A. and Schwabe, J.W. (1995) *Faseb T*, 9, 597-604.
- 35 Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. and Rehrauer, W.M. (1994) *Microbiol Rev*, 58, 401-65.
- Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L. (1988) *Science*, 241, 1077-80.
- Leung, D.W., Chen, E. and Goeddel, D.V. (1989) *Technique*, 1, 11-15. 40

【表 3 B】

- Liao, H., McKenzie, T. and Hageman, R. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 576-80.
- Lissant, K.J., ed. Emulsions and emulsion technology. Surfactant Science New York: Marcel Dekker, 1984.
- Low, N.M., Holliger, P.H. and Winter, G. (1996) *J Mol Biol*, 260, 359-68.
- 5 Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. and Wells, J.A. (1991) *Biochemistry*, 30, 10832-8.
- Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. and Sharp, P.A. (1983) *Methods Enzymol*, 101, 568-82. 10
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9022-6. 10
- Matts et al (1993), *Biochemistry*, 32, 7323-7328
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984) *Nucleic Acids Res*, 12, 7035-6.
- Miele, E.A., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983) *J Mol Biol*, 171, 281-95.
- 15 Mize, P.D., Hoke, R.A., Linn, C.P., Reardon, J.E. and Schulte, T.H. (1989) *Anal Biochem*, 179, 229-35.
- Montigiani, S., Neri, G., Neri, P. and Neri, D. (1996) *J Mol Biol*, 258, 6-13. 20
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R. I Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. and Winter, G. (1994) *Embo J*, 13, 692-8.
- 20 Parmley, S.F. and Smith, G.P. (1988) *Gene*, 73, 305-18.
- Pelham, H.R. and Jackson, R.J. (1976) *Eur J Biochem*, 67, 247-56.
- Pirrung, M.C. and Huang, C.Y. (1996) *Bioconj Chem*, 7, 31721.
- Roberts, B.E., Gorecki, M., Mulligan, R.C., Danna, K.J., Rozenblatt, S. and Rich, A. (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1922-6.
- 25 Roberts, J.W. (1969) *Nature*, 224, 1168-74.
- Roberts, R. & Szostak, J. (1997) RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12297-12302. 30
- Rosenberg, M., Weissman, S. and decrombrughe, B. (1975) *J Biol Chem*, 250, 4755-64.
- 30 Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) *Science*, 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savage, M.D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G.W., Morgensen, S. and Conklin, E.J. (1994) *Avidin-biotin chemistry: a handbook*. Pierce Chemical Company, Rockford.
- 35 Schick, M.J. (1966) *Nonionic surfactants*. Marcel Dekker, New York.
- Sherman, P. (1968) *Emulsion science*. Academic Press, London.
- Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-7. 40
- Stemmer, W.P. (1994a) *Nature*, 370, 389-91.
- Stemmer, W.P. (1994b) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10747-51.

【表 3 C】

- Stofko, H.R., Carr, D.W. and Scott, J.D. (1992) *Febs Lett*, 302, 274-8.
- Sundberg, S.A., Barrett, R.W., Pirrung, M., Lu, A.L., Kiangsoontra, B. and Holmes, C.P. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12050-12057.
- Tawfik D. & Griffiths A.D. (1998) *Nature Biotech.* 16, 652
- 5 Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T. and Hodges, R.S. (1996) *Protein Engng.*, 9, 1029-1042.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. and Malinowski, D.P. (1992) *Nucleic Acids Res*, 20, 1691-6. 10
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. and Roeder, R.G. (1979) *Cell*, 18, 469-84.
- 10 Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994) *Annu Rev Immunol*, 12, 433-55.
- Yamagishi, J., Kawashima, H., Matsuo, N., Ohue, M., Yamayoshi, M., Fukui, T., Kotani, H., Furuta, R., Nakano, K. and Yamada, M. (1990) *Protein Eng* 3, 713-9.
- Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., Gonzalez, F.A., Pannell, R., Neuberger, M.S. and Milstein, C. (1995) *Nature*, 376, 225-9.
- 15 Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M. and Gherardi, E. (1996) *J Mol Biol*, 255, 589-603. 20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 6 】

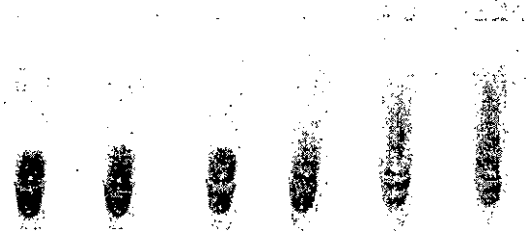
【図 1】油相とウサギ網状赤血球溶解物 (RRL) との 1 . 5 分間の混合によって形成され、30 で 1 5 分間インキュベーション後に可視スペクトルで撮影した乳濁液を示す図である。左から右：1) CSR 混合物、2) CSR 混合物 + DTT、3) 1 . 5 % Span 80 を含む鉱物油、4) 1 . 5 % Span 80 を含む鉱物油 + DTT、5) 4 % Abil EM 90、6) 4 % Abil EM 90 + DTT。

【図 2】位相差モードで画像化した 4 % Abil EM 90 を含む鉱物油乳濁液を示す図である。バーの間の距離は、10 μ m である。 30

【図 3】テロメラーゼ発現の結果を示す図である。パネル A (非乳化)：レーン 1、hTERT (75 ng)；レーン 2、hTR (75 ng)；レーン 3、hTERT + hTR；レーン 4、構築物なし；レーン 5、縦列 WT 発現構築物 (150 ng)；レーン 6、縦列欠変異体構築物 (150 ng)。パネル B：乳濁液 (レーンの注釈はパネル A と同一)。

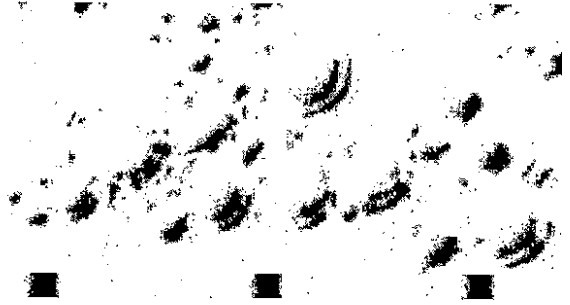
【 図 1 】

Fig 1



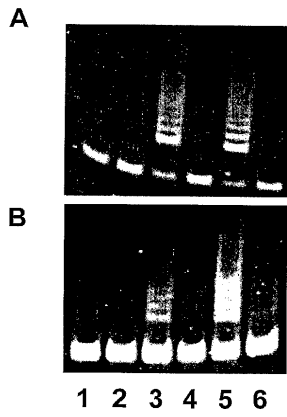
【 図 2 】

Fig 2



【 図 3 】

Fig 3



フロントページの続き

- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
- (74)代理人 100156443
弁理士 松崎 隆
- (72)発明者 ホリガー, フィリップ
イギリス国, シーピー2 2 キューエイチ ケンブリッジ, ヒルズ・ロード, エムアールシー・ラ
ボラトリー・フォー・モレキュラー・バイオロジー
- (72)発明者 ガデシー, ファリド
イギリス国, ダブリュー1ダブリュー 7 ビーエス ロンドン, ライディング・ハウス・ストリー
ト 9 1, ユニヴァーシティ・カレッジ・ロンドン, デパートメント・オンコロジ

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 国際公開第99/002671(WO, A1)
国際公開第00/040712(WO, A1)
Science, 1994年, Vol.266, p.2011-2015

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C12N1/00-15/90
 - C12P1/00-41/00
 - C12Q1/00-1/68
 - CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 - JSTPlus(JDreamII)
 - Pubmed