

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-503846

(P2020-503846A)

(43) 公表日 令和2年2月6日(2020.2.6)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12Q 1/6823 (2018.01)	C 12Q 1/6823	Z N A Z	2 G O 4 5	
C 12Q 1/6869 (2018.01)	C 12Q 1/6869	Z	4 B O 2 9	
C 12Q 1/6844 (2018.01)	C 12Q 1/6844	Z	4 B O 6 3	
C 40B 40/06 (2006.01)	C 40B 40/06			
C 12Q 1/02 (2006.01)	C 12Q 1/02			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-523655 (P2019-523655)	(71) 出願人	515113101 ナンナ セラピューティクス リミテッド N a n n a T h e r a p e u t i c s L i m i t e d イギリス, ケンブリッジシャー シービ ー1 3エルキュ, ケンブリッジ, ローズマリー レーン, メリフィールド センター
(86) (22) 出願日	平成29年11月8日 (2017.11.8)	(74) 代理人	100182084 弁理士 中道 佳博
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月5日 (2019.7.5)	(74) 代理人	100207136 弁理士 藤原 有希
(86) 國際出願番号	PCT/GB2017/053360		
(87) 國際公開番号	W02018/087539		
(87) 國際公開日	平成30年5月17日 (2018.5.17)		
(31) 優先権主張番号	1618820.3		
(32) 優先日	平成28年11月8日 (2016.11.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國 (GB)		
(31) 優先権主張番号	1709718.9		
(32) 優先日	平成29年6月19日 (2017.6.19)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タグなしコード化化学ライブラリ

(57) 【要約】

コード化化学ライブラリをスクリーニングするための方法を記載する。該ライブラリが、各々コード化タグに放出可能に連結された複数の異なる化学構造を含み、該方法は、(a) 該タグ付き化学構造のライブラリを提供する工程；(b) そのタグから各化学構造を放出させ、複数の遊離するタグなし化学構造 (T C S) を生じさせる工程；(c) それらをアッセイシステムと、各 T C S とそのタグとの間の空間的結び付けが維持される条件下で接触させることによって該 T C S をスクリーニングし、各々そのタグと空間的に結び付けられている複数の異なるスクリーニングされた T C S を生じさせる工程；および (d) スクリーニングされた T C S を、それと空間的に結び付けられたタグを解読することにより同定する工程を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

コード化化学ライブラリをスクリーニングするための方法であって、該ライブラリが、各々コード化タグに放出可能に連結された複数の異なる化学構造を含み、該方法が、(a)該タグ付き化学構造のライブラリを提供する工程；(b)そのタグから各化学構造を放出させ、複数の遊離するタグなし化学構造(TCS)を生じさせる工程；(c)それらをアッセイシステムと、各TCSとそのタグとの間の空間的結び付けが維持される条件下で接触させることによって該TCSをスクリーニングし、各々そのタグと空間的に結び付けられている複数の異なるスクリーニングされたTCSを生じさせる工程；および(d)スクリーニングされたTCSを、それと空間的に結び付けられたタグを解読することにより同定する工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記コード化タグが核酸を含み、前記方法が核酸コード化化学ライブラリをスクリーニングするためである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸がDNAであり、前記方法がDNAコード化化学ライブラリをスクリーニングするためである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

工程(d)が、前記核酸を配列決定することにより前記コード化タグを解読する工程を含む、請求項2または3に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記化学構造が小分子である、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記化学構造が切断可能なリンカーによって前記コード化タグに放出可能に連結され、必要に応じて該切断可能なリンカーは、酵素的に切断可能なリンカー；求核性/塩基感受性リンカー；還元感受性リンカー；光切断可能なリンカー；求電子性/酸感受性リンカー；金属補助切断感受性リンカー；酸化感受性リンカー；および前出の2つまたはそれ以上の組合せから選択されるリンカーを含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記化学構造が、切断部分および自己犠牲部分(SIM)を含む自己犠牲リンカーによって前記コード化タグに放出可能に連結され、必要に応じて前記切断部位がペプチドまたは非ペプチドの酵素的に切断可能な部分(例えば、Val-Cit-PAB)である、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

前記化学構造が、核酸ハイブリダイゼーションによって前記コード化タグに放出可能に連結されている、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記切断可能なリンカーがRNAを含み、工程(b)が前記タグ付き化学構造をRNAseと接触させることを含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 10】

前記化学構造が、前記コード化タグに対し、(a)該コード化タグの核酸にハイブリダイズし；かつ(b)該化学構造にカップリングされている核酸によって放出可能に連結されている、請求項2から9のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記ハイブリダイズする核酸が、請求項6または7に記載の切断可能なリンカーによって前記化学構造にカップリングされている、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記ハイブリダイズする核酸がRNAである、請求項10または11に記載の方法。

【請求項 13】

工程(b)が前記タグ付き化学構造をRNaseと接触させることを含む、請求項12

50

に記載の方法。

【請求項 14】

工程 (b) が、前記化学構造にカップリングしつつ前記コード化タグの核酸にハイブリダイズした核酸の脱ハイブリダイゼーション、例えば、融解、を含む、請求項 10 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

工程 (a) の前記コード化化学ライプラリが n 個のクローン集団のタグ付き化学構造を含み、各クローン集団が n 個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められている、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記ライプラリ微小区画が、微小液滴、微小粒子または微小小胞から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

(a) $n > 10^3$; または (b) $n > 10^4$; または (c) $n > 10^5$; または (d) $n > 10^6$; または (e) $n > 10^7$; または (f) $n > 10^8$; または (g) $n > 10^9$; または (h) $n > 10^{10}$; または (i) $n > 10^{11}$; または (j) $n > 10^{12}$; または (k) $n > 10^{13}$; (l) $n > 10^{14}$; または (m) $n > 10^{15}$ である、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記タグ付き化学構造が、1つまたは複数の前記ライプラリ微小区画中に、少なくとも 0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、5.0 nM、10.0 nM、15.0 nM、20.0 nM、30.0 nM、50.0 nM、75.0 nM、0.1 μM、0.5 μM、1.0 μM、5.0 μM、10.0 μM、15.0 μM、20.0 μM、30.0 μM、50.0 μM、75.0 μM、100.0 μM、200.0 μM、300.0 μM、500.0 μM、1 mM、2 mM、5 mM または 10 mM の濃度で存在する、請求項 15 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記タグ付き化学構造が、1つまたは複数の前記ライプラリ微小区画中に、1 nM 未満 ; 1 ~ 100 nM ; 100 nM より多い ; 1 μM 未満 ; 1 ~ 100 μM ; 100 μM より多い ; 5 ~ 50 μM または 10 ~ 20 μM の濃度で存在する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記工程 (c) の空間的結び付けが、前記 TCS およびそのタグが空間的に近接して閉じ込められているような微小区画化によって維持されている、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

前記工程 (c) のタグが、前記アッセイシステムから機能的または物理的に分離されている、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

前記タグが、請求項 15 または 16 に記載のライプラリ微小区画内または上に配置されている、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ライプラリ微小区画の各々が、工程 (b) の前に、例えばマイクロカプセル化、ピコインジェクションまたは微小液滴溶合によって、個別のスクリーニング微小区画内に配置される、請求項 15 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

前記スクリーニング微小区画が、微小液滴、マイクロウェルまたはマイクロフルイディックチャネルから選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記スクリーニング微小区画が、前記ライプラリ微小区画と、(i) 水性溶媒 ; および / または (i i i) ゲル化システム、例えば、ヒドロゲル ; および / または (i i i) 前

10

20

30

40

50

記工程 (c) のアッセイシステムとを含有する、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記スクリーニング微小区画が、前記同定工程 (d) 前にゲル化されて、前記ライプラリ微小区画が該ゲル化したスクリーニング微小区画内に固定化されるようなゲル化システムを含み、必要に応じて該ゲル化工程の後、該同定工程 (d) の前に洗浄工程が行われる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記工程 (b) において、前記 TCS が前記スクリーニング微小区画中に放出されるのに対し、前記タグが (a) 前記ライプラリ微小区画内または上に、例えば共有結合および / または水素結合によって、保持される； (b) ライプラリまたはスクリーニング微小液滴の表面で、官能基化された界面活性剤によって隔離される；または (c) 前記アッセイシステムの構成要素によって隔離される、請求項 23 から 26 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 28】

工程 (b) において、前記 TCS が、拡散によって前記スクリーニング微小区画中に放出される、請求項 23 から 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

工程 (c) が、前記アッセイシステムと、前記 TCS のクローン集団と、前記タグを含む前記ライプラリ微小区画とを含むスクリーニング微小液滴内で行われる、請求項 15 から 28 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 30】

前記コード化核酸タグが、前記化学構造のテンプレートである、請求項 2 から 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

工程 (a) が、前記化学構造の核酸テンプレート化合成、例えば、DNA テンプレート化合成の工程を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記テンプレート化合成が、前記コード化核酸テンプレートを、必要に応じて PCR によって、増幅することを含む工程の前に行われる、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記テンプレート化合成が、(a') (i) コード化テンプレートのクローン集団；および (ii) 複数の化学部分構造を含有するリアクタ微小区画を提供する工程；ならびに、次いで (b') 該部分構造が、核酸テンプレート化合成によって化学構造のクローン集団を形成するように反応する条件下で、該リアクタ微小区画内で該テンプレートを該部分構造と接触させる工程を含み、それにより、コード化テンプレートにハイブリダイズした化学構造のクローン集団を含むリアクタ微小区画を生じさせる、請求項 31 または 32 に記載の方法。

30

【請求項 34】

(i) 前記コード化テンプレートから前記化学構造を脱ハイブリダイズし、そして次いで (ii) 前記リアクタ微小区画内で該脱ハイブリダイズしたテンプレートを未反応の部分構造と、該部分構造が核酸テンプレート化合成によって化学構造のさらなるクローン集団を形成するように反応する条件下で接触させ、そして次いで (iii) 工程 (i) および (ii) を繰り返すことによって、化学構造の数を増幅させる工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

40

【請求項 35】

前記化学構造が、前記リアクタ微小区画中に、少なくとも 0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、5.0 nM、10.0 nM、15.0 nM、20.0 nM、30.0 nM、50.0 nM、75.0 nM、0.1 μM、0.5 μM、1.0 μM、5.0 μM、10.0 μM、15.0 μM、20.0 μM、30.0 μM、50.0 μM、75.0 μM、100.0 μM、200.0 μM、300.0 μM、500.0 μM、1 mM、2 mM、5 mM または 10 mM の濃度で存在するまで、工程 (i) および (ii) が繰り返される、

50

請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記化学構造が、前記リアクタ微小区画中に、1 ~ 100 μ M、5 ~ 50 μ M または 10 ~ 20 μ M の濃度で存在するまで、工程 (i) および (ii) が繰り返される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記リアクタ微小区画が、マイクロウェル、マイクロアレイ、マイクロフルイディックチャネル、微小粒子、微小小胞または微小液滴から選択される、請求項 3 0 から 3 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

前記テンプレート化合成が、前記化学構造にカップリングされた核酸と前記コード化タグテンプレートの核酸との間のハイブリダイゼーションを含む、請求項 3 1 から 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 9】

前記コード化核酸タグが前記化学構造のためのテンプレートではない、請求項 2 から 2 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

工程 (a) が、前記化学構造の核酸レコード化合成、例えば、DNA レコード化合成の工程を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

工程 (a) が、前記化学構造の核酸レコード化合成をスプリット・アンド・プールで行う工程を含む、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ライプラリが、化学構造のクローン集団を含み、そして工程 (a) が、該クローン集団内で該化学構造の各々にコード化タグを放出可能に連結する工程を含む、請求項 1 から 2 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 3】

前記コード化タグが核酸配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記コード化タグが DNA 配列を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記コード化タグが、複数の異なる架橋部位にて前記化学構造に放出可能に連結されている、請求項 4 2 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

前記コード化タグが、複数の異なる架橋基で官能基化されている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記アッセイシステムが均一水相アッセイシステムである、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

前記スクリーニング工程 (c) が表現型スクリーンを含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

前記アッセイシステムが生存標的細胞を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記標的細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記標的細胞が原核細胞である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記標的細胞が古細菌、例えば (a) クレン古細菌 (Crenarchaeota) ; (b) ユーリ

10

20

30

40

50

古細菌 (Euryarchaeota) ; (c) コル古細菌 (Korarchaeota) ; (d) ナノ古細菌 (Nanarchaeota) および (e) タウム古細菌 (Thaumarchaeota) の門から選択され、例えばハロフェラックス・ウォルカニイ (Haloferax volcanii) またはスルフォロブス属種 (Sulfolobus spp.) である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記標的細胞が細菌、例えば病原性細菌である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細菌がグラム陽性細菌であり、必要に応じてエンテロコッカス・フェカーリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) およびスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) から選択される、請求項 5 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 5】

前記細菌がグラム陰性細菌であり、必要に応じてクレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae)、アシネットバクター・バウマニ (Acinetobacter baumanii) およびエシェリキア・コリ (Escherichia coli)、エシェリキア・コリ ST131 株 (E. coli ST131 strains)、シュードモナス・エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa)、エンテロバクター・クロアカ (Enterobacter cloacae)、エンテロバクター・アエロゲネス (Enterobacter aerogenes) およびナイセリア・ゴノレア (Neisseria gonorrhoeae) から選択される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細菌のグラム反応が不確定である、請求項 5 3 に記載の方法。

20

【請求項 5 7】

前記細胞が (a) 真菌細胞； (b) 哺乳類細胞； (c) 高等植物細胞； (d) 原虫細胞； (e) 蠕虫細胞； (f) 藻類細胞； または (h) 無脊椎動物細胞である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞が癌細胞、例えば、ヒト癌細胞である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記アッセイシステムが、単離された標的タンパク質または単離された標的タンパク質複合体を含み、必要に応じて該標的タンパク質 / タンパク質複合体が、細胞内標的タンパク質 / タンパク質複合体である、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 6 0】

前記標的タンパク質 / タンパク質複合体が溶液中に存在する、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記標的タンパク質 / タンパク質複合体が膜または膜貫通タンパク質 / タンパク質複合体である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

工程 (c) において、前記化学構造が、前記標的タンパク質 / タンパク質複合体に結合するリガンドについてスクリーニングされる、請求項 5 9 から 6 1 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6 3】

前記リガンドが、前記標的タンパク質 / タンパク質複合体のインヒビターである、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記アッセイシステムが、検出可能な標識を含むかまたは生成する、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

前記検出可能な標識が、請求項 4 6 から 5 7 のいずれかに記載の細胞、または請求項 5 9 から 6 1 のいずれかに記載の単離された標的タンパク質もしくは単離された標的タンパ

50

ク質複合体に連結されている、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記スクリーニング工程が F A D S を含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 7】

前記スクリーニング工程が、蛍光分析、例えば F R E T 、 F l i M 、フルオロフォアタグ付き抗体、フルオロフォアタグ付き D N A 配列および / または蛍光染料分析を含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 8】

工程 (d) が、前記核酸を配列決定することによってコード化タグを解読する工程を含み、そして前記方法が、複数の異なるスクリーニングされた T C S の配列を比較する工程をさらに含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 6 9】

前記スクリーニングされた T C S に対して配列 - 活性の関係の分析を行う工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

先行する請求項のいずれかに記載の方法において使用するためのコード化化学ライプラリであって、該ライプラリが、各々コード化タグに放出可能に連結された化学構造の n 個のクローン集団を含み、各クローン集団が、 n 個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められている、ライプラリ。 20

【請求項 7 1】

前記化学構造が、請求項 7 に記載の切断可能なリンカーによって前記コード化タグに連結されている、請求項 7 0 に記載のライプラリ。

【請求項 7 2】

前記化学構造が、例えば請求項 7 から 1 2 のいずれかに記載される、核酸ハイブリダイゼーションによって前記コード化タグに連結されている、請求項 7 0 または 7 1 に記載のライプラリ。

【請求項 7 3】

請求項 1 から 6 9 のいずれかに記載の方法において使用するためのコード化化学ライプラリであって、該ライプラリが、遊離する化学構造の n 個のクローン集団を含み、各クローン集団が、 n 個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められ、該化学構造が、コード化タグと共に該微小区画内に含まれるが該コード化タグと共有結合されていない、ライプラリ。 30

【請求項 7 4】

前記コード化タグが核酸タグ、例えば D N A タグである、請求項 7 0 から 7 3 のいずれかに記載のライプラリ。

【請求項 7 5】

(a) $n > 10^3$; または (b) $n > 10^4$; または (c) $n > 10^5$; または (d) $n > 10^6$; または (e) $n > 10^7$; または (f) $n > 10^8$; または (g) $n > 10^9$; または (h) $n > 10^{10}$; または (i) $n > 10^{11}$; または (j) $n > 10^{12}$; または (k) $n > 10^{13}$; (l) $n > 10^{14}$; または (m) $n > 10^{15}$ である、請求項 7 0 から 7 4 のいずれかに記載のライプラリ。 40

【請求項 7 6】

前記化学構造が、前記ライプラリ微小区画中に、少なくとも 0.1 n M 、 0.5 n M 、 1.0 n M 、 5.0 n M 、 10.0 n M 、 15.0 n M 、 20.0 n M 、 30.0 n M 、 50.0 n M 、 75.0 n M 、 0.1 μ M 、 0.5 μ M 、 1.0 μ M 、 5.0 μ M 、 10.0 μ M 、 15.0 μ M 、 20.0 μ M 、 30.0 μ M 、 50.0 μ M 、 75.0 μ M 、 100.0 μ M 、 200.0 μ M 、 300.0 μ M 、 500.0 μ M 、 1 m M 、 2 m M 、 5 m M または 10 m M の濃度で存在する、請求項 7 0 から 7 5 のいずれかに記載のライプラリ。

【請求項 7 7】

10

20

30

40

50

前記化学構造が、前記ライプラリ微小区画中に、1～100 μM、5～50 μMまたは10～20 μMの濃度で存在する、請求項76に記載のライプラリ。

【請求項78】

前記化学構造が小分子である、請求項70から77のいずれかに記載のライプラリ。

【請求項79】

前記微小区画が、微小液滴、微小粒子および微小小胞から選択される、請求項70から78のいずれかに記載のライプラリ。

【請求項80】

前記化学構造がライプラリ微小液滴内に含まれ、そして前記コード化タグが、該ライプラリ微小液滴内にカプセル化された微小液滴、ビーズまたは微小小胞内または上に配置されている、請求項71から79のいずれかに記載のライプラリ。

10

【請求項81】

請求項1から69のいずれかに記載の方法において使用するためのアッセイ組成物であり、請求項73から80のいずれかに記載のライプラリを含み、前記微小区画内に含まれる化学構造がアッセイシステムと接触させられる、組成物。

【請求項82】

前記コード化ラグが、前記アッセイシステムから機能的または物理的に分離されている、請求項81に記載の組成物。

【請求項83】

前記化学構造が前記アッセイシステムを含むライプラリ微小液滴内に含まれ、そして前記コード化タグが、該ライプラリ微小液滴内にカプセル化された微小液滴、ビーズまたは微小小胞内または上に配置されている、請求項81または82に記載の組成物。

20

【請求項84】

前記アッセイシステムが請求項44から69のいずれかに記載されている、請求項81から83のいずれかに記載の組成物。

【請求項85】

請求項31から69のいずれかに記載の方法において使用するための核酸コード化化学ライプラリリアクタであって、(a)コード化核酸テンプレート分子のクローン集団、および(b)複数の化学部分構造を含み、該部分構造が、核酸テンプレートアセンブリがコード化核酸タグ付き化学構造を形成するように適合され、該コード化タグが該化学構造に放出可能に連結されている、リアクタ。

30

【請求項86】

前記微小区画が、微小液滴、微小粒子および微小小胞から選択される、請求項85に記載のリアクタ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コード化化学ライプラリに関し、特に、コード化タグと空間的に結び付けられた(spatially associated)タグなし(tagless)化学構造を含む核酸コード化ライプラリに関する。本発明はまた、核酸テンプレート化化学ライプラリ生成のための方法、コード化ライプラリをスクリーニングするための方法、ならびにコード化ライプラリを調製およびスクリーニングするための組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

創薬は、典型的には、化合物の大きなライプラリの組み立て、それに続く、標的に対する所望の活性(例えば、酵素活性または標識の置換)を示す「ヒット(hits)」を同定するための標的を含むマイクロウェルに化合物を個々に添加するアッセイまたはスクリーニングを含む。このプロセスは、ハイスループットスクリーニング(HTS)として知られる。それは、ロボット装置を使用して何百万もの化学物質をテストするために自動化することができるが、それは労力を要しつつ高価である。

50

【0003】

したがって、ライプラリのサイズの増加がスクリーニングの負担を増大させるという事実から生じる根本的な問題がある。スクリーニングアッセイの個別の性質のために、スクリーニング時間およびコストはライプラリサイズとほぼ直線的に比例する。これは、このようなアプローチを用いてスクリーニング可能な化学ライプラリのサイズに厳しい実用の制約を課した：HTSは、典型的には、 $10^3 \sim 10^6$ のメンバーを含むライプラリに適用される。

【0004】

この問題は、選択に基づくスクリーニング技術（例えば、パンニング技術）の開発によって対処してきた。ここでは、ライプラリ内のすべての化合物が、ワンポット形式で目的的と相互作用する能力について同時にテストされる。そのようなアッセイでは、スクリーニング工程の時間と費用はライプラリの大きさとは無関係であり、そのため、アッセイは比較的大きなライプラリに適用することができる。 10^{12} のメンバーまで含むライプラリが、このようなアプローチを用いてスクリーニングしてきた。

10

【0005】

この問題はまた、微小液滴ベースのライプラリの開発によっても対処してきた。これは、マイクロ流体技術によって処理してスループットを数桁向上させることができ、かつ細胞ベースの表現型スクリーンと適合可能である（例えば、Clausell-Tormos et al., (2008) *Chemistry & Biology* 15 : 427-437）。

20

【0006】

しかし、選択ベースのアッセイおよび微小液滴ベースのスクリーニングの両方とも、選択された化合物の同一性（すなわち、「ヒット」）が容易に決定されることを要求する。スクリーニング可能であるが解読可能でないライプラリは、有用ではない。

【0007】

この問題に対する解決策は、1992年にBrennerとLernerによって最初に提案され（Brenner and Lerner (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 5381-5383）、そしてDNAコード化化学ライプラリ（DECL）の生成に基づく。DECLにおいて、各化合物は、その構造または反応履歴に対応するDNA配列と結び付け（タグ付け）され、それによって、その特定の化合物のユニークな識別子として機能する（すなわち、DNAタグはその化合物を「コード化」し、そして、分子「バーコード」として機能する）。

30

【0008】

化合物は、種々の異なる方法でタグを付けることができ、そして、DNAタグは、単に特定の化学構造をコードする（「DNAレコード化」）だけでなく、その合成を指向させるテンプレートとして（「DNAテンプレート化」）、使用することもできる。この技術は、近年、Mannocci et al. (2011) *Chem. Commun.*, 47 : 12747-12753 ; Kleiner et al. (2011) *Chem Soc Rev.* 40(12) : 5707-5717 ; およびMullard (2016) *Nature* 530 : 367-369によって概説されている。

【0009】

DECL技術は現在、製薬業界内で十分に確立されている。2007年には、GSKは、5500万USドルで、DECLのパイオニアである会社の1つのPraecis Pharmaceuticalsを獲得した。一方、他のトップ10の製薬会社は、それら自身のインハウスのDNAコード化ライプラリプログラムを開始した。その他のバイオテクノロジー企業（X-Chem、ViperGen、Ensemble TherapeuticsおよびPhilochemを含む）もまた、積極的にDECL技術を開発し、活用を進めている。

40

【0010】

しかしながら、現在のDECLの有用性は、現在、タグの存在と結び付けられた問題によって制限されている。例えば、タグをコード化することは、（a）目的の標的上の分子結合部位へのタグ付き化合物のアクセスを化学的または立体的に妨害し、その結果、回収されるヒットの数および/または種類が制限される；（b）細胞の透過性および/または拡散を制限し、細胞の取り込みを効果的に防止し、細胞質へのアクセスに依存する細胞ベ

50

ースの表現型スクリーンの使用を排除する；(c)タグ付けした後に化学化合物が化学的に修飾され得る程度を制限する(特定の反応は、タグと化学的に不適合である)；そして(d)構造-活性分析の有用性を制限する(そのような分析は、活性に対するタグ自体の潜在的な影響によって混乱されるため)。現在の方法は低濃度で多数の化合物を含む化合物の混合プールを生じるという事実から、なおさらなる制限が生じる。これは、プールからの活性成分のデコンボリューションの必要性につながり、低濃度は、適用可能なスクリーンの形式と性質を厳しく制限する。均一な細胞ベースの表現型スクリーニングは不可能である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

解読可能な化学ライブラリのスクリーニングを可能にし、上記の問題を解決するHTS技術が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の第1の態様によれば、コード化された化学ライブラリをスクリーニングするための方法が提供され、該ライブラリが、各々コード化タグに放出可能に連結された複数の異なる化学構造を含み、該方法は、(a)該タグ付き化学構造のライブラリを提供する工程；(b)そのタグから各化学構造を放出させ、複数の遊離するタグなし化学構造(TCS)を生じさせる工程；(c)それらをアッセイシステムと、各TCSとそのタグとの間の空間的結び付けが維持される条件下で接触させることによって該TCSをスクリーニングし、各々そのタグと空間的に結び付けられている複数の異なるスクリーニングされたTCSを生じさせる工程；および(d)スクリーニングされたTCSを、それと空間的に結び付けられたタグを解読することにより同定する工程を含む。

20

【0013】

スクリーニングは任意の濃度のTCSで実施することができる。好ましくは、TCSの濃度は断片ベースのスクリーニングを容易にし、そして例えば、nM～mMの範囲にあり得る。

【0014】

したがって、本発明の方法は、タグなしコード化化学構造のライブラリのスクリーニングを可能にし、それによりコード化タグの存在に伴う問題を回避する。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】スプリット・アンド・プールDEC L生成の模式図。一次ファーマコアがタグ付けされ、当該一次ファーマコアに特異的である相補的オリゴヌクレオチドを介してビーズに担持される。ビーズ中のガイドDNAの μM ～ mM 濃度は、ビーズ中のファーマコアの対応する μM ～ mM 濃度を生じる。伝統的な化学的方法を用いた一次ファーマコア周辺のアセンブリ-各付加は、コード化タグ(これはバーコードとして機能する)の末端にライゲートされた特定のDNAにカップリングされる。したがって、ビーズは固相合成に使用することができ、そして反応のために大量の反応性の二次ファーマコアを付加することができる。追加のオリゴヌクレオチドのライゲーションは、同時に(例えば、クリックまたは同様の化学反応を介して)または合成後工程によって起こり得る。

40

【図2】スプリット・アンド・プールDEC Lの模式図。図1に示すように、合成工程は、DNA配列(タグ)の付加によってコード化されたファーマコア(部分構造)アセンブリを含む。ビーズ中のガイドDNAの μM ～ mM 濃度は、合成された化学構造の対応する μM ～ mM 濃度を生じる。指標細胞は、表現型スクリーニング用である。液滴内部のタグ放出は、表現型スクリーンにおいて指標細胞と相互作用するのに十分な濃度の遊離のタグなし化学構造をもたらす。DNAタグはなお、液滴内の遊離化学構造と空間的に結び付けられている。ポジティブFACヒットは、化学構造の構造を同定するためにNGS配列決定によって配列決定される。

50

【図3】ビーズマウント捕捉オリゴヌクレオチドへのコード化オリゴヌクレオチドのライゲーション。

【図4】ゲル上の切断可能なリンカーからのペイロードの酵素的放出。

【図5】100 μmの水性液滴中の切断可能なリンカーからのペイロードの酵素的放出。

【図6】ビーズ結合オリゴヌクレオチドからのヒュースゲン1, 3-双極子環化付加を用いて蛍光染料で官能基化された化学構造ペイロードの放出。

【図7】ビーズ結合オリゴヌクレオチドからのイソチオシアネート付加を用いて蛍光染料で官能基化された化学構造ペイロードの放出。

【図8】自己犠牲リンカーを用いた遊離化学構造の放出の模式図。

【図9】自己犠牲ジペプチドリンカーを用いたスプリット・アンド・プールD E C Lの模式図。

【図10】コード化タグを有するビーズに結合したV a l - C i t - P A B自己犠牲ペプチドリンカーを用いた遊離化学構造の放出の模式図。

【発明を実施するための形態】

【0016】

(タグ)

任意のコード化タグは、それがその同族の化学構造（またはその反応履歴）をユニークに同定する情報（例えば、化学的および/または光学的性質/特性の形態で）を含む限り、本発明に従って使用することができる。それによって、その特定の化学構造のユニークな識別子として機能する。したがって、タグは、特定の化学構造を「コード化」し、分子の「バーコード」として機能する。好ましい実施形態において、タグは、その情報が核酸の配列にコードされる核酸（例えば、DNA）タグである。しかし、他のタグを使用してもよく、非DNAタグ、非RNAタグ、修飾核酸タグ、ペプチドタグ、光ベースのバーコード（例えば量子ドット）およびRFIDタグを含む。

【0017】

以上説明したように、化学構造は、種々の異なる方法でタグを付けることができ、そしてDNAタグを、単に特定の化学構造をコード化する（「DNAレコード化」）だけでなく、その合成を指向させるテンプレートとして（「DNAテンプレート化」、以下参照）、使用することもできる。この技術は、近年、Mannocci et al. (2011) Chem. Commun., 47 : 12747-12753 ; Kleiner et al. (2011) Chem Soc Rev. 40(12) : 5707-5717; およびMillard (2016) Nature 530 : 367-369によって概説されている。

【0018】

特定の実施形態では、スプリット・アンド・プールタグ付け技法が使用される（例えば、Mannocci et al. (2011) Chem. Commun., 47 : 1274-12753、および特に図3を参照のこと。これは、参照により本明細書に援用される）。

【0019】

同定工程(d)は、コード化タグを解読する工程を含み、したがって、コード化タグの性質に従って選択される。核酸タグの場合、同定工程は、核酸（例えばDNA）を配列決定することを含む。

【0020】

化学構造は、（本明細書で定義される）小分子であってもよい。特定の実施形態では、構造は、いくつかの連結した部分構造から構成される。他の実施形態では、例えば非薬物適用のためのスクリーニングにおいて、化学構造は、（本明細書で定義される）大分子であり得る。

【0021】

(リンカー)

化学構造は、切断可能なリンカーによってコード化タグに（直接的または間接的に）放出可能に連結され得る。そのような実施形態において、切断可能なリンカーは、酵素的に切断可能なリンカー；求核性/塩基感受性リンカー；還元感受性リンカー；光切断可能なリンカー；求電子性/酸感受性リンカー；金属補助切断感受性リンカー；酸化感受性リン

10

20

30

40

50

カ－；および前出の2つまたはそれ以上の組合せから選択されるリンカ－を含み得る。

【0022】

化学構造は、核酸ハイブリダイゼーションによって、コード化タグに（直接的または間接的に）放出可能に連結され得る。そのような実施形態において、化学構造はまた、上記のように、切断可能なリンカ－によって、コード化タグに（直接的または間接的に）放出可能に連結され得る。

【0023】

好ましい実施形態では、切断可能なリンカ－はRNAを含み得、そのような実施形態では、工程（b）は、タグ付き化学構造をRNAs eと接触させることを含み得る。

【0024】

他の実施形態では、切断可能なリンカ－はペプチドを含み得、そのような実施形態では、工程（b）は、タグ付き化学構造をペプチダーゼと接触させることを含み得る。

【0025】

他の実施形態では、切断可能なリンカ－はDNAを含み得、そのような実施形態では、工程（b）は、タグ付き化学構造を部位特異的エンドヌクレアーゼと接触させることを含み得る。

【0026】

化学構造は、コード化タグに対し、（a）該コード化タグの核酸にハイブリダイズし；かつ（b）該化学構造にカップリングされている核酸によって放出可能に連結され得る。そのような実施形態では、ハイブリダイズする核酸は、上で定義されたような切断可能なリンカ－によって化学構造にカップリングされ得る。ここで、ハイブリダイズする核酸は、好ましくはRNAであり、その場合、工程（b）は、タグ付き化学構造をRNAs eと接触させることを含み得る。

【0027】

本発明の方法において、工程（b）は、化学構造にカップリングしつつコード化タグの核酸にハイブリダイズした核酸の脱ハイブリダイゼーション、例えば融解を含み得る。

【0028】

（ライプラリの微小区画）

工程（a）のコード化化学ライプラリは、n個のクローン集団のタグ付き化学構造を含み、各クローン集団がn個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められている。（a） $n > 10^3$ ；そのような実施形態では、（a） $n > 10^3$ ；または（b） $n > 10^4$ ；または（c） $n > 10^5$ ；または（d） $n > 10^6$ ；または（e） $n > 10^7$ ；または（f） $n > 10^8$ ；または（g） $n > 10^9$ ；または（h） $n > 10^{10}$ ；または（i） $n > 10^{11}$ ；または（j） $n > 10^{12}$ ；または（k） $n > 10^{13}$ ；（l） $n > 10^{14}$ ；または（m） $n > 10^{15}$ 。ライプラリ微小区画は、微小液滴、微小粒子および微小小胞から選択され得る。例えば、ビーズの形態の微小粒子ライプラリ微小区画が好ましい。

【0029】

タグ付き化学構造は、細胞ベースまたは表現型スクリーン（特に均一な細胞ベースの表現型アッセイ）を可能にするように、十分に高い濃度にてライプラリ微小区画で存在し得る。特定の実施形態では、タグ付き化学構造は、ライプラリ微小区画（1つまたは複数）中に、少なくとも0.1nM、0.5nM、1.0nM、5.0nM、10.0nM、15.0nM、20.0nM、30.0nM、50.0nM、50.0nM、75.0nM、0.1μM、0.5μM、1.0μM、5.0μM、10.0μM、15.0μM、20.0μM、30.0μM、50.0μM、75.0μM、100.0μM、200.0μM、300.0μM、500.0μM、1mM、2mM、5mMまたは10mMの濃度で存在し得る。

【0030】

他の実施形態では、タグ付き化学構造は、ライプラリ微小区画（1つまたは複数）中に、少なくとも0.1pM、0.5pM、1.0pM、5.0pM、10.0pM、15.0pM、20.0pM、30.0pM、50.0pM、75.0pM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、5.0nM、10.0nM、15.0nM、20.0nM、30.0nM

10

20

30

40

50

0 nM、50.0 nM、75.0 nM、0.1 μM、0.5 μM、1.0 μM、5.0 μM、10.0 μM、15.0 μM、20.0 μM、30.0 μM、50.0 μM、75.0 μM、100.0 μM、200.0 μM、300.0 μM、500.0 μM、1 mM、2 mM、5 mMまたは10 mMの濃度で存在し得る。

【0031】

他の実施形態では、タグ付き化学構造は、ライプラリ微小区画（1つまたは複数）中に、1 μM未満；1～100 μM；100 μMより多い；5～50 μMまたは10～20 μMの濃度で存在し得る。

【0032】

工程（c）の空間的な結び付けは、任意の適切な手段によって維持され得るが、好みの場合は、TCSとそのタグが空間的に近接して閉じ込められているような微小区画化である。（以下により詳細に記載されるように）微小液滴、微小粒子、マイクロウェル、マイクロアレイおよび微小胞を含む種々の微小区画を使用することによって、物理的閉じ込めを達成することができる。

【0033】

好みの局面において、工程（c）のタグはアッセイシステムから機能的または物理的に分離されている。これにより、アッセイ試薬によるタグの干渉が防止される。そのような実施形態では、タグは、上で定義されたように、ライプラリの微小区画内またはその上に分離され、隔離され、閉じ込められ、または配置され得る。

【0034】

（スクリーニング微小区画）

好みの実施形態では、ライプラリ微小区画のそれぞれは、工程（b）の前に、例えば、マイクロカプセル化、ピコインジェクションまたは微小液滴融合によって、個別のスクリーニング微小区画に配置され得る。スクリーニング微小区画は、任意の形態をとることができると、ハイスループットスクリーニングに適した形態が好みの。特に好みのは、微小液滴、マイクロウェルおよび/またはマイクロフルイディックチャネルから選択されるスクリーニング微小区画である。

【0035】

スクリーニング微小区画は、好みのは、（i）水性溶媒；および/または（i i i）ゲル化システム、例えばヒドロゲル、および/または（i i i）アッセイシステムと一緒に、ライプラリ微小区画を含む。

【0036】

スクリーニング微小区画は、好みに、ライプラリ微小区画が該ゲル化したスクリーニング微小区画内に固定化されるように、同定工程（d）前にゲル化され得るゲル化システムを含む。そのような実施形態では、ゲル化工程の後、同定工程（d）前に洗浄工程が行われ得、それによって、そうでなければ解読工程の信頼性を損なう可能性がある干渉の反応物/生成物を除去する。

【0037】

本発明の方法の工程（b）では、TCSは、スクリーニング微小区画中に放出され得、一方でタグは、（a）ライプラリ微小区画内または上に、例えば共有結合および/または水素結合によって、保持される；（b）ライプラリまたはスクリーニング微小液滴の表面で、官能基化された界面活性剤によって隔離される；または（c）アッセイシステムの構成要素によって隔離されている。

【0038】

本発明の方法は、そのタグから各化学構造を放出して、複数の遊離するタグなし化学構造（TCS）を生成する工程を含む。TCSは、好みには、拡散によって（例えば、ライプラリ微小区画から直接拡散によって）、スクリーニング微小区画中に放出される。

【0039】

スクリーニング工程（c）は、アッセイシステム、TCSのクローン集団、およびタグを含むライプラリ微小区画を含むスクリーニング用微小液滴内で行われ得る。

10

20

30

40

50

【0040】

(テンプレート化合物)

特定の実施形態では、コード核酸タグは、化学構造のテンプレートとして機能する。そのような実施形態では、タグ付き化学構造のライプラリは、化学構造の核酸テンプレート化、例えばDNAテンプレート化合物によって提供される。任意の適切なテンプレート化技術が使用され得、そして適切な技術は、例えば、Mannocci et al. (2011) *Chem. Commun.*, 47 : 12747-12753 ; Kleiner et al. (2011) *Chem Soc Rev.* 40(12) : 5707-5717 および Mullard (2016) *Nature* 530 : 367-369に記載されている。Pehr Harbury教授および共同研究者 (Stanford University、米国) によって開発されたDNA経路指定アプローチもまた適切である。DNAテンプレートは、任意の方法でパターン化 / 構成され得る。例えば、YoctoReactorシステムは、適切なドナー化学部分をコアアクセプター部位上に転移させることによってライプラリ合成を補助するために、3方向DNA - ヘアピンループ接合部を使用する (WO 2006 / 048025を参照のこと。この開示は参考により本明細書に援用される)。

10

【0041】

代替の構造幾何学もまた利用可能である：例えば、4方向DNAホリデイジャンクションおよび六角形構造 (Lundberg et al. (2008) *Nucleic acids symposium* (52) : 683-684によって記載されるような)、ならびにRothenmund (2006) *Nature* 440 : 297-302により概説される「スキヤフォールド化DNA折り紙」技術によって作成された複雑な形状およびパターン。

20

【0042】

(リアクタ微小区画)

コード核酸タグが化学構造のためのテンプレートとして機能する実施形態では、テンプレート化合物は、コード化核酸テンプレートを、必要に応じてPCRによって、増幅することを含む工程の前に行われ得る。この増幅工程は、リアクタ微小区画中で行われ得る。

【0043】

したがって、本発明は、以下のライプラリ合成を企図した：(a') (i) コード化テンプレートのクローニング集団；および(ii)複数の化学部分構造を含有するリアクタ微小区画を提供する工程；ならびに、次いで(b')部分構造が、核酸テンプレート化合物によって化学構造のクローニング集団を形成するように反応する条件下で、リアクタ微小区画内でテンプレートを部分構造と接触させる工程を含み、それにより、コード化テンプレートにハイブリダイズした化学構造のクローニング集団を含むリアクタ微小区画を生じさせる。

30

【0044】

そのような実施形態におけるリアクタ微小区画は、マイクロウェル、マイクロアレイ、マイクロフルイディックチャネル、微小粒子、微小小胞または微小液滴から選択され得る。微小液滴が好ましい。微小区画はヒドロゲルを含んでもよく、そのようなヒドロゲル含有微小区画の例は本明細書に記載されている。

【0045】

ここで、この方法は、(i)コード化テンプレートから化学構造を脱ハイブリダイズし、そして次いで(ii)リアクタ微小区画内で脱ハイブリダイズしたテンプレートを未反応の部分構造と、部分構造が核酸テンプレート化合物によって化学構造のさらなるクローニング集団を形成するように反応する条件下で接触させ、そして次いで(iii)工程(i)および(ii)を繰り返すことによって、化学構造の数を増幅させる工程をさらに含み得る。

40

【0046】

そのような実施形態では、化学構造が、リアクタ微小区画中に、少なくとも0.1nM、0.5nM、1.0nM、5.0nM、10.0nM、15.0nM、20.0nM、30.0nM、50.0nM、75.0nM、0.1μM、0.5μM、1.0μM、5.0μM、10.0μM、15.0μM、20.0μM、30.0μM、50.0μM、75.0μM、100.0μM、200.0μM、300.0μM、500.0μM、1

50

mM、2 mM、5 mMまたは10 mMの濃度で存在するまで、工程(i)および(ii)が繰り返され得る。従って、工程(i)および(ii)は、化学構造がリアクタ微小区画中に、1~100 μM、5~50 μMまたは10~20 μMの濃度で存在するまで繰り返され得る。

【0047】

本発明の方法の文脈においてテンプレート化合成は、化学構造にカップリングされた核酸とコード化タグテンプレートの核酸との間のハイブリダイゼーションを含んでいてよい。

【0048】

(既存の化学ライプラリのクローンタグ付け)

10

テンプレート化合成は、本発明の方法にとって必須の要件ではないが、タグ付き化学構造のライプラリは、任意の適切な手段によって提供され得る。たとえば、本発明による使用のためのライプラリは、化学構造のクローン集団を含んでもよく、工程(a)は、該クローン集団内で化学構造の各々にコード化タグを放出可能に連結する工程を含む。そのような実施形態における化学構造のクローン集団は、市販の化学ライプラリの要素であり得る。

【0049】

このような実施形態では、コード化タグは、核酸配列、例えばDNA配列を含み得る。タグは、複数の異なる架橋部位にて化学構造に放出可能に連結され得、それによって化学構造上の特定の部位(1つまたは複数)での架橋から生じるあらゆる有害な影響を軽減する。そのような実施形態では、コード化タグは、タグ付けが複数の異なる架橋部位で起こり得るように、複数の異なる架橋部位にて官能基化され得る。

20

【0050】

適切な核酸ベースのタグは市販されている(例えばTwist Bioscience Corporationから)が、それらは例えばWO2015/021080(その内容は参照により本明細書に援用される)に記載されているように合成してもよい。

30

【0051】

(標的細胞)

本発明は、表現型の細胞ベースのアッセイにおける特定の適用を見出す。

【0052】

従って、アッセイシステムは、均一水相アッセイシステムであり得、そしてスクリーニング工程(c)は、表現型スクリーンを含み得る。そのような実施形態では、アッセイシステムは、生存標的細胞を含み得る。そのような実施形態において、任意の細胞が使用され得、これは、原核細胞および真核細胞を含む。好適な原核細胞は、古細菌細胞を含み、例えば(a)クレン古細菌(Crenarchaeota);(b)ユーリ古細菌(Euryarchaeota);(c)コル古細菌(Korarchaeota);(d)ナノ古細菌(Nanoarchaeota)および(e)タウム古細菌(Thaumarchaeota)の門から選択され、例えばハロフェラックス・ウォルカニイ(Haloferax volcanii)およびスルフォロブス属種(Sulfolobus spp.)から選択される。

40

【0053】

本発明に従って標的細胞として使用するのに適した他の原核細胞は、細菌細胞を含む。そのような実施形態では、標的細胞は病原性細菌であり得る。他の細菌標的細胞は、グラム陽性細菌(例えば、エンテロコッカス・フェカリス(Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)およびスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus));グラム陰性細菌(例えば、クレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)、アシネットバクター・バウマニ(Acinetobacter baumannii)およびエシェリキア・コリ(Escherichia coli)、エシェリキア・コリST131株(E. coli ST131 strains)、シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)、エンテロバクター・クロアカ(Enterobacter cloacae)、エンテロバクター・アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)およびナイセリア・ゴノレア(Neisseria gonorrhoeae)

50

) ; および不確定のグラム反応を示す細菌から選択される細胞を含む。

【0054】

本発明の標的細胞として使用するのに適した真核細胞は、(a)真菌細胞；(b)哺乳類細胞；(c)高等植物細胞；(d)原虫細胞；(e)蠕虫細胞；(f)藻類細胞；(g)臨床組織サンプル、例えばヒト患者サンプルに由来する細胞および(h)無脊椎動物細胞を含む。

【0055】

適切な哺乳類細胞は、癌細胞(例えばヒト癌細胞)、筋肉細胞、ヒト神経細胞、および他の細胞(疾患関連表現型を示す生きているヒト患者に由来する)を含む。

【0056】

(標的タンパク質)

アッセイシステムは、単離された標的タンパク質または単離された標的タンパク質複合体を含み得る。例えば、標的タンパク質/タンパク質複合体は、細胞内標的タンパク質/タンパク質複合体であり得る。標的タンパク質/タンパク質複合体は、溶液中にあってもよいし、膜または膜貫通タンパク質/タンパク質複合体を構成してもよい。このような実施形態では、化学構造は、標的タンパク質/タンパク質複合体に結合するリガンドについてスクリーニングされ得る。リガンドは、標的タンパク質/タンパク質複合体のインヒビターであってもよい。

【0057】

アッセイシステムは、検出可能な標識を含むか、または生成し得る。そのような実施形態では、検出可能な標識は、上記のように、標的細胞または単離された標的タンパク質もしくは単離された標的タンパク質複合体に連結され得る。

【0058】

スクリーニング工程は、FADSおよび/またはFACSを含み得る。スクリーニング工程はまた、蛍光分析を含んでいてもよく、これは、FRET、Flim、フルオロフォアタグ付き抗体、フルオロフォアタグ付きDNA配列または蛍光染料分析を含むがこれらに限定されない。

【0059】

(配列ベースの構造活性分析)

本発明は、空間的に結び付けられているタグを解読することによってスクリーニングされたTCSを同定する工程を含む。タグが核酸配列を含む場合、解読工程は、核酸を配列決定することを含み得る。そのような実施形態では、方法は、複数の異なるスクリーニングされたTCSの配列を比較することをさらに含み得る。そのような工程の後に、スクリーニングされたTCSに関して配列-活性の関係の分析を実施する工程が続いてもよく、それはスクリーニングされたライプラリメンバの異なるケモタイプへの分類を可能にし得る。

【0060】

(ライプラリ)

別の局面において、本発明は、本発明の方法において使用するためのコード化化学ライプラリを提供し、このライプラリは、各々コード化タグに放出可能に連結された化学構造のn個のクローン集団を含み、各クローン集団は、n個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められている。

【0061】

ここで、化学構造は、例えば、切断可能なリンカーによっておよび/または核酸ハイブリダイゼーションによって、上記のようにコード化タグに連結され得る。

【0062】

別の局面において、本発明は、本発明の方法において使用するためのコード化化学ライプラリを提供し、このライプラリは、遊離する化学構造のn個のクローン集団を含み、各クローン集団は、n個の個別のライプラリ微小区画に閉じ込められ、該化学構造は、コード化タグと共に該微小区画内に含まれるが、該コード化タグに共有結合されていない。

10

20

30

40

50

【0063】

別の局面において、本発明は、本発明の方法で使用するためのアッセイ組成物を提供し、この組成物は、微小区画内に含まれる化学構造がアッセイシステムと接触される本発明のライプラリを含む。ここで、コード化タグは、アッセイシステムから機能的または物理的に分離され得る。例えば、化学構造は、アッセイシステムを含むライプラリ微小液滴内に含まれ得、そしてコード化タグは、ライプラリ微小液滴内にカプセル化された微小液滴、ビーズまたは微小小胞内または上に配置することができる。

【0064】

別の局面において、本発明は、本発明の方法において使用するための核酸コード化化学ライプラリリアクタを提供し、これは、(a) コード化核酸テンプレート分子のクローニング集団、および(b) 複数の化学部分構造を含む微小区画を含み、該部分構造が、核酸テンプレートアセンブリがコード化核酸タグ化化学構造を形成するように適合され、該コード化タグが該化学構造に放出可能に連結されている。

10

【0065】

本発明の他の態様および好ましい実施形態は、以下に示した他の特許請求の範囲において定義および説明されている。

【0066】

(発明の詳細な説明)

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、特許出願および他の参考文献は、全ての目的でそれらの全体が参照によって援用される。あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に示されているかのごとく、参照によりその引用した内容全体が援用される。

20

【0067】

(定義と全般の設定)

本明細書で使用される場合、そして他に具体的に示されない限り、以下の用語は、当該用語が当該技術分野において享受し得る任意のより広い(またはより狭い)意味に加えて、以下の意味を有することを意図する。

【0068】

文脈によって他に必要とされない限り、本明細書における単数形の使用は複数形を含むと解釈されるべきであり、逆もまた同様である。ある実体に関して使用される「1つの」という用語は、その実体の1つまたは複数を指すと読まれるべきである。そのように、用語「a」(または「a n」)、「1つまたはそれ以上」、および「少なくとも1つ」は、本明細書では互換的に使用される。

30

【0069】

本明細書で使用されるとき、用語「含む (comprise)」、または「含む (comprises)」または「含む (comprising)」などのその変形は、任意の列挙された整数 (integer) (例えば、特徴、要素、特質、特性、方法 / プロセス工程または制限) または整数のグループ (例えば、特徴、要素、特質、特性、方法 / プロセス工程または制限) の包含を示すと読まれるべきであるが、他の整数または整数のグループを排除するものではない。したがって、本明細書で使用されるとき、用語「含む (comprising)」は包括的または無制限であり、列挙されていない追加の整数または方法 / プロセス工程を排除するものではない。

40

【0070】

用語グラム陽性細菌とは、特定の細胞壁染色特性に基づいてグループ化された細菌の特定のクラスを定義する用語である。

【0071】

用語低G + Cグラム陽性細菌とは、DNAの塩基組成に基づいて、グラム陽性内に進化的に関連した細菌の特定のサブクラスのクラスを定義する用語である。サブクラスは、ストレプトコッカス属種 (Streptococcus spp.)、スタフィロコッカス属種 (Staphylococcus spp.)、リステリア属種 (Listeria spp.)、バチルス属種 (Bacillus spp.)、クロ

50

ストリジウム属種 (*Clostridium* spp.)、エンテロコッカス属種 (*Enterococcus* spp.) およびラクトバチルス属種 (*Lactobacillus* spp.) を含む。

【0072】

用語高 G + C グラム陽性細菌とは、DNA の塩基組成に基づいて、グラム陽性内に進化的に関連した細菌の特定のサブクラスのクラスを定義する技術用語である。サブクラスは、アクチノマイセス属種 (*Actinomyces* spp.)、アルスロバクター属種 (*Arthrobacter* spp.)、コリネバクテリウム属種 (*Corynebacterium* spp.)、フランキア属種 (*Frankia* spp.)、ミクロコッカス属種 (*Micrococcus* spp.)、ミクロモノスボラ属種 (*Micromonospora* spp.)、マイコバクテリウム属種 (*Mycobacterium* spp.)、ノカルディア属種 (*Nocardia* spp.)、プロピオニバクテリウム属種 (*Propionibacterium* spp.) およびストレプトミセス属種 (*Streptomyces* spp.) を含む放線菌科 (actinomycetes (放線菌(actinobacteria))) を含む。

10

【0073】

用語グラム陰性細菌とは、特定の細胞壁染色特性に基づいてグループ化された細菌の特定のクラスを定義する用語である。グラム陰性菌属の例は、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、アシネットバクター属 (*Acinetobacter*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*) および ナイセリア属 (*Neisseria*) を含む。

【0074】

本明細書で使用されるように、用語アッセイシステムとは、所望の活性を検出するための手段を規定する。アッセイシステムは、それが、ライプラリに存在し、所望の活性を有する化学構造と接触するかまたは反応すると、検出可能および / または測定可能なシグナルを直接的または間接的に生成する。所望の活性は、標的タンパク質結合、薬理学的活性、細胞受容体結合、抗生物質、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、駆虫剤、殺虫剤、薬理学的活性、免疫学的活性、所望の化合物の產生、化合物の產生増加または特定産物の分解であり得る。所望の活性は、薬理学的標的細胞、細胞のタンパク質または代謝経路に対する活性であり得る。所望の活性はまた、例えば 1 つまたはそれ以上の遺伝子の発現および / またはそれらの時間的もしくは空間的 (例えば組織特異的) 発現パターンを減少または増加させることによって、遺伝子発現を調節する能力であり得る。所望の活性は、例えば標的タンパク質に対するリガンドとして作用するための、結合活性であり得る。所望の活性はまた、種々の工業プロセスにおいて有用であるものであり得、これには、バイオレメディエーション、微生物増強石油回収、下水処理、食品製造、バイオ燃料生産、エネルギー生成、バイオ生産、バイオ消化 / 生分解、ワクチン生産およびプロバイオティクス生産が含まれる。それはまた、化学剤 (例えば、フルオロフォアまたは色素)、特定の化学反応、または色、マトリックス構造または屈折率変化に結びつくことができる任意の化学反応であってもよい。

20

30

【0075】

アッセイシステムは、化学的指標を含み得、これは、レポーター分子および検出可能な標識 (本明細書中で定義されるような) を含む。それは、例えば、比色 (すなわち、可視範囲の光を吸収する着色反応生成物をもたらす)、蛍光 (例えば、酵素が基質を反応生成物に変換し、この反応生成物は特定の波長の光によって励起されると蛍光を発することに基づく)、および / または発光 (例えば、生物発光、化学発光および / またはフォトルミネッセンスに基づく) であり得る。

40

【0076】

アッセイシステムは、細胞、例えば本明細書に記載のような標的細胞を含み得る。アッセイシステムはまた、タンパク質、例えば本明細書に記載のような標的タンパク質を含み得る。あるいは、またはさらに、アッセイシステムは、細胞画分、細胞成分、組織、組織抽出物、多タンパク質複合体、膜結合タンパク質膜画分および / またはオルガノイドを含み得る。

【0077】

50

本明細書で使用される用語リガンドとは、インビオでの生物学的標的分子に対する結合相手（例えば、酵素または受容体）を定義するために使用される。したがって、そのようなリガンドは、その結合の生理学的影響に関係なく、インビオで標的と結合する（または直接的に物理的に相互作用する）ものを含む。したがって、本発明のリガンドは、標的が一部を形成する細胞内シグナル伝達カスケードの一部として標的に結合し得る。あるいは、それらは細胞生理学の他のいくつかの局面の状況において標的と結合し得る。後者の場合、リガンドは、例えば、シグナル伝達カスケードを誘発することなく細胞表面で標的に結合し得、その場合、結合は細胞機能の他の局面に影響を及ぼし得る。したがって、本発明のリガンドは細胞表面および/または細胞内で標的に結合することができる。

【0078】

10

本明細書で使用する場合、用語小分子とは、1000Da以下、例えば、900Da未満、800Da未満、600Da未満、または500Da未満の分子量を有する任意の分子を意味する。好ましくは、本発明のライブラリ中に存在する化学構造は、本明細書中で定義されるような小分子、特に600Da未満の分子量を有する小分子であり得る。

【0079】

本明細書中で使用される場合、用語「大分子」は、1000Daより大きい分子量を有する任意の分子を意味する。

【0080】

20

本明細書中で使用される場合、用語抗体とは、全抗体（ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体（mAb）を含む）を定義する。この用語はまた、F(ab)、F(ab')、F(ab')²、Fv、Fc³および一本鎖抗体（およびそれらの組み合わせ）を含む抗体フラグメント（これらは、組換えDNA技術またはインタクトな抗体の酵素的もししくは化学的開裂によって製造され得る）をいうために本明細書で用いられる。用語「抗体」はまた、二重特異性または二機能性の抗体（これらは2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する合成ハイブリッド抗体である）を包含するために本明細書中で使用される。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含む、種々の方法によって製造することができる。キメラ抗体（1つまたはそれ以上の非ヒト可変抗体免疫グロブリンドメインにカップリングしたヒト定常抗体免疫グロブリンドメインを有する抗体、またはそのフラグメント）もまた「抗体」という用語に包含される。したがって、そのようなキメラ抗体は「ヒト化」抗体を含む。「抗体」という用語には、ミニボディ（WO 94/09817参照）、一本鎖Fv-Fc融合体、およびトランスジェニック動物によって産生されるヒト抗体も含まれる。「抗体」という用語には、多量体抗体およびタンパク質の高次複合体（例えばヘテロ二量体抗体）も含まれる。

30

【0081】

本明細書で使用する場合、用語ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質とは、ペプチド結合によって共有結合された2個またはそれ以上のアミノ酸を含む有機化合物を定義するために互換的に使用される。対応する形容詞的な用語「ペプチド性」は、それに応じて解釈されるべきである。ペプチドは構成アミノ酸の数に関して称され得、すなわち、ジペプチドは2個のアミノ酸残基を含有し、トリペプチドは3個を含有するなどである。10個以下のアミノ酸を含有するペプチドはオリゴペプチドと称され得る。10個より多いアミノ酸残基を有するものがポリペプチドである。そのようなペプチドはまた、修飾ならびにさらなるアミノ基およびカルボキシ基のいずれかを含んでもよい。

40

【0082】

本明細書で使用されるように、用語クリックケミストリーとは、高収量で、広い範囲で、クロマトグラフィーなしで除去することができる副生成物のみを生じ、立体特異的で、実行が簡単で、そして容易に除去可能または良性の溶媒中で行われる反応を表すために、2001年にSharplessによって導入された技術用語である。それ以来、化学と生物学の両方で幅広い用途で、多くの異なる形で実行されている。クリック反応のサブクラスは、周囲の生物学的環境に不活性な反応物を含む。このようなクリック反応は生体直交（bioorthogonal）と呼ばれる。生体直交クリックケミストリーに適した生体直交反応ペアは、以

50

下の特性を有する分子群である：（1）それらは相互に反応性であるが、細胞内環境において細胞生化学システムと有意に交差反応または相互作用しない；（2）それらまたはそれらの産物および副産物は、生理学的環境において安定であり、非毒性である；そして（3）それらの反応は非常に特異的で速い。反応性部分（またはクリック反応体）は、用いる特定のクリックケミストリーへの参照によって選択され得、そして当業者に知られている生体直交クリック反応体の広範な適合可能な対のいずれかが、本発明に従って使用され得、これは、逆電子要請型ディールス・アルダー環化付加反応（I E D D A）、ひずみ促進アルキンアジド環化付加（S P A A C）およびシュタウディンガーライゲーションを含む。

【0083】

10

用語単離されたとは、その材料が天然に存在するものとは異なる物理的環境に存在することを示すために、任意の材料（例えば、化合物、アッセイ試薬、標的タンパク質または標的細胞）に関して、本明細書で使用される。例えば、単離された細胞は、それらが天然に存在する複雑な組織環境に関して実質的に単離されたものであり得る（例えば精製されていてもよい）。単離された細胞は、例えば精製または分離されたものであってもよい。そのような場合、単離された細胞は、存在する全細胞型の少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%を占め得る。単離された細胞は、当業者に公知の通常の技術により得られ得、このような技術は、F A C S、密度勾配遠心分離、富化培養、選択培養、細胞選別およびパニング（表面タンパク質に対する固定化抗体を用いる）を含む。

20

【0084】

単離された材料が精製されるとき、純度の絶対レベルは重要ではなく、そして当業者は材料が置かれるべき用途に従って適切なレベルの純度を容易に決定することができる。しかしながら、少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100% w / w の純度レベルが好ましい。状況によっては、単離された材料は、他の成分を含み得る組成物（例えば、他の多くの細胞成分を含む多かれ少なかれ粗製の細胞抽出物）または緩衝系の一部を形成する。

【0085】

30

用語接触するとは、少なくとも2つの異なる部分またはシステム（例えば、化学構造およびアッセイシステム）が反応、相互作用または物理的接触するのに十分に近位になることを可能にするプロセスをいうために、本明細書において使用される。

【0086】

用語検出可能な標識とは、分光学的、蛍光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、電気化学的、無線周波数により、または任意の他の物理的手段により検出可能な部分を定義するために、本明細書において使用される。適切な標識としては、蛍光タンパク質、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、E L I S Aにおいて一般的に使用されるよう）、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプテン、および、（例えば、標的ペプチドと特異的に反応するペプチドまたは抗体に放射性または蛍光標識を取り込ませることによって）検出可能となるタンパク質または他の実体が挙げられる。

【0087】

40

本明細書で使用される場合、用語微小液滴とは、0.1 μm ~ 1 0 0 0 μm の直径を有し、かつ／または 5×10^{-7} pL と 5 0 0 nL との間の体積を有する、個別体積が小さな流体、液体又はゲルを定義する。典型的には、微小液滴は、1 0 0 0 μm 未満、例えば 5 0 0 μm 未満、5 0 0 μm 未満、4 0 0 μm 未満、3 0 0 μm 未満、2 0 0 μm 未満、1 0 0 μm 未満、5 0 μm 未満、4 0 μm 未満、3 0 μm 未満、2 0 μm 未満、1 0 μm 未満、5 μm 未満、または 1 μm 未満。したがって、微小液滴は、以下の直径を有する実質的に球形であり得る：（a）1 μm 未満；（b）1 0 μm 未満；（c）0.1 ~ 1 0 μm；（d）1 0 μm ~ 5 0 0 μm；（e）1 0 μm ~ 2 0 0 μm；（f）1 0 μm ~ 1 5 0 μm；（g）1 0 μm ~ 1 0 0 μm；（h）1 0 μm ~ 5 0 μm；または（i）約 1 0 0 μm。

50

【0088】

本発明の微小液滴は、典型的には、第二の流体、液体またはゲル（例えば、非混和性の液体又は気体）によって完全に囲まれている第一の流体、液体またはゲルの単離された部分から構成されている。いくつかの場合、液滴は、球形または実質的に球形であり得る。しかし、いくつかの場合、（例えば、外部環境によって、または本明細書に記載のアッセイおよびスクリーニングプロセス中の物理的操作の間に課される力のために）微小液滴は非球形で、不規則な形状を有してもよい。したがって、微小液滴は、（例えば、それらが周囲のマイクロチャネルの幾何学的形状に適合する状況において）実質的に円筒形、栓状、および/または橢円形であり得る。

【0089】

本明細書で使用される場合、用語微粒子とは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ 未満、例えば、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $400\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $300\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $40\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 未満、または $1\text{ }\mu\text{m}$ 未満の直径を有する粒子を定義する。マイクロ粒子は、好ましくは、非平面であり、そして以下の（または直径を有する実質的に球形である）最大寸法を有し得る：(a) $10\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ ；(b) $10\text{ }\mu\text{m} \sim 200\text{ }\mu\text{m}$ ；(c) $10\text{ }\mu\text{m} \sim 150\text{ }\mu\text{m}$ ；(d) $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ ；(e) $10\text{ }\mu\text{m} \sim 50\text{ }\mu\text{m}$ ；または(f) 約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 。したがって、微粒子は、本明細書で定義されるように微小液滴内にカプセル化され得る。微粒子は、硬質固体、軟質ゲル、多孔質固体、多孔質ゲルまたは硬質もしくは半硬質のフィブリルもしくは細管の網状組織もしくはマトリックスから形成され得る。

【0090】

本明細書中で使用される場合、用語ビーズとは、固体微粒子を定義するために使用される。好ましいビーズは、ゲル（アガロースなどのヒドロゲルを含む）から、例えばゲル化バルク組成物の断片化またはプレゲル化状態からの成形によって形成される。ビーズは、ストレプトアビシン、アミンまたは臭化シアンのような反応性基または部分で官能基化されていてもよい。あるいは、これらのビーズは、シリコン、ポリスチレン（PS）、架橋ポリ（スチレン/ジビニルベンゼン）（P[SVB]）、およびポリ（メチルメタクリレート）（PMMA）から作られるもののような固体支持体であり得る。

【0091】

用語微小小胞とは、リポソームのような内部容積を取り囲む外壁または膜を含む中空微小粒子を定義するために、本明細書において使用される。

【0092】

本発明の微小液滴、微小粒子および微小小胞は単分散性であり得る。用語単分散性とは、本発明による使用のため微小液滴および微小粒子に適用されると、 1.0 以下、 0.5 以下、および好ましくは 0.3 以下の液滴/粒子サイズ分散の係数を有する微小液滴/微小粒子の集団を定義する。係数は以下の式によって定義される：

$$= \left({}^{90}D_p - {}^{10}D_p \right) / {}^{50}D_p \quad (1)$$

ここで、 ${}^{10}D_p$ 、 ${}^{50}D_p$ 、および ${}^{90}D_p$ は、エマルジョンの相対累積粒子サイズ分布曲線から推定される累積度数がそれぞれ 10% 、 50% および 90% であるときの粒子サイズである。 $= 0$ の場合は、エマルジョン粒子の粒子サイズのばらつきが全くない理想的な状態を意味する。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語コード化タグとは、化学構造に関しては、化学構造またはその反応履歴をユニークに同定する情報を含み、それによりその特定の化学構造のユニークな識別子として機能する部分又は因子を定義するために使用される（すなわち、タグは、その構造を「コード化」し、分子「バーコード」として機能する）。情報は任意の形態でコード化され得るが、好ましい実施形態では、タグは、情報が核酸の配列にコード化されている核酸（例えばDNA）タグである。しかし、他のタグを使用してもよく、非DNAタグ、非RNAタグ、修飾核酸タグ、ペプチドタグ、光ベースのバーコード（例えば量子ドット）およびRFIDタグを含む。

10

20

30

40

50

【0094】

本明細書で使用される場合、化学構造に関して用語クローンとは、それぞれが共通のタグによってコード化される化学構造の集団を定義する。化学構造は、化学的に同一であってもよく、または化学構造をその同族のコード化タグにカップリングする切断可能なリンカーの性質および／または位置に関して（またはそのようなリンカーの切断後に残る痕に関して）のみ異なってもよい。

【0095】

本明細書で使用される場合、化学構造に適用される場合の用語遊離とは、固相に結合していない化学構造を定義するために使用される。いくつかの実施形態では、この用語は固相に共有結合していない化学構造を定義する。したがって、遊離化学構造は液相に入ってもよく、および／または溶液に入ってもよく、そしていくつかの実施形態では、アッセイシステムに存在する細胞によって結合および／または取り込まれてもよい。

10

【0096】

本明細書で使用される場合、用語マイクロウェル（本明細書で用語ウェルと互換的に使用される）とは、1 m l 未満の容積を有するチャンバをいう。n m範囲の寸法を有するマイクロウェルは、電子ビームリソグラフィーによって作製することができる（例えば、Od om et al. (2002) J. AM. CHEM. SOC. 124 : 12112-12113を参照のこと）。マイクロウェルは、典型的には、固体基板またはマイクロタイタープレート（マイクロプレート、マイクロウェルまたはマルチウォールプレートとも呼ばれる）上に配置され、これは、典型的には、小さな試験管として使用される複数の「ウェル」を有する平板の形をとる。マイクロプレートは、典型的には、2 : 3 の矩形マトリックスにて配置された 6、24、96、384 または 1536 のサンプルのマイクロウェルを有する。

20

【0097】

本明細書で使用される場合、用語自己犠牲リンカー（self-immolative linker）とは、自己犠牲化学基（本明細書では自己犠牲部分（self-immolative moiety）または「SIM」と呼ばれ得る）を含むリンカーを定義し、この自己犠牲化学基は、安定なタグ付き化学構造を形成するように化学構造およびそのコード化タグを直接的または間接的に（例えばペプチド部分を介して）共有結合することが可能であり、かつ化学構造の自発的放出を包含する機構により（例えば、脱離基の排除および遊離化学構造の放出につながる酵素切断により引き起こされる電子カスケードを介して）、化学構造からコード化タグを放出することが可能である。

30

【0098】

(微小区画)

本発明は、遊離化学構造とそのコード化タグとの間の空間的結び付けの維持を包含する。これは、好都合には、微小区画化によって達成される。それは、化学構造およびその対応するコード化タグを、それらが物理的に近接して維持される（すなわち、各化学構造は、そのコード化タグの1000 μm以内（例えば、500 μm、250 μm、100 μm、50 μm、25 μm、10 μmまたは1 μm以内）に配置される）ように、物理的に閉じ込めるプロセスである。以下に説明するように、物理的閉じ込めは、微小液滴、微小粒子、マイクロウェルおよび微小小胞を含む、種々の微小区画の使用を通じて達成することができる。物理的閉じ込めは、空間的に結び付けられたタグを解読することによって、スクリーニングヒットの化学構造の同定を可能にする。

40

【0099】

(微小液滴)

本発明による微小区画化での使用に適した微小液滴を調製および処理するための適切な材料および方法は、当業者の常識の一部を形成し、例えば、WO 2010 / 009365、WO 2006 / 040551、WO 2006 / 040554、WO 2004 / 002627、WO 2004 / 091763、WO 2005 / 021151、WO 2006 / 096571、WO 2007 / 089541、WO 2007 / 081385 および WO 2008 / 063227（それらの内容は参照により本明細書に援用される）に記載されている

50

。

【0100】

微小液滴のサイズは、カプセル化される化学構造およびアッセイシステムの性質を参照することによって選択される。微小液滴は、以下の直径を有する実質的に球状であり得る：(a) 1 μm 未満；(b) 10 μm 未満；(c) 0.1 ~ 10 μm；(d) 10 μm ~ 500 μm；(e) 10 μm ~ 200 μm；(f) 10 μm ~ 150 μm；(g) 10 μm ~ 100 μm；(h) 10 μm ~ 50 μm；または(f) 約100 μm。

【0101】

微小液滴は、好ましくは、サイズが均一であり、例えば、ライプラリ内の任意の液滴の直径が、同じライプラリ内の他の液滴の直径と比較した場合に5%、4%、3%、2%、1%または0.5%未満で変動する。いくつかの実施形態では、微小液滴は単分散性である。しかしながら、多分散性微小液滴も本発明に従って使用され得る。

【0102】

単一W/O型エマルジョンでは、キャリア液は、任意の水不混和性液体、例えば油であり得、必要に応じて以下から選択される：(a) 炭化水素油；(b) フルオロカーボン油；(c) エステル油；(d) シリコーンオイル；(e) 水相の生物学的成分に対する溶解度が低い油；(f) 微小液滴間の分子拡散を抑制する油；(g) 疎水性かつ疎油性の油；(h) 気体に対して良好な溶解性を有する油；および/または(i) 上記のうちの任意の2つ以上の組み合わせ。

【0103】

したがって、微小液滴は、W/Oエマルジョン中に含まれていてもよく、ここで微小液滴は、水性分散相を構成し、そしてキャリア液は連続油相を構成する。

【0104】

他の実施形態では、微小液滴はW/O/W二重エマルジョン中に含まれ、そしてキャリア液体は水性液体であり得る。そのような実施形態では、水性液体は、リン酸緩衝食塩水(PBS)であり得る。

【0105】

したがって、微小液滴は、微小液滴が(a)分散相として外側油殻に包まれた水性増殖培地の内側コアと(b)連続水相としてキャリア液とを含む、W/O/W二重エマルジョン中に含まれ得る。当然のことながら、O/W/O液滴は、非生物学的実体をスクリーニングするのに特に有用であり得ることも理解される。

【0106】

(界面活性剤)

微小液滴がエマルジョンに含まれる実施形態では、キャリア液が連続相を構成し、そして微小液滴が分散相を構成してもよく、そのような実施形態では、エマルジョンは界面活性剤および必要に応じて補助界面活性剤をさらに含んでもよい。

【0107】

界面活性剤および/または補助界面活性剤は、分散相と連続相との界面に位置してもよく、微小液滴がW/O/W二重エマルジョンに含まれる場合、界面活性剤および/または補助界面活性剤は、水性コアと油殻との界面、ならびに油殻と外側の連続相との界面に配置され得る。

【0108】

広範囲の適切な界面活性剤が利用可能であり、そして当業者は選択されたスクリーニングパラメーターに従って適切な界面活性剤(および必要ならば補助界面活性剤)を選択することができる。例えば、適切な界面活性剤は、Bernath et al. (2004) *Analytical Biochemistry* 325 : 151-157; Holtze and Weitz (2008) *Lab Chip* 8(10) : 1632-1639; および Holtze et al. (2008) *Lab Chip*. 8(10):1632-1639に記載される。他の適切な界面活性剤(特にフッ素界面活性剤を含む)は、WO 2010 / 009365 および WO 2008 / 021123(それらの内容は参照により本明細書に援用される)に記載されている。

【0109】

10

20

30

40

50

界面活性剤（1つまたは複数）および／または補助界面活性剤（1つまたは複数）は、単一のW／O型エマルジョンが使用される実施形態において界面活性剤（1つまたは複数）および／または補助界面活性剤（1つまたは複数）が水性成長媒体微小液滴と連続（例えば油）相との界面に存在し得るように、W／O界面に組み込まれることが好ましい。同様に、二重W／O／W型エマルジョンが本発明による共カプセル化に使用される場合、界面活性剤（1つまたは複数）および／または補助界面活性剤（1つまたは複数）は、水性コアと不混和性（例えば油）の殻との間の界面、および油殻と連続水相との間の界面の一方または両方に存在し得る。

【0110】

界面活性剤（1つまたは複数）は、好ましくは生体適合性である。例えば、界面活性剤（1つまたは複数）は、スクリーンに使用される任意の細胞に対して非毒性であるように選択され得る。選択された界面活性剤（1つまたは複数）はまた、気体に対して良好な溶解度を有し得、これは任意のカプセル化細胞の増殖および／または生存能力に必要であり得る。

10

【0111】

生体適合性は、任意の適切なアッセイによって決定することができ、このようなアッセイは、細胞レベルでの生体適合性の代用としての役割を果たす、参照の感受性生化学的アッセイ（例えばインビトロ翻訳）との適合性についての試験に基づくアッセイを含む。例えば、蛍光性基質（フルオレセインジ- - D - ガラクトピラノシド（FDG））を有する酵素 - ガラクトシダーゼをコードするプラスミドDNAのインビトロ翻訳（IVT）が、生体適合性の指標として使用され得る。これは、例えば、カプセル化されたDNA、転写および翻訳に関与する分子、ならびに翻訳されたタンパク質が液滴界面に吸着せずにタンパク質の高次構造がなおインタクトである場合に、蛍光産物が形成されるためである。

20

【0112】

生体適合性はまた、界面活性剤の存在下でアッセイに使用される細胞を増殖させ、抗体または生存細胞染料で細胞を染色し、そして界面活性剤の非存在下での対照と比較した細胞集団の全体的な生存率を決定することによって決定され得る。

【0113】

界面活性剤（1つまたは複数）はまた、微小液滴界面での生体分子の吸着を防止し得る。界面活性剤はまた、個々の微小液滴（および対応する微小培養物）を単離するように機能し得る。界面活性剤は、好ましくは、微小液滴を安定化する（すなわちその合体を防止する）。安定化性能は、例えば位相差顕微鏡、光散乱、集束ビーム反射率測定、遠心分離および／またはレオロジーによってモニタリングすることができる。

30

【0114】

界面活性剤はまた、アッセイシステムの機能的部分を形成し得、そして、例えば、反応物および／または分析物および／またはアッセイ中に存在する他の部分（放出タグなど）を他の構成要素から分離または隔離するように作用し得る。例えば、官能基化界面活性剤の親水性頭部基中のニッケル錯体は、表面にヒスチジンタグ付きタンパク質を濃縮し得る（例えば、Kreutz et al. (2009) J Am Chem Soc. 131(17) : 6042-6043を参照のこと）。そのような官能基化界面活性剤は、小分子合成用の触媒としても作用し得る（例えば、Theberge et al. (2009) Chem. Commun. : 6225-6227を参照のこと）。それらは細胞溶解を引き起こすためにも使用され得る（例えば、Clausell-Tormos et al. (2008) Chem Biol. 15(5) : 427-37を参照のこと）。したがって、本発明はそのような官能基化界面活性剤の使用を企図する。

40

【0115】

（エマルジョン共カプセル化に使用するための油）

不連続相と不混和性である任意の液体が本発明に従って使用するための微小液滴エマルジョンの形成に使用され得ることが理解されるが、この不混和性の流体は、典型的には油である。

50

【0116】

好ましくは、水相の生物学的成分に対して低い溶解度を有する油が選択される。他の好ましい機能的特性は、気体に対する調整可能な（例えば、高いまたは低い）溶解度、微小液滴間の分子拡散を阻害する能力、および／または疎水性と疎油性の組み合わせを含む。油は炭化水素油、例えば、軽鉱油、フルオロカーボン油、シリコーン油、またはエステル油であり得る。上記油の2種またはそれ以上の混合物もまた好ましい。

【0117】

適切な油の例は、WO 2010/009365、WO 2006/040551、WO 2006/040554、WO 2004/002627、WO 2004/091763、WO 2005/021151、WO 2006/096571、WO 2007/089541、WO 2007/081385およびWO 2008/063227（これは参照により本明細書に援用される）に記載されている。

10

【0118】

（微小液滴乳化プロセス）

広範囲の異なる乳化方法が当業者に知られており、それらのいずれも本発明の微小液滴を作製するために使用することができる。

【0119】

多くの乳化技術は、液滴崩壊を促進するためにしばしば乱流を使用して、バルクプロセスにおいて2つの液体を混合することを含む。そのような方法は、ボルテックス、超音波処理、均質化またはそれらの組み合わせを含む。

20

【0120】

乳化に対するこれらの「トップダウン」アプローチでは、個々の液滴の形成に対する制御はほとんど利用できず、典型的には広い範囲の微小液滴サイズの分布が生じる。代替の「ボトムアップ」アプローチは個々の液滴のレベルで機能し、そしてマイクロ流体デバイスの使用を含み得る。例えば、エマルジョンは、T字形接合部で油流と水流とを衝突させることによってマイクロ流体装置内で形成することができ、得られる微小液滴は各流れの流速に応じて大きさが変化する。

【0121】

本発明に従って使用するための微小液滴を製造するための好ましい方法は、フローフォーカシングを含む（例えば、Anna et al. (2003) *Appl. Phys. Lett.* 82(3) : 364-366に記載されているように）。ここでは、分散相（集束した流体またはコア流体）に隣接するまたはそれを取り囲む連続相流体（集束する流体またはシース流体）は、両方の流体が押し出されるオリフィスの近傍で液滴の破壊を引き起こす。フローフォーカシング装置は、連続的な集束流体供給源で加圧された圧力チャンバからなる。内側に、1つまたはそれ以上の集束した流体が、圧力チャンバを外部の周囲環境と連結する小さなオリフィスの前に、先端が開いている毛細管供給チューブを通して注入される。集束する流体流は流体メニスカスを尖端に成形し、オリフィスを通してチャンバを出る定常的なマイクロまたはナノジェットを生じさせる。噴流の大きさは出口オリフィスよりずっと小さい。毛細管不安定性は定常ジェットを均質な液滴または気泡に分解する。

30

【0122】

供給管は、2つまたはそれ以上の同心針から構成されてもよく、そして異なる不混和性の液体または気体が注入されて化合物滴をもたらし得る。フローフォーカシングは、ジェットが分裂したときに毎秒最大数百万の液滴の極めて高速で制御された生成を確実とする。

40

【0123】

他のマイクロ流体処理技術がピコインジェクションを含み、この技術では、試薬が電場を用いて水性液滴に注入される（例えば、Eastburn et al. (2013) *Picoinjection Enables Digital Detection of RNA with Droplet RT-PCR*. *PLoS ONE* 8(4) : e62961. doi:10.1371/journal.pone.0062961を参照のこと）。微小液滴が、例えば電気融合によって能動的に（例えば Tan and Takeuchi (2006) *Lab Chip.* 6(6) : 757-63を参照のこと）、または

50

受動的に（例えばSimon and Lee (2012) 「Microdroplet Technology」, in Integrated Analytical Systems pp 23-50, 10.1007/978-1-4614-3265-4_2に概説されるように）、融合されて2つの試薬を一緒にすることができる。

【0124】

全ての場合において、選択された微小液滴形成プロセスの性能は、位相差顕微鏡、光散乱、集束ビーム反射率測定、遠心分離および/またはレオロジーによってモニタリングすることができる。

【0125】

(蛍光活性化液滴ソーティング)

本明細書で説明するように、本発明の方法は、スクリーニングアッセイを微量の媒体中に個別の微小液滴の形態で区画化することを含むので、ハイスループットスクリーニングに適している。これにより、各微小液滴を別個の培養容器として扱うことが可能になり、確立された微小流体および/または細胞選別方法論を用いて多数の個々の液体共培養物を迅速にスクリーニングすることができる。

10

【0126】

したがって、同時カプセル化工程に続いて、得られた微小液滴は、十分に確立された蛍光活性化セルソーティング（細胞選別）（FACS）装置およびプロトコルを適合させることによって選別することができる。この技術は、蛍光活性化液滴ソーティング（FADS）と呼ばれており、例えば、Baret et al. (2009) Lab Chip 9 : 1850-1858に記載されている。蛍光部分を使用することによって検出することができるあらゆる変化をスクリーニングすることができる。

20

【0127】

標的細胞はFADSを可能にするために蛍光標識することができる。種々の蛍光タンパク質をこの目的のための標識として使用することができ、蛍光タンパク質としては、例えば、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の野生型緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Chalfie et al. 1994, Science 263:802-805)、および修飾 GFP (Heim et al. 1995, Nature 373:663-4; PCT公開WO 96/23810) が挙げられる。あるいは、DNA2.0のIP-Free(c)合成非Aequorea蛍光タンパク質が、異なる蛍光タンパク質コード配列の供給源として使用でき、これは、PCRによって增幅することができるかまたは隣接するBsaI制限部位を使用して容易に切り出して選択した任意の他の発現ベクターにクローニングすることができる。

30

【0128】

このタイプのレポーター遺伝子の転写および翻訳は、細胞内の蛍光タンパク質の蓄積をもたらし、それによりそれらはFADSに適するようになる。

【0129】

あるいは、細胞内で特定のレベルおよび条件で蛍光を発する広範囲の色素が利用可能である。例としては、Molecularプローブ (Thermo Scientific) から入手可能なものが挙げられる。あるいは、細胞成分は、抗体を用いて検出することができ、これらは、市販のキットを使用して、種々のフルオロフォアで染色することができる。同様に、DNA配列は、フルオロフォアで標識して細胞に導入することができ、そして細胞中の相補的DNAおよびRNA配列へのハイブリダイゼーションによって付着し、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) と呼ばれるプロセスにおける遺伝子発現の直接検出を可能とする。

40

【0130】

現在のハイコンテンツクリーニングにおいて適用することができる任意の標識化処理が、FADSに適用することができ、対照に対する蛍光シグナルの変化として検出され得る。

【0131】

(タグテンプレート化合成)

コード化タグは、DNAテンプレート化技術を利用することによってコード化化学構造

50

の合成を指向させるテンプレートとして機能し得る。適切な技術は当業者に知られており、そして例えば Mannocci et al. (2011) *Chem. Commun.*, 47 : 12747-12753 ; Kleiner et al. (2011) *Chem Soc Rev.* 40(12) : 5707-5717; およびMullard (2016) *Nature* 530 : 367-369 (それらの開示は参考により本明細書に援用される) に記載されている。したがって、任意の適切なテンプレート化技術を使用し得、この技術としては、David Liu教授およびその共同研究者 (Harvard University、米国) によって記載され、後にEnsemble Discovery (Cambridge、MA、米国) によって商品化されているDNAテンプレート化合成 (DTS) に基づくものが挙げられる。ここでは、化学反応は、ワトソン・クリック塩基対合を介してDNA結合試薬を近接させることによって促進される。

【0132】

Pehr Harbury教授とその共同研究者 (Stanford University、米国) によって開発されたDNAルーティングアプローチ、およびViperGen (コペンハーゲン、デンマーク) によって開発されたYoctoReactorシステムも適している。後者のアプローチでは、三方DNAヘアピンループ接合が、コアアクセプター部位上に適当なドナー化学的部分を転移させることによって、ライブラリ合成を補助する (WO 2006 / 048025を参照のこと。この開示は参考により本明細書に援用される)。代替の構造配置もまた利用可能であり、例えば、四方DNAホリデイジャンクションおよび六方晶構造 (Lundberg et al. (2008) *Nucleic acids symposium* (52) : 683-684に記載のような)、およびRothemund (2006) *Nature* 440 : 297-302によって概説される「スキヤフォールドDNA折り紙」技術によって作出された複雑な形状およびパターンがある。

10

20

30

40

【0133】

近接トリガー反応は、例えば、クリックケミストリー (本明細書で定義されるような) の使用により促進され得る。

【0134】

(タグ配列決定)

任意の適切な配列決定技術を使用することができ、これは、サンガー配列決定を含むが、次世代配列決定 (NGS) と呼ばれる配列決定の方法およびプラットフォーム (ハイスクループット配列決定としても知られる) が好ましい。本発明の方法に使用するのに適した多くの市販のNGS配列決定プラットフォームがある。合成による配列決定 (SBS) ベースの配列決定プラットフォームが特に適している。IlluminaTMシステム (数百万の比較的短い配列読み取り (54、75または100bp) を生じる) が特に好ましい。

30

40

【0135】

他の適切な技術は、IlluminaTMにより販売されているものを含む、可逆的ダイターミネーターに基づく方法を含む。ここでは、DNA分子が最初にスライド上のプライマーに付着され、そして局所クローンコロニーが形成されるように増幅される (ブリッジ増幅)。4種類のddNTPが添加され、そして取り込まれなかったヌクレオチドが洗い流される。バイロシーケンシングとは異なり、DNAは一度に1ヌクレオチドのみ伸長され得る。カメラが蛍光標識されたヌクレオチドの画像を撮り、次いで末端の3'プロッカーと共に染料をDNAから化学的に除去し、次のサイクルを可能にする。

50

【0136】

短い配列読み取りが可能な他のシステムには、SOLiDTMおよびIon Torrent技術 (どちらも Thermo Fisher Scientific Corporationによって販売されている) が含まれる。SOLiDTM技術はライゲーションによる配列決定を採用している。ここでは、固定長の全ての可能なオリゴヌクレオチドのプールが、配列決定された位置に従って標識される。オリゴヌクレオチドはアニールされそしてライゲートされる。配列を一致させるためのDNAリガーゼによる優先的ライゲーションは、その位置でヌクレオチドの情報となるシグナルをもたらす。配列決定の前に、DNAはエマルジョンPCRによって増幅される。得られたビーズは、それぞれ同じDNA分子のコピーのみを含み、ガラススライド上に置かれる。その結果、Illuminaのシーケンシングに匹敵する量と長さの配列が得られる。

【0137】

Ion Torrent Systems Inc. は、標準的な配列決定化学を使用することを基本としたシステムを開発したが、新しい半導体ベースの検出システムを伴う。この配列決定方法は、他の配列決定システムで使用されている光学的方法とは対照的に、DNA の重合中に放出される水素イオンの検出に基づいている。配列決定されるべきテンプレート DNA 鎖を含むマイクロウェルは、単一の種類のヌクレオチドであふれている。導入されたヌクレオチドが主要なテンプレートヌクレオチドと相補的である場合、それは成長している相補鎖に組み込まれる。これは水素イオンの放出を引き起こし、それが過敏性イオンセンサーを誘発し、それは反応が起こったことを示す。ホモポリマー反復がテンプレート配列に存在する場合、複数のヌクレオチドが単一のサイクルに組み込まれる。これは、対応する数の放出される水素および比例して高くなる電子信号をもたらす。

10

【0138】

核酸または他の高分子がナノスケールの細孔を通過し、特定のイオン電流の変化または電気信号が生じる場合、Oxford Nanopore Technologiesによって使用されるもののような方法または類似の方法がそれを同定するために用いられる。例えば、オリゴヌクレオチドの個々の塩基は、連続した塩基がオリゴヌクレオチドの一部としてまたは連続した切断工程後に単一のヌクレオチドとしてイオン孔を通過するかが同定され得る。

【0139】

(切断可能なリンカー)

以下の条件で、任意の切断可能なリンカーが、化学構造およびそのコード化タグを連結するために使用され得る：(a) その連結は、タグのコード情報を無傷のままとするように破壊ができる、かつ (b) コード化された化学構造は、スクリーンにおけるその活性がリンカー切断後に残る「痕」によって損なわれないように、それが完全にまたは実質的にリンカー残基を含まない形態で放出される。-OH および / または -SH 基のようないくつかのリンカー「痕」は許容され得ることが理解される。切断の方法は、アッセイシステムと適合性があることが好ましい。

20

【0140】

広範囲の適切な切断可能なリンカーが当業者に知られており、そして適切な例は、Leriche et al. (2012) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (2) : 571-582 によって記載されている。したがって適切なリンカーは以下を含む：酵素的に切断可能なリンカー；求核性 / 塩基感受性リンカー；還元感受性リンカー；光切断可能なリンカー；求電子性 / 酸感受性リンカー；金属補助切断感受性リンカー；酸化感受性リンカー；および前出の 2 つまたはそれ以上の組合せから選択されるリンカー。

30

【0141】

酵素切断可能なリンカーは、例えば、以下に記載されている：WO 2017 / 089894；WO 2016 / 146638；US 2010273843；WO 2005 / 112919；WO 2017 / 089894；de Groot et al. (1999) *J. Med. Chem.* 42 : 5277；de Groot et al. (2000) *J. Org. Chem.* 43 : 3093 (2000)；de Groot et al. (2001) *J. Med. Chem.* 44 : 8815；WO 02 / 083180；Carl et al. (1981) *J. Med. Chem. Lett.* 24 : 479；Studer et al. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3 (5) : 424-429；Carl et al. (1981) *J. Med. Chem.* 24 (5) : 479-480 および Dubowchik et al. (1998) *Bioorg & Med. Chern. Lett.* 8 : 3347。これらは、以下から選択される酵素によって切断可能なリンカーを含む：-グルクロニダーゼ、リソソーム酵素、TEV、トリプシン、トロンビン、カテーテン B、B および K、カスパーーゼ、マトリックスマタロプロテイナーゼ配列、リン酸ジエステル、リン脂質、エステルおよび -ガラクトース。求核性 / 塩基感受性リンカーは、以下を含む：ジアルキルジアルコキシシラン、シアノエチル基、スルホン、エチレングリコールジスクシネット、2 - N - アクリルニトロベンゼンスルホンアミド、-チオフェニルエステル、不飽和ビニルスルフィド、スルホンアミド、マロンジアルデヒドイソドール誘導体、レブリノイルエステル、ヒドラジン、アシリヒドラゾン、アルキルチオエステル。還元切断可能リンカーは、以下を含む：ジスルフィド架橋およびアゾ化合物。放射線切断可能リンカーは、以下を含む：2 - ニトロベンジル誘導体、フェナシルエステ

40

50

ル、8-キノリニルベンゼンスルホネート、クマリン、ホスホトリエステル、ビス-アリールヒドラゾン、ビマンビチオプロピオン酸誘導体。求電子性 / 酸切断可能リンカーは、以下を含む：パラメトキシベンジル誘導体、tert-ブチルカルバメートアナログ、ジアルキルまたはジアリールジアルコキシシラン、オルトエステル、アセタール、アコニチル、ヒドラジン、-チオプロピオネート、ホスホロアミダイト、イミン、トリチル、ビニルエーテル、ポリケタール、アルキル2-(ジフェニルホスフィノ)安息香酸誘導体。有機金属 / 金属触媒切断可能リンカーは、以下を含む：アリルエステル、8-ヒドロキシキノリンエステルおよびピコリン酸エステル。酸化により切断可能なリンカーは、以下を含む：ビシナルジオールおよびセレン化合物。

【0142】

10

特定の実施形態において、切断可能なリンカーは、共有結合および非共有結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーションから生じる水素結合）の組み合わせを含む。

【0143】

切断可能な（例えば、酵素で切断可能な）ペプチドリンカーは、1アミノ酸、またはアミノ酸のジペプチドもしくはトリペプチド配列からなるペプチド部分を含み得る。アミノ酸は、天然および非天然アミノ酸から選択され得、そして各場合において、側鎖の炭素原子がDまたはL（RまたはS）のいずれかの配置であり得る。例示的なアミノ酸は、以下を含む：アラニン、2-アミノ-2-シクロヘキシル酢酸、2-アミノ-2-フェニル酢酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システィン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、-アミノ酪酸、-ジメチル-アミノ酪酸、-ジメチル-アミノ酪酸、オルニチン、およびシトルリン（Citr）。適当なアミノ酸はまた、側鎖の反応性官能基が保護されている上記アミノ酸の保護形態を含む。そのような保護アミノ酸は、アセチル、ホルミル、トリフェニルメチル（トリチル）、およびモノメトキシトリチル（MMT）で保護されたリジンを含む。他の保護されたアミノ酸ユニットは、トシリルまたはニトロ基で保護されたアルギニンおよびアセチルまたはホルミル基で保護されたオルニチンを含む。

20

【0144】

30

（自己犠牲リンカー）

本発明における切断可能なリンカーとしての使用に特に適しているのは、以下を含む自己犠牲リンカーである：（a）切断部分；および（b）自己犠牲部分（「SIM」）。

【0145】

そのようなリンカーは、図8（遊離化学構造を放出させる切断後のSIMの自発的除去を示す）に模式的に示されるように使用され得る。

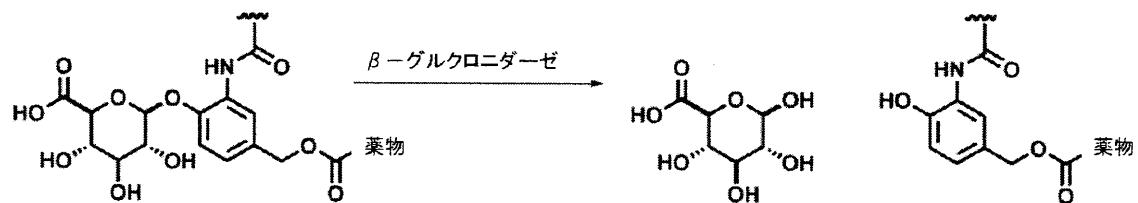
【0146】

40

以下を含む自己犠牲リンカーが、特に適している：（a）酵素的切断部分；および（b）SIM。そのような実施形態では、酵素的切断部分は、（プロテアーゼによる切断可能な）ペプチド配列または非ペプチドの酵素的に切断可能な基であり得、例えば、-グルクロニダーゼにより切断可能な親水性糖基を取り込むグルクロニド部分（McCombs and Owen (2015) Antibody Drug Conjugates : Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry The AAPS Journal 17(2) : 339-351に説明するような）であり、以下に示す：

【0147】

【化1】

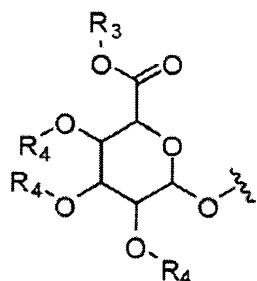


【0148】

適切な - グルクロニド系リンカーは、WO 2007/011968、U.S. 20170189542 および WO 2017/089894 (その内容は参照により本明細書に援用される) に記載されている。したがって、そのようなリンカーは、以下の式を有し得る:

【0149】

【化2】



10

20

【0150】

(式中、R₃ は水素またはカルボキシル保護基であり、各 R₄ は独立して水素またはヒドロキシル保護基である)。

【0151】

本発明における使用のための自己犠牲リンカーの S I M は、以下から選択され得る: 置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換および非置換のアリールまたは置換および非置換のヘテロアリール。したがって適切な S I M は、p - アミノベンジルアルコール (PAB) ユニットおよび PAB 基と電子的に類似している芳香族化合物 (例えば、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237 によって記載されている 2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体) およびオルト - またはパラ - アミノベンジルアセタールを含む。

30

【0152】

他の適切な S I M は、アミド結合加水分解の際に環化を受けるもの、例えば Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2: 223 によって記載されている置換および非置換の 4 - アミノ酪酸アミドである。さらに他の適切な S I M は、適切に置換されたビシクロ [2.2.1] およびビシクロ [2.2.2] 環系 (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815 によって記載されているような) および種々の 2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド (例えば、Amsberry et al. (1990) J. Org. Chem. 55: 5867 を参照のこと) を含む。

40

【0153】

切断部分としてペプチドを含む自己犠牲ペプチドリンカーが、特に適している。図 9 および図 10 は、そのようなリンカーを用いたコード化化学ライブラリの構築および使用を示す。ここで、切断可能なペプチドは、ジペプチドのバリン - シトルリンであり、そして S I M は、p - アミノベンジルアルコール (PAB) である。そのような実施形態では、アミド結合 PAB の酵素切断は、二酸化炭素の 1, 6 - 脱離および遊離化学構造の同時放出を引き起こす。図 9 にまた示されるように、コード化タグおよび化学構造 (1 つまたは

50

複数)はビーズを介して連結され得、そして単一のビーズに複数($n > 1$)の化学構造を装填することができる(例えば、コード化タグ(1つまたは複数)と連結される化学構造との比が、1:10~1:1000である)。そのような実施形態では、ペプチドリンカーが比較的小さいサイズであることによって拡散速度の向上およびより高いビーズへの装填が可能となり、化学構造は官能基化のために単一のアミンを必要とするのみである。

【0154】

本発明の自己犠牲リンカーとして使用するのに適した切断部分およびS I Mの非限定的な例は、例えば、以下に記載されている: WO 2017/089894; WO 2016/146638; US 2010273843; WO 2005/112919; WO 2017/089894; de Groot et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 5277; de Groot et al. (2000) J Org. Chem. 43: 3093 (2000); de Groot et al., (2001) J Med. Chem. 66: 8815; WO 02/083180; Carl et al. (1981) J Med. Chem. Lett. 24: 479; Studer et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3 (5): 424-429; Carl et al. (1981) J. Med. Chem. 24 (5): 479-480およびDubowchik et al. (1998) Bioorg & Med. Chern. Lett. 8: 3347(その内容は参照により本明細書に援用される)。

【0155】

(微粒子)

微粒子は、固体またはゲルから形成され得る。適切なゲルとしては、ポリマーゲル、例えば、ポリサッカライドまたはポリペプチドゲル(これらは、例えば、加熱、冷却またはpH調整によって液体からゲルに固化することができる)が挙げられる。適切なゲルとしては、ヒドロゲルが挙げられ、これはアルギン酸塩、ゼラチンおよびアガロースゲルを含む。他の適切な微粒子材料としては、シリコン、ガラス、金属およびセラミックのような無機材料が挙げられる。他の適切な材料としては、以下が挙げられる: プラスチック(例えば、ポリ(塩化ビニル、シクロオレフィンコポリマー、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ナイロンおよびポリビニルブチレート)。

【0156】

(標的細胞)

本発明のアッセイシステムは標的細胞を含み得る。任意の適切な標的細胞が使用され得、原核細胞および真核細胞を含む。

【0157】

例えば、標的細胞は古細菌であり得、例えば(a)クレン古細菌(Crenarchaeota);(b)ユーリ古細菌(Euryarchaeota);(c)コル古細菌(Korarchaeota);(d)ナノ古細菌(Nanoarchaeota)および(e)タウム古細菌(Thaumarchaeota)の門から選択され、例えばハロフェラックス・ウォルカニイ(Haloferax volcanii)またはスルフォオブス属種(Sulfolobus spp.)である。

【0158】

他の実施形態では、標的細胞は細菌、例えば病原性細菌であり得る。このような場合において、細菌は、グラム陽性細菌(例えば、エンテロコッカス・フェカーリス(Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)およびスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)から選択される)、グラム陰性細菌(例えば、クレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)、アシネットバクター・バウマニ(Acinetobacter baumanii)およびエシェリキア・コリ(Escherichia coli)、エシェリキア・コリST131株(E. coli ST131 strains)、シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)、エンテロバクター・クロアカ(Enterobacter cloacae)、エンテロバクター・エロゲネス(Enterobacter aerogenes)およびナイセリア・ゴノレア(Neisseria gonorrhoeae)から選択される)、または不確定なグラム反応を示す細菌であり得る。

【0159】

10

20

20

30

40

40

50

他の実施形態では、標的細胞は、真核細胞であり得、例えば、以下から選択される：(a) 真菌細胞；(b) 哺乳類細胞；(c) 高等植物細胞；(d) 原虫細胞；(e) 蠕虫細胞；(f) 藻類細胞；または(h) 無脊椎動物細胞。そのような実施形態では、標的細胞は、癌細胞、例えば、ヒト癌細胞、筋細胞、ヒト神経細胞および疾患関連表現型を示す生きているヒト患者に由来する他の細胞であり得る。

【0160】

細胞が真核細胞（例えば、ヒト細胞）である場合、細胞は、以下から選択され得る：全能性細胞、多能性細胞、人工多能性細胞、多分化能細胞、オリゴ能細胞、幹細胞、胚性幹（ES）細胞、体細胞、生殖細胞系細胞、最終分化型細胞、非分裂（有糸分裂後）細胞、有糸分裂細胞、初代細胞、細胞株由来細胞および腫瘍細胞。

10

【0161】

細胞は、好ましくは、単離されており（すなわち、その天然の細胞／組織環境に存在していない）、かつ／または代謝的に活性である（例えば、細胞生存率および／または活性を維持するかつ／または細胞成長または増殖を支持するための培養培地または輸送培地とともにアッセイシステムに存在している）。

【0162】

適切な真核細胞は、生物から単離され得、例えば、以下から選択される生物における：後生動物、真菌（例えば、酵母）、哺乳動物、非哺乳動物、植物、原生動物、蠕虫、藻類、昆虫（例えば、ハエ）、魚（例えば、ゼブラフィッシュ）、両生類（例えばカエル）、鳥類、無脊椎動物および脊椎動物。

20

【0163】

適切な真核細胞はまた、以下から選択される非ヒト動物から単離され得る：哺乳動物、げっ歯類、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ラット、マウス、非ヒト靈長類およびハムスター。他の実施形態では、細胞は、非ヒト疾患モデル、または異種遺伝子（例えば治療産物をコードする異種遺伝子）を発現するトランスジェニック非ヒト動物から単離され得る。

【0164】

（標的細胞としての細菌）

本発明に従って使用するための標的細胞は、細菌細胞であり得る。そのような実施形態では、細菌は、以下から選択され得る：(a) グラム陽性細菌、グラム陰性細菌および／またはグラム可変細菌；(b) 芽胞形成細菌；(c) 非芽胞形成細菌；(d) 糸状菌；(e) 細胞内細菌；(f) 偏性好気性菌；(g) 偏性嫌気性菌；(h) 通性嫌気性菌；(i) 微好気性細菌および／または(f) 日和見性細菌性病原体。

30

【0165】

特定の実施形態では、本発明による使用のための標的細胞は、以下の属の細菌から選択され得る：アシネットバクター属 (Acinetobacter)（例えば、アシネットバクター・バウマニ (A. baumannii)）；エロモナス属 (Aeromonas)（例えば、エロモナス・ハイドロフィラ (A. hydrophila)）；バチルス属 (Bacillus)（例えば、バチルス・アントラシス (B. anthracis)）；バクテロイデス属 (Bacteroides)（例えば、バクテロイデス・フラギリス (B. fragilis)）；ボルデテラ属 (Bordetella)（例えば、ボルデテラ・パーツシス (B. pertussis)）；ボレリア属 (Borrelia)（例えば、ボレリア・ブルグドルフェリ (B. burgdorferi)）；ブルセラ属 (Brucella)（例えば、ブルセラ・アボルツス (B. abortus)、ブルセラ・カニス (B. canis)、ブルセラ・メリテンシス (B. melitensis) およびブルセラ・スイス (B. suis)）；バーグホルデリア属 (Burkholderia)（例えば、バーグホルデリア・セバシア・コンプレックス (B. cepacia complex)）；カンピロバクター属 (Campylobacter)（例えば、カンピロバクター・ジェジュニ (C. jejuni)）；クラミジア属 (Chlamydia)（例えば、クラミジア・トラコマチス (C. trachomatis)、クラミジア・スイス (C. suis) およびクラミジア・ムリダルム (C. muridarum)）；クラミドフィラ属 (Chlamydophila)（例えば、（例えば、クラミドフィラ・ニューモニエ (C. pneumoniae)、クラミドフィラ・ペコルム (C. pecorum)、クラミドフィラ・シッタシ (C.

40

50

psittaci)、クラミドフィラ・アボルタス (*C. abortus*)、クラミドフィラ・フェリス (*C. felis*) およびクラミドフィラ・カビエ (*C. caviae*)) ; シトロバクター属 (*Citrobacter*) (例えば、シトロバクター・フレンディ (*C. freundii*)) ; クロストリジウム属 (*Clostridium*) (例えば、クロストリジウム・ボツリヌム (*C. botulinum*)、クロストリジウム・デフィシル (*C. difficile*)、クロストリジウム・パークリンジエンス (*C. perfringens*) およびクロストリジウム・テタニ (*C. tetani*)) ; コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) (例えば、コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*) およびコリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*)) ; エンテロバクター属 (*Enterobacter*) (例えば、エンテロバクター・クロアカ (*E. cloacae*) およびエンテロバクター・アエロゲネス (*E. aerogenes*)) ; エンテロコッカス属 (*Enterococcus*) (例えば、エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) およびエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*)) ; エシェリキア属 (*Escherichia*) (例えば、エシェリキア・コリ (*E. coli*)) ; フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*) ; フランシセラ属 (*Francisella*) (例えば、フランシセラ・ツラレンシス (*F. tularensis*)) ; フソバクテリウム属 (*Fusobacterium*) (例えば、フソバクテリウム・ネクロフォルム (*F. necrophorum*)) ; ヘモフィルス属 (*Haemophilus*) (例えば、ヘモフィルス・ソムナス (*H. somnus*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*H. influenzae*) およびヘモフィルス・パラインフルエンザ (*H. parainfluenzae*)) ; ヘリコバクター属 (*Helicobacter*) (例えば、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*)) ; クレブシエラ属 (*Klebsiella*) (例えば、クレブシエラ・オキシトカ (*K. oxytoca*) およびクレブシエラ・ニューモニエ (*K. pneumoniae*))、レジオネラ属 (*Legionella*) (例えば、レジオネラ・ニューモフィラ (*L. pneumophila*)) ; レプトスピラ属 (*Leptospira*) (例えば、レプトスピラ・インテロガンス (*L. interrogans*)) ; リステリア属 (*Listeria*) (例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*)) ; モラクセラ属 (*Moraxella*) (例えば、モラクセラ・カタラーリス (*M. catarrhalis*)) ; モルガネラ属 (*Morganella*) (例えば、モルガネラ・モルガニイ (*M. morganii*)) ; マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*) (例えば、マイコバクテリウム・レブラエ (*M. leprae*) およびマイコバクテリウム・ツベルクロシス (*M. tuberculosis*)) ; マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*) (例えば、マイコプラズマ・ニューモニエ (*M. pneumoniae*)) ; ナイセリア属 (*Neisseria*) (例えば、ナイセリア・ゴノレア (*N. gonorrhoeae*) およびナイセリア・メンインジティディス (*N. meningitidis*)) ; パスツレラ属 (*Pasteurella*) (例えば、パスツレラ・ムトルシダ (*P. multocida*)) ; ペプトストレプトコッカス属 (*Peptostreptococcus*) ; プレボテーラ属 (*Prevotella*) ; プロテウス属 (*Proteus*) (例えば、プロテウス・ミラビリス (*P. mirabilis*) およびプロテウス・ブルガリス (*P. vulgaris*)) ; シュードモナス属 (*Pseudomonas*) (例えば、シュードモナス・エルギノーサ (*P. aeruginosa*)) ; リケッチャ属 (*Rickettsia*) (例えば、リケッチャ・リケッチ (*R. rickettsii*)) ; サルモネラ属 (*Salmonella*) (例えば、血清型チフス菌および非チフス型 (serotypes . Typhi および *Typhimurium*)) ; セラチア属 (*Serratia*) (例えば、セラチア・マルセッセンス (*S. marcesens*)) ; シゲラ属 (*Shigella*) (例えば、シゲラ・フレクスナリア (*S. flexnaria*)、シゲラ・ディセンテリエ (*S. dysenteriae*) およびシゲラ・ソンネ (*S. sonnei*)) ; スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*) (例えば、スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・ヘモリティカス (*S. haemolyticus*)、スタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S. epidermidis*) およびスタフィロコッカス・サプロフィティカス (*S. saprophyticus*)) ; ステノトロホモナス属 (*Stenotrophomonas*) (例えば、ステノトロホモナス・マルトフィリア (*S. maltophilia*)) ; ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) (例えば、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*S. agalactiae*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*S. mutans*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) およびストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*) ; トレポネーマ属 (*Treponema*) (例えば、トレポネーマ・パリドム (*T. pallidum*) ; ビブリオ属 (*Vibrio*) (例えば、ビブリオ・コレラ (*V. cholerae*)) ならびにエルシニア

10

20

30

40

50

属 (*Yersinia*) (例えば、エルシニア・ペスティス (*Y. pestis*))。

【 0 1 6 6 】

本発明に従って使用するための標的細胞は、高 G + C グラム陽性細菌から、および低 G + C グラム陽性細菌から選択することができる。

【 0 1 6 7 】

(標的細胞としての病原菌)

ヒトまたは動物の細菌性病原体としては、以下のような細菌が挙げられる：レジオネラ属種 (*Legionella* spp.) 、リステリア属種 (*Listeria* spp.) 、シュードモナス属種 (*Ps eudomonas* spp.) 、サルモネラ属種 (*Salmonella* spp.) 、クレブシエラ属種 (*Klebsiella* spp.) 、ハフニア属種 (*Hafnia* spp.) 、ヘモフィルス属種 (*Haemophilus* spp.) 、プロテウス属種 (*Proteus* spp.) 、セラチア属種 (*Serratia* spp.) 、シゲラ属種 (*Shigella* spp.) 、ビブリオ属種 (*Vibrio* spp.) 、バチルス属種 (*Bacillus* spp.) 、カンピロバクター属種 (*Campylobacter* spp.) 、エルシニア属種 (*Yersinia* spp.) 、クロストリジウム属種 (*Clostridium* spp.) 、エンテロコッカス属種 (*Enterococcus* spp.) 、ナイセリア属種 (*Neisseria* spp.) 、ストレプトコッカス属種 (*Streptococcus* spp.) 、スタフィロコッカス属種 (*Staphylococcus* spp.) 、マイコバクテリウム属種 (*Mycobacterium* spp.) 、エンテロバクター属種 (*Enterobacter* spp.) 。

10

【 0 1 6 8 】

(標的細胞としての真菌)

本発明に従って使用するための標的細胞は真菌細胞であり得る。これらとしては、酵母 (例えば、カンジダ (*Candida*) 種 (カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*) 、カンジダ・クルセイ (*C. krusei*) およびカンジダ・トロピカリス (*C. tropicalis*) を含む) 、ならびに糸状菌 (アスペルギルス属種 (*Aspergillus* spp.) およびペニシリウム属種 (*Penicillium* spp.) など) 、および皮膚糸状菌 (白癬菌属種 (*Trichophyton* spp.) など) が挙げられる。

20

【 0 1 6 9 】

(標的細胞としての植物病原体)

本発明に従って使用するための標的細胞は、植物病原体であり得、例えば、シュードモナス属種 (*Pseudomonas* spp.) 、キシレラ属種 (*Xylella* spp.) 、ラルストニア属種 (*Ralstonia* spp.) 、キサントモナス属種 (*Xanthomonas* spp.) 、エルウィニニア属種 (*Erwinia* spp.) 、フザリウム属種 (*Fusarium* spp.) 、フィトフトラ属種 (*Phytophthora* spp.) 、ボトリチス属種 (*Botrytis* spp.) 、レプトスフェリア属種 (*Leptosphaeria* spp.) 、うどんこ病 (子囊菌門 (*Ascomycota*)) および錆 (担子菌門 (*Basidiomycota*)) 。

30

【 0 1 7 0 】

(標的としての癌細胞)

癌細胞を標的細胞として使用することができる。そのような細胞は、細胞株または原発腫瘍に由来し得る。癌細胞は哺乳動物であり得、そして好ましくはヒトである。特定の実施形態では、癌細胞は、黒色腫、肺、腎臓、結腸、前立腺、卵巣、乳房、中枢神経系および白血病細胞株からなる群より選択される。

40

【 0 1 7 1 】

適切な癌細胞株としては、限定されないが、以下が挙げられる：卵巣癌細胞株 (例えば、CaOV-3、OVCA-R-3、ES-2、SK-OV-3、SW626、TOV-21G、TOV-112D、OV-90、MDA-H2774 および PA-1) ；乳癌細胞株 (例えば、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-361、MDA-MD-453、BT-474、Hs578T、HCC1008、HCC1954、HCC38、HCC1143、HCC1187、HCC1395、HCC1599、HCC1937、HCC2218、Hs574.T、Hs742.T、Hs605.T および Hs606) ；肺癌細胞株 (例えば、NCI-H2126、NCI-H1395、NCI-H1437、NCI-H2009、NCI-H1672、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-HI-184、NCI-H209、NCI-H210)

50

7 および N C I - H 1 2 8) ; 皮膚癌細胞株 (例えば、 C O L O 8 2 9 、 T E 3 5 4 . T 、 H s 9 2 5 . T 、 W M - 1 1 5 および H s 6 8 8 (A) . T) ; 骨癌細胞株 (例えば、 H s 9 1 9 . T 、 H s 8 2 1 . T 、 H s 8 2 0 . T 、 H s 7 0 4 . T 、 H s 7 0 7 (A) . T 、 H s 7 3 5 . T 、 H s 8 6 0 . T 、 H s 8 8 8 . T 、 H s 8 8 9 . T 、 H s 8 9 0 . T および H s 7 0 9 . T) ; 結腸癌細胞株 (例えば、 C a c o - 2 、 D L D - 1 、 H C T - 1 1 6 、 H T - 2 9 および S W 4 8 0) ; および胃癌細胞株 (例えば R F - I) 。本発明の方法において有用な癌細胞株は、任意の便利な供給源 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) および国立がん研究所を含む) から得られ得る。

【 0 1 7 2 】

他の癌細胞株としては、新生細胞 / 新生物に罹患している被験体に由来するものが挙げられ、増殖性障害、良性、前癌および悪性新生物、過形成、化生、および異形成を含む。増殖性障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：癌、癌転移、平滑筋細胞増殖、全身性硬化症、肝硬変、成人呼吸窮迫症候群、特発性心筋症、紅斑性狼瘡、網膜症 (例えば糖尿病性網膜症) 、心臓過形成、良性前立腺肥大症、卵巣嚢胞、肺線維症、子宮内膜症、線維腫症、腺腫、リンパ管腫症、サルコイドーシスおよびデスマトイド腫瘍。平滑筋細胞増殖を伴う新生物は、血管系における細胞の過剰増殖 (例えば、内膜平滑筋細胞過形成、再狭窄および血管閉塞 (特に生物学的または機械的に媒介された血管損傷 (例えば、血管形成術) 後の狭窄を含む)) を含む。さらに、内膜平滑筋細胞過形成は、血管系以外の平滑筋における過形成 (例えば、胆管、気管支気道の閉塞、および腎間質性線維症患者の腎臓における過形成) を含み得る。非癌性増殖性障害としては、皮膚中の細胞の過剰増殖 (乾癬およびその多様な臨床形態など) 、ライター症候群、毛孔性紅色粋糠疹、ならびに角化障害の過増殖性変形 (日光角化症、老人性角化症および強皮症を含む) も挙げられる。

【 0 1 7 3 】

(標的としての細胞株)

細胞株に由来する他の細胞が、標的細胞として使用され得る。そのような細胞 (好ましくは、ヒトまたは哺乳動物であり得る) は、検出可能な細胞表現型を有する希少疾患に罹患している患者からのものを含む。細胞は任意の種類のものであり得、血球、免疫細胞、骨髄細胞、皮膚細胞、神経組織および筋肉細胞を含むがこれらに限定されない。

【 0 1 7 4 】

本発明の方法において有用な細胞株は、任意の便利な供給源 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) と国立がん研究所を含む) から得られ得る。

【 0 1 7 5 】

細胞 / 細胞株は、例えば、リソソーム蓄積症、筋ジストロフィー、囊胞性線維症、マルファン症候群、鎌状赤血球貧血、小人症、フェニルケトン尿症、神経線維腫症、ハンチントン病、骨形成不全症、サラセミアおよびヘモクロマトーシスに罹患している被験体に由来し得る。

【 0 1 7 6 】

細胞 / 細胞株は、例えば、他の疾患に罹患している被験体に由来し得、このような疾患として、以下の疾患および障害が挙げられる：血液、凝固、細胞増殖および調節不全、新生物 (癌を含む) 、炎症過程、免疫系 (自己免疫疾患を含む) 、代謝、肝臓、腎臓、筋骨格系、神経系、神経および眼の組織。例示的な血液および凝固疾患および障害としては、以下が挙げられる：貧血、裸リンパ球症候群、出血性障害、H 因子欠乏症、H 因子様 1 因子、V 因子、V I I I I 因子、V I I 因子、X 因子、X I 因子、X I I I 因子、X I I I A 因子、X I I I B 因子、ファンコニ貧血、血球貪食性リンパ組織球増加症、血友病 A 、血友病 B 、出血性障害、白血球欠乏症、鎌状赤血球貧血およびサラセミア。

【 0 1 7 7 】

免疫関連疾患および障害の例としては、以下が挙げられる：A I D S ；自己免疫性リンパ増殖性症候群；複合免疫不全；H I V - 1 ；H I V の感受性または感染；免疫不全および重症複合免疫不全 (S C I D) 。本発明に従って治療することができる自己免疫疾患と

10

20

30

40

50

しては、以下が挙げられる：グレープ病、慢性関節リウマチ、橋本甲状腺炎、尋常性白斑、I型（早期発症）糖尿病、悪性貧血、多発性硬化症、糸球体腎炎、全身性狼瘡E（SLE、狼瘡）およびシェーグレン症候群。他の自己免疫疾患としては、以下が挙げられる：強皮症、乾癬、強直性脊椎炎、重症筋無力症、天疱瘡、多発性筋炎、皮膚炎、ブドウ膜炎、ギランバレー症候群、クローン病および潰瘍性大腸炎（しばしばまとめて炎症性腸疾患（IBD）と呼ばれる）。

【0178】

他の例示的な疾患としては、以下が挙げられる：アミロイドニュロパシー；アミロイドーシス；囊胞性線維症；リソソーム蓄積症；肝腺腫；肝不全；神経障害；肝リバーゼ欠乏症；肝芽腫、癌または癌腫；骨髄囊胞性腎臓病；フェニルケトン尿症；多囊胞腎；または肝疾患。

10

【0179】

例示的な筋骨格系疾患および障害としては、以下が挙げられる：筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌおよびベッカー筋ジストロフィー）、骨粗鬆症および筋萎縮症。

【0180】

例示的な神経系および神経の疾患および障害としては、以下が挙げられる：ALS、アルツハイマー病；自閉症；脆弱X症候群、ハンチントン病、パーキンソン病、統合失調症、セクレターゼ関連障害、トリヌクレオチドリピート障害、ケネディ病、フリードリヒ失調症、マカド・ジョセフ病、脊髄小脳失調症、筋緊張性ジストロフィーおよび歯状尿管淡蒼球萎縮症（DRPLA）。

20

【0181】

例示的な眼疾患としては、以下が挙げられる：加齢黄斑変性症、角膜混濁およびジストロフィー、先天性扁平角膜、緑内障、レーバー先天性黒内障および黄斑ジストロフィー。

【0182】

細胞／細胞株は、例えば、少なくとも部分的には、タンパク質恒常性の欠乏により仲介される疾患に罹患している被験体に由来し得、タンパク質恒常性の欠乏は、集合性のおよびミスフォールディングのタンパク質恒常性疾患を含み、特に神経変性疾患（例えばパーキンソン病、アルツハイマー病およびハンチントン病）、リソソーム蓄積症、糖尿病、肺気腫、癌および囊胞性線維症を含む。

30

【0183】

（標的細胞としての古細菌）

標的細胞は、古細菌であり得、例えば、（a）クレン古細菌（Crenarchaeota）；（b）ユーリ古細菌（Euryarchaeota）；（c）コル古細菌（Korarchaeota）；（d）ナノ古細菌（Nanoarchaeota）および（e）タウム古細菌（Thaumarchaeota）の門から選択され、例えばハロフェラックス・ウォルカニイ（Haloferax volcanii）またはスルフォロブス属種（Sulfolobus spp.）である。

【0184】

典型的な古細菌属としては、以下が挙げられる：アキディアヌス属（Acidianus）、アキディロブス属（Acidilobus）、アキドコックス属（Acidococcus）、アキデュリプロファンダム属（Aciduliprofundum）、エロビュルム属（Aeropyrum）、アルカエオグロブス属（Archaeoglobus）、バキロビリダエ属（Bacillloviridae）、カルディスパエラ属（Caldisphaera）、カルディビルガ属（Caldivirga）、カルドコックス属（Caldococcus）、ケナルカエウム属（Cenarchaeum）、デスルフロコックス属（Desulfurococcus）、フェログロブス属（Ferroglobus）、フェロプラズマ属（Ferroplasma）、ゲオーゲンマ属（Geogemma）、ゲオグロブス属（Geoglobus）、ハルアダプタトウス属（Haladaptaus）、ハルアルカリコックス属（Halalkalicoccus）、ハロアルカロピリウム属（Haloalcalophilum）、ハロアルクラ属（Haloarcula）、ハロバクテリウム属（Halobacterium）、ハロバクルム属（Halobaculum）、ハロビフォルマ属（Halobiforma）、ハロコックス属（Halococcus）、ハロフェラックス属（Haloferax）、ハロゲオメトリクム属（Halogeometricum）、ハロミクロビウム属（Halomicrombium）、ハロピゲル属（Halopiger）、ハロプラヌス属（Ha

40

50

loplanus)、ハロクアドラトゥム属(Haloquadratum)、ハロラブダス属(Halorhabdus)、ハロルブルム属(Halorubrum)、ハロサルキナ属(Halosarcina)、ハロシンプレクス属(Halosimplex)、ハロスタグニコラ属(Halostagnicola)、ハロテッリゲナ属(Haloterrigena)、ハロヴィヴァックス属(Halovivax)、ヒュペルテルムス属(Hyperthermus)、イグニコックス属(Ignicoccus)、イグニスパエラ属(Ignisphaera)、メタッロスパエラ属(Metallosphaera)、メタニミクロコックス属(Methanimicrococcus)、メタノバクテリウム属(Methanobacterium)、メタノブレヴィバクテル属(Methanobrevibacter)、メタノカルカルス属(Methanocalculus)、メタノカルドコックス属(Methantxaldoctor)、メタノケッラ属(Methanocella)、メタノコッコイデス属(Methanococcoides)、メタノコックス属(Methanococcus)、メタノコルpusクルム属(Methanocorpusculum)、メタノクッレウス属(Methanoculleus)、メタノフォリス属(Methanofollis)、メタノゲニウム属(Methanogenium)、メタノハロビウム属(Methanohalobium)、メタノハロビルス属(Methanohalophilus)、メタノラキニア属(Methanolacinia)、メタノロブス属(Methanolobus)、メタノメチユロウォランス属(Methanomethylovorans)、メタノミクロビウム属(Methanomicrobium)、メタノプランス属(Methanoplanus)、メタノピュルス属(Methanopyrus)、メタノレグラ属(Methanoregula)、メタノサエタ属(Methanosaeta)、メタノサルスム属(Methanosalsum)、メタノサルキナ属(Methanosarcina)、メタノスパエラ属(Methanospaera)、メタノスピリルム属(Methanospirillum)、メタノテルモバクター属(Methanothermobacter)、メタノテルモコックス属(Methanothermococcus)、メタノテルムス属(Methanothermus)、メタノトリクス属(Methanothrix)、メタノトトリス属(Methanotorris)、ナノアーケウム属(Nanoarchaeum)、ナトリアルバ属(Natrialba)、ナトリネマ属(Natrinema)、ナトロノバクテリウム属(Natronobacterium)、ナトロノコックス属(Natronococcus)、ナトロノリムノビウス属(Natronolimnobia)、ナトロノモナス属(Natronomonas)、ナトロノルブルム属(Natronorubrum)、ニトロソブミルス属(Nitracopumilus)、パレオコックス属(Palaeococcus)、ピクロフィルス属(Picrophilus)、ピュロバクルム属(Pyrobaculum)、ピュロコックス属(Pyrococcus)、ピュロディクティウム属(Pyrodictium)、ピュロロブス属(Pyrolobus)、スタピュロテルムス属(Staphylothermus)、ステッテリア属(Stetteria)、ステギオロブス属(Stygiolobus)、スルフォロブス属(Sulfolobus)、スルフォポボコックス属(Sulfophobococcus)、スルフリスパエラ属(Sulfurisphaera)、テルモクラディウム属(Thermocladium)、テルモコックス属(Thermococcus)、テルモディスクス属(Thermodiscus)、テルモフィルム属(Thermofilum)、テルモプラズマ属(Thermoplasma)、テルモプロテウス属(Thermoproteus)、テルモスパエラ属(Thermosphaera)およびアルカニサエタ属(Vulcanisaeta)。

【0185】

典型的な古細菌種としては、以下が挙げられる：アエロピュルム・ペルニクス(Aeropyrum pernix)、アルカエオグロブス・フルギドウス(Archaeglobus fulgidus)、アルカエオグロブス・フルギドウス(Archaeglobus fulgidus)、デスルフロコックス属種TOK(Desulforcoccus species TOK)、メタノバクテリウム・テルモオートロピクム(Methanobacterium thermoautrophicum)、メタノコックス・ヤンナスキイ(Methanococcus jannaschii)、ピュロバクルム・アエロフィルム(Pyrobaculum aerophilum)、ピュロバクルム・カリディフォンティス(Pyrobaculum calidifontis)、ピュロバクルム・イスラニディクム(Pyrobaculum islandicum)、ピュロコックス・アビッシ(Pyrococcus abyssi)、ピュロコックスGB-D(Pyrococcus GB-D)、ピュロコックス・グリコウォランス(Pyrococcus glycovorans)、ピュロコックス・ホリコシイ(Pyrococcus horikoshii)、ピュロコックス属種GE23(Pyrococcus spp. GE23)、ピュロコックス属種ST700(Pyrococcus spp. ST700)、ピュロコックス・ウォエセイ(Pyrococcus woesii)、ピュロディクティウム・オクルトゥム(Pyrodictium occultum)、スルフォロブス・アキドカルダリウム(Sulfolobus acidocaldarium)、スルフォロブス・ソラタリクス(Sulfolobus solataricus)、スルフォロブス・トコダリイ(Sulfolobus tokodaii)、テルモコ

ックス・アグレガヌス (*Thermococcus aggregans*)、テルモコックス・バロッシイ (*Thermococcus barossii*)、テルモコックス・ケレル (*Thermococcus celer*)、テルモコックス・フミコランス (*Thermococcus fumicola*s)、テルモコックス・ゴルゴナリウス (*Thermococcus gorgonarius*)、テルモコックス・ヒュドロテルマリス (*Thermococcus hydrothermalis*)、テルモコックス・オニュリネウス N A 1 (*Thermococcus onnurineus* NA1)、テルモコックス・パシフィクス (*Thermococcus pacificus*)、テルモコックス・プロフンドウス (*Thermococcus profundus*)、テルモコックス・シキュリ (*Thermococcus siculi*)、テルモコックス属種 G E 8 (*Thermococcus* spp. GE8)、テルモコックス属種 J D F - 3 (*Thermococcus* spp. JDF-3)、テルモコックス属種 T Y (*Thermococcus* spp. TY)、テルモコックス・チオレデュケンス (*Thermococcus thioreducens*)、テルモコックス・ジリグチ (*Thermococcus zilligti*)、テルモプラズマ・アキドフィルム (*Thermoplasm a acidophilum*)、テルモプラズマ・ヴォルカニウム (*Thermoplasma volcanium*)、アキディアヌス・ホスピタリス (*Acidianus hospitalis*)、アキディロブス・サカロボランス (*Acidilobus sacharovorans*)、アキドゥリプロフンドウム・ブーネイ (*Aciduliprofundum boonei*)、アエロピュルム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*)、アルカエオグロブス・フルギドウス (*Archaeoglobus fulgidus*)、アルカエオグロブス・プロフンドウス (*Archaeoglobus profundus*)、アルカエオグロブス・ベネフィクス (*Archaeoglobus veneficus*)、カルディビルガ・マキリンゲンシス (*Caldivirga maquilingensis*)、コラルカエウム・クリプトフィルム (暫定) (*Candidatus Korarchaeum cryptofilum*)、メタノレグラ・ブーネイ (暫定) (*Candidatus Methanoregula boonei*)、ニトロソアルカエウム・リムニア (暫定) (*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*)、ケナルカエウム・シュンビオスム (*Cenarchaeum symbiosum*)、デスルフロコックス・カンチャトケンシス (*Desulfurococcus kamchatkensis*)、フェログロブス・プラキドウス (*Ferroglobus placidus*)、フェロプラズマ・アシダルマヌス (*Ferroplasma acidarmanus*)、ハルアルカリコックス・イエトガリ (*Halalkalicoccus jeotgali*)、ハロアルクラ・ヒスパニカ (*Haloarcula hispanica*)、ハロアルクラ・マリスモルツイ (*Haloarcula marismortui*)、ハロバクテリウム・サリナルム (*Halobacterium salinarum*)、ハロバクテリウム属種 (*Halobacterium species*)、ハロビフォルマ・ラシサルシ (*Halobiforma lucisalsi*)、ハロフェラックス・ウォルカニイ (*Haloferax volvanii*)、ハロゲオメトリクム・ボリンクエンス (*Halogeometricum borinquense*)、ハロミクロビウム・ムコハタエイ (*Halomicromium mukohataei*)、ハロピリック・アルカセオン種 D L 3 1 (*halophilic archaeon* sp. DL31)、ハロピゲル・ザナデュエンシス (*Halopiger xanaduensis*)、ハロクアドラトウム・ワルスピイ (*Haloquadratum walsbyi*)、ハロラブドウス・ティアマテア (*Halorhabdus tiama tea*)、ハロラブドウス・ウタヘンシス (*Halorhabdus utahensis*)、ハロルブルム・ラクスプロフンディ (*Halorubrum lacusprofundi*)、ハロテッリゲナ・ツルクメニカ (*Haloterrigena turkmenica*)、ヒュペルテルムス・ブチリクス (*Hyperthermus butylicus*)、イグニコックス・ホスピタリス (*Igniococcus hospitalis*)、イグニスパエラ・アグレガヌス (*Ignisphaera aggregans*)、メタロスパエラ・クプリナ (*Metallosphaera cuprina*)、メタッロスパエラ・セドウラ (*Metallosphaera sedula*)、メタノバクテリウム属種 A L - 2 1 (*Methanobacterium* sp. AL-21)、メタノバクテリウム属種 S W A N - 1 (*Methanobacterium* sp. SWAN-1)、メタノバクテリウム・テルモオートロピクム (*Methanobacterium thermoautrophicum*)、メタノブレヴィバクテル・ルミナンティクム (*Methanobrevibacter ruminantium*)、メタノブレヴィバクテル・スミティ (*Methanobrevibacter smitti*)、メタノカルドコックス・フェルヴェンス (*Methanocaldococcus fervens*)、メタノカルドコックス・インフェルヌス (*Methanocaldococcus infernus*)、メタノカルドコックス・ヤンナスキイ (*Methanocaldococcus jannaschii*)、メタノカルドコックス属種 F S 4 0 6 - 2 2 (*Methanocaldococcus* sp. FS406-22)、メタノカルドコックス・ヴルカニウス (*Methanocaldococcus vulcanius*)、メタノケッラ・コンラディ (*Methanocella conradii*)、メタノケッラ・パルディコラ (*Methanocella paludicola*)、メタノケッラ属種 Rice Cluster I (RC-I) (*Methanocella* sp. Rice Cluster I (RC-I))、メタノコッコ

10

20

30

40

50

イデス・ブルトニイ (*Methanococcoides burtonii*)、メタノコックス・アエオリクス (*Methanococcus aeolicus*)、メタノコックス・マリパルディス (*Methanococcus maripaludis*)、メタノコックス・ヴァニエリ (*Methanococcus vannielii*)、メタノコックス・ヴォルタエ (*Methanococcus voltae*)、メタノコルプスクルム・ラブレアントゥム (*Methanocorpusculum labreantum*)、メタノクッレウス・マリスニグリ (*Methanoculleus marisnigri*)、メタノハロビウム・エヴェスティガトゥム (*Methanohalobium evestigatum*)、メタノハロビルス・マヒイ (*Methanohalophilus mahii*)、メタノプラナス・ペトロレアリウス (*Methanoplanus petrolearius*)、メタノピュルス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*)、メタノサエタ・コンキリイ (*Methanosaeta concilii*)、メタノサエタ・ハルンディナケア (*Methanosaeta harundinacea*)、メタノサエタ・テルモピラ (*Methanosaeta thermophila*)、メタノサルスム・チリナエ (*Methanosalsum zhilinae*)、メタノサルキナ・アケチヴオランス (*Methanosarcina acetivorans*)、メタノサルキナ・バルケリ (*Methanosarcina barkeri*)、メタノサルキナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)、メタノスパエラ・スタドトマナエ (*Methanospaera stadtmanae*)、メタノスパエラ・パルストリス (*Methanospaerula palustris*)、メタノスピリルム・フンガテイ (*Methanospirillum hungatei*)、メタノテルモバクター・マルブルゲンシス (*Methanothermobacter marburgensis*)、メタノテルモコックス・オキナウェンシス (*Methanothermococcus okinawensis*)、メタノテルムス・フェルヴィドウス (*Methanothermus fervidus*)、メタノトッリス・イグネウス (*Methanotorris igneus*)、ナノアーケウム・エキタンス (*Nanoarchaeum equitans*)、ナトリアルバ・アシアチカ (*Natrialba asiatica*)、ナトリアルバ・マガディ (*Natrialba magadii*)、ナトロノモナス・パラオニス (*Natronomonas pharaonis*)、ニトロソブミルス・マリティムス (*Nitrosopumilus maritimus*)、ピクロフィルス・トリドウス (*Picrophilus torridus*)、ピュロバクルム・アエロピルム (*Pyrobaculum aero*
philum)、ピュロバクルム・アルセナティクム (*Pyrobaculum arsenaticum*)、ピュロバクルム・カリディフォンティス (*Pyrobaculum calidifontis*)、ピュロバクルム・イスラ
ンディクム (*Pyrobaculum islandicum*)、ピュロバクルム属種 1860 (*Pyrobaculum sp.* 1860)、ピュロコックス・アビッシ (*Pyrococcus abyssi*)、ピュロコックス・フリオスス (*Pyrococcus furiosus*)、ピュロコックス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*)、ピュロコックス属種 NA42 (*Pyrococcus sp. NA42*)、ピュロコックス・ヤヤノシイ (*Pyrococcus yayanosii*)、ピュロロブス・フマリイ (*Pyrolobus fumarii*)、スタピュロテルムス・ヘレニクス (*Staphylothermus hellenicus*)、スタピュロテルムス・マリヌス (*Staphylothermus marinus*)、スルフォロブス・アキドカルディリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*)、スルフォロブス・イスラニディクス (*Sulfolobus islandicus*)、スルフォロブス・ソルファタリクス (*Sulfolobus solfataricus*)、スルフォロブス・トコダイイ (*Sulfolobus tokodaii*)、テルモコックス・バロピルス (*Thermococcus barophilus*)、テルモコックス・ガンマトレランス (*Thermococcus gammatolerans*)、テルモコックス・コダカラエンシス (*Thermococcus kodakaraensis*)、テルモコックス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)、テルモコックス・オヌリネウス (*Thermococcus onnurineus*)、テルモコックス・シビリクス (*Thermococcus sibiricus*)、テルモコックス属種 4557 (*Thermococcus sp. 4557*)、テルモコックス属種 AM4 (*Thermococcus sp. AM4*)、テルモフィルム・ペンドンス (*Thermofilum pendens*)、テルモプラズマ・アキドピルム (*Thermoplasma acidophilum*)、テルモプラズマ・ヴォルカニウム (*Thermoplasma volcanium*)、テルモプロテウス・ネウトロピルス (*Thermoproteus neutrophilus*)、テルモプロテウス・テナクス (*Thermoproteus tenax*)、テルモプロテウス・ウゾニエンシス (*Thermoproteus uzoniensis*)、テルモスパエラ・アグレガンス (*Thermosphaera aggregans*)、ヴァルカニサエタ・ジストリブタ (*Vulcanisaeta distributa*)、およびヴァルカニサエタ・モウトノヴスキア (*Vulcanisaeta moutnovskia*)。

【0186】

本発明によるプロデューサー細胞として有用な古細菌細胞の特定の例としては、ハロフェラックス・ウォルカニイ (*Haloferax volcanii*) およびスルフォロブス属種 (*Sulfolob*

10

20

30

40

50

us spp.) が挙げられる。

【 0 1 8 7 】

(標的タンパク質)

本発明のアッセイシステムは標的タンパク質を含み得る。

【 0 1 8 8 】

任意の適切な標的タンパク質が使用され得、前のセクションで論じた標的細胞のいずれか由来のタンパク質を含む。したがって、本発明によるアッセイシステムでの使用に適した標的タンパク質は、真核生物、原核生物、真菌およびウイルスのタンパク質から選択され得る。

【 0 1 8 9 】

したがって、適切な標的タンパク質としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：癌タンパク質、輸送（核、キャリア、イオン、チャネル、電子、タンパク質）、行動、受容体、細胞死、細胞分化、細胞表面、構造タンパク質、細胞接着、細胞コミュニケーション、細胞運動性、酵素、細胞機能（ヘリカーゼ、生合成、モーター、抗酸化、触媒作用、代謝作用、タンパク質分解作用）、膜融合、発生、生物学的プロセスを調節するタンパク質、以下の活性を有する各タンパク質：シグナルトランスデューサー活性、受容体活性、イソメラーゼ活性、酵素調節活性、シャペロン調節因子、結合活性、転写調節活性、翻訳調節活性、構造分子活性、リガーゼ活性、細胞外組織化活性、キナーゼ活性、生合成活性、リガーゼ活性、および核酸結合活性。

【 0 1 9 0 】

標的タンパク質は、以下から選択され得るが、これらに限定されない：DNAメチルトランスフェラーゼ、AKT経路タンパク質、MAPK/ERK経路タンパク質、チロシンキナーゼ、上皮成長因子受容体（EGFR）、線維芽細胞成長因子受容体（FGFR）、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）、エリスロポエチン産生ヒト肝細胞受容体（EPH）、トロポミオシン受容体キナーゼ、腫瘍壞死因子、アポトーシス制御因子Bc1-2ファミリータンパク質、オーロラキナーゼ、クロマチン、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）、NF-B経路、HCVタンパク質、HIVタンパク質、アスパルチルプロテアーゼ、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）、グリコシダーゼ、リパーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）、サイトカインおよびホルモン。

【 0 1 9 1 】

特定の標的タンパク質は、以下から選択され得る：ERK1/2、ERK5、A-Raf、B-Raf、C-Raf、c-Mos、Tp12/Cot、MEK、MKK1、MKK2、MKK3、MKK4、MKK5、MKK6、MKK7、TYK2、JNK1、JNK2、JNK3、MEKK1、MEKK2、MEKK3、MEKK4、ASK1、ASK2、MLK1、MLK2、MLK3、P38、p38、P38、p38、BRD2、BRD3、BRD4、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ（PI3K）、AKT、プロテインキナーゼA（PKA）、プロテインキナーゼB（PKB）、プロテインキナーゼC（PKC）、PGC1、SIRT1、PD-L1、mTOR、PDK-1、p70S6キナーゼ、フォークヘッド転位因子、MELK、eIF4E、Hsp90、Hsp70、Hsp60、トポイソメラーゼI型、トポイソメラーゼII型、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、Cdk11、Cdk2、Cdk3、Cdk4、Cdk5、Cdk6、Cdk7、-チューブリン、-チューブリン、-チューブリン、-チューブリン、-チューブリン、-チューブリン、ヤヌスキナーゼ（JAK1、JAK2、JAK3）、ABL1、ABL2、EGFR、EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB6、NEH2/neu、Her3、Her4、ALK、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF1R、INSR、INSR、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT-3、FLT4、PDGFR、PDGFRB、CSF1R、Ax1、IRAK4、SCFR、Fyn、Musk、Btk、CSK、PLK4、Fes、MER、c-MET、LMTK2、FRK、I

10

20

30

40

50

L K、L c k、T I E 1、F A K、P T K 6、T N N I 3、R O S C C K 4、Z A P - 7 0、c - S r c、T e c、L y n、T r k A、T r k B、T r k C、R E T、R O R 1、R O R 2、A C K 1、S y k、M D M 2、H R a s、K R a s、N R a s、R O C K、P I 3 K、B A C E 1、B A C E 2、C T S D、C T S E、N A P S A、P G C、レニン、M M S E T、A u r o r a A キナーゼ、A u r o r a B キナーゼ、A u r o r a C キナーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、テロメラーゼ、アデニリルシクラーゼ、c A M P ホスホジエステラーゼ、P A R P 1、P A R P 2、P A R P 4、P A R P - 5 a、P A R P - 5 b、P K M 2、K e a p 1、N r f 2、T N F、T R A I L、O X 4 0 L リンホトキシン-、I F N A R 1、I F N A R 2、I F N - 、I F N - 、I F N - 、I F N L R 1、C C L 3、C C L 4、C C L 5、I L 1 、I L 1 、I L - 2、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 9、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 5、I L - 1 7、B c l - 2、B c l - x L、B a x、H C V ヘリカーゼ、E 1、E 2、p 7、N S 2、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5 A、N S 5 B、N F - B 1、N F - B 2、R e l A、R e l B、c - R e 1、R I P 1、A C E、H I V プロテアーゼ、H I V インテグラーゼ、G a g、P o l、g p 1 6 0、T a t、R e v N e f、V p r、V i f、V p u、R N A ポリメラーゼ、G A B A トランスアミナーゼ、逆転写酵素、D N A ポリメラーゼ、プロラクチン、A C T H、A N P、インスリン、P D E、A M P K、i N O S、H D A C 1、H D A C 2、H D A C 3、H D A C 4、H D A C 5、H D A C 6、H D A C 7、H D A C 8、H D A C 9、H D A C 1 0、H D A C 1 1、ラクターゼ、アミラーゼリゾチーム、ノイラミニダーゼ、インペルターゼ、キチナーゼ、ヒアルロニダーゼ、マルターゼ、スクラーゼ、ホスファターゼ、ホスホリラーゼ、P、ヒスチジンデカルボキシラーゼ、P T E N、ヒストンリジンデメチラーゼ(K D M)、G C N 5、P C A F、H a t 1、A T F - 2、T i p 6 0、M O Z、M O R F、H B O 1、p 3 0 0、C B P、S R C - 1、S R C - 3、A C T R、T I F - 2、T A F 1、T F I I I C、プロテインO - マンノシルトランスフェラーゼ1(P O M T 1)、アミロイド およびタウ。

【実施例】

【0 1 9 2】

本発明を特定の実施例を参照して説明する。これらは単なる例示であり、説明の目的のためだけである：それらは決して特許請求の範囲または記載された発明の範囲を限定することを意図しない。

【0 1 9 3】

(実施例1：液滴中のスクリーニングを伴うヒドロゲルマトリックスビーズを用いたタグなし化合物ライプラリの生成)

(1：ガイド配列のアセンブリ)

1) アセンブリは、架橋のためにアミン基に対する12 C リンカーを含む5'タグオリゴヌクレオチドと、3'タグオリゴヌクレオチドとを包含する。ガイド配列は、ライプラリ中で使用するモノマーに対応するオリゴヌクレオチドのプールであり、この場合、200オリゴヌクレオチドが 1.6×10^9 を超える個数のユニークな配列のアセンブリを可能とすることに留意されたい。

【0 1 9 4】

2) 5'および3'タグを1 μM最終濃度で添加する。

【0 1 9 5】

3) 250個のバーコードオリゴヌクレオドを1.25 μMの最終濃度でプールする。

【0 1 9 6】

反応混合物：

10 μl N E 緩衝液1 (New England Biolabs)

(1 × 反応ミックスは、10 mM ビス-トリス-プロパン-H C 1、10 mM M g C_{1,2}、1 mM D T T、p H 7 (25にて)である)

5 μl 5'タグオリゴヌクレオチド(100 μM)

10

20

30

40

40

50

5 μ l 3' タグオリゴヌクレオチド (100 μ M)
 6. 25 μ l のプールしたオリゴヌクレオチド (100 μ M)
 2. 5 μ l 热安定性 5' AppDNA/RNAリガーゼ (New England Biolabs)
 70. 25 μ l のヌクレアーゼフリー水

【0197】

65 にて4時間インキュベートする。

【0198】

【表1】

オリゴ名	オリゴ配列	5'修飾	3'修飾
5'タグ	ATTATGACCGTAGGCCTTGGC	NH ₂ -C ₁₂ リンカー	なし
3'タグ	CGC GAT ATT AGC CAT TAA CCC	アデニル化	最後の残基はタグの末端へのライゲーションを防ぐジデオキシである
プールオリゴ	可変の 18 マー	アデニル化	なし

10

【0199】

4) 1 × 10 mM トリス、1 mM EDTA (pH 7.0) 緩衝液で 300 μ l とし、そして i llustra S-200マイクロスピンHRカラム (GE Healthcare) を用いて反応物をクリーンアップし、ライゲートしなかったオリゴヌクレオチドと試薬とを除去する。

20

【0200】

5) 40 μ l の酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 2.5 容量 (1 ml) の 100% エタノールを添加する。混合し、-20 にて少なくとも 1 時間置き、次いで、4 にて 15,000 rpm で 15 分間の遠心分離によって DNA をペレット化する。

【0201】

6) 上清を除去し、1 ml の 70% エタノールで洗浄し、5 分間遠心分離し、洗浄を繰り返し、次いでこのペレットを風乾する。

【0202】

7) このペレットを 25 μ l のヌクレアーゼフリー水中に再懸濁する。

30

【0203】

(2: PCR 中に架橋させるための 5' タグオリゴヌクレオチドのアガロースへの架橋)

1) 25 g の低融点アガロースを 50 ml の 18.2 M 水中に計量することによって架橋用のアガロースを調製し、そして 4 にて 30 分間混合して水和させる。濾過により乾燥させ、そして 100 ml の水で洗浄し、スラリーを回収してその容量を測定する (通常 15 ~ 20 ml)。

【0204】

2) 等容量の 0.05 M NaOH をスラリー化したアガロースに添加し、pH を確認し、必要であれば 10 M NaOH を必要なだけ添加することによって、10.5 と 11 との間に調整する。

40

【0205】

3) スラリーをマグネチックスターラー上に置き、CNBr を添加しながら混合する。

【0206】

4) 100 mg / ml スラリー 臭化シアン活性化セファロース (CNBr) (Sigma) を添加し (すなわち、40 ml のスラリー中に 4 g の CNBr を添加する)、直ちに pH をチェックし、CNBr が完全に溶解するまでモニタリングする (1 ~ 2 ml の 10 M NaOH の添加が、pH を 10.5 ~ 11 に保つために必要であり得る)。反応が 15 分間進行するにつれて pH をモニタリングする。

【0207】

5) 15 分後または pH が安定したら、反応は完了する。等容量の 200 mM NaH

50

C O₃ (pH 8.5) を添加することによって、残存する活性C N B r をブロックする。

【0208】

6) ブフナー漏斗を使用してスラリーを濾過し、100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl (pH 8.5) で 3 × 50 ml 洗浄する。

【0209】

7) 100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl (pH 8.5) 緩衝液全容量 25 ml 中に再懸濁する。

【0210】

8) 5' 末端にNH₂-リンカーを有する 100 μM の 5' タグオリゴヌクレオチド 250 μl を取り、スラリー化アガロースと混合し、室温にて 2 時間混合する。

10

【0211】

9) 等容量 (25 ml) の 0.2 M グリシンを添加し、残存する活性C N B r 結合部位をブロックする。

【0212】

10) スラリーを濾過し、100 ml の 100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl (pH 8.5) 緩衝液で洗浄し、次いで 100 ml の水で洗浄し、風乾させ、ゲルを集めて計量する (注: この物質は 0.1% アジ化ナトリウムを添加することによって保存用に保存できる。あるいは、これを凍結乾燥させて、長期使用のために室温で保存することができる。アジ化ナトリウムを添加する場合、スラリーを使用前に濾過して洗浄してアジドを除去しなければならない)。

20

【0213】

11) これは約 40% アガロースであり、この段階でアミンリンカーを介して架橋された 5' タグオリゴヌクレオチドで飽和されており、後でヒドロゲルマトリックスを製造するために使用することができる。少量のアリコート (100 μl) を採取して、約 75 ではなお融解し、20°を下回ると固体となることをチェックするようにアッセイし、架橋がゲル化特性に悪影響を与えていないことをチェックする。

【0214】

(3: ビーズにおける P C R)

この工程は、単一の液滴中で、単一の特異的DNAガイドを増幅し、これにより各ビーズ中にクローンDNA集団を生じる。架橋 5' タグオリゴヌクレオチドが P C R に使用されるが、共有結合としてアガロースに結合したままであることに留意されたい。これはアガロースから失われることはない。これにより、ビーズの全表面およびビーズ内に μM 濃度のDNAガイドが付着したクローンビーズが得られる。

30

【0215】

1) 必要に応じて、乾燥アガロース - C B B r - オリゴヌクレオチドを溶解するか、または最終濃度 0.5% までスラリーを添加する。

【0216】

2) 次のように水性反応混合物を作製し、それを保温する。還元した 3' Rev タグは、非対称 P C R による 5' タグ産物の産生を促進し、したがってテンプレートと比較してより多くの架橋ガイドが生成される。組み立てられたガイドDNAは 1 コピー / 液滴である (一部の液滴は空である)。

40

【0217】

反応は 1 ml 容量 / カプセル化を構成する

200 μl 5 × Phusion HF 緩衝液

20 μl 10 mM d N T P ミックス (等ミックス)

2 μl の 3' Rev-comp オリゴヌクレオチド (GGGTAAATGGCTAATATCGCG)

50 μl Phusion HS II ポリメラーゼ (New England Biolabs)

0.015 g の C N B r - 5' タグアガロースを含むヌクレアーゼフリー水で 1000 μl にする (1.5% アガロースビーズ)。

【0218】

50

3) 連続相 (20 μ L / 分の水相、40 μ L / 分の油相) として Pico-Surf1 (2% 界面活性剤、Dolomite、英国) を使用して、14 μ m のエッティングされた液滴生成チップ (Dolomite、英国) 中にカプセル化する。

【0219】

4) 液滴混合物全体をまとめて PCR し、48 ウェル間で等分 (スプリット) する (50 μ l / ウェル)。

【0220】

5) 98 にて 2 分、[98 にて 15 秒、54 にて 15 秒、72 にて 10 秒] \times 30、72 にて 2 分、次いで 4 にして 20 分で凝固させる (行う直前まで 4 に保つ)。

10

【0221】

6) ビーズをプールし、5 容量 (5 ml) の PBS + 1% Tween 80 を添加し、転倒混和し、4 にて 2500 g で 15 分間遠心してペレット化する。

【0222】

7) 上清を除去し、ビーズを 5 倍量 (5 ml) の PBS + 1% Tween 80 で再度洗浄して油をすべて除去し、4 にて 2500 g で 15 分間遠心してペレット化する。

【0223】

8) ビーズにはオイルがなくなり、ハイブリダイズした、架橋していない DNA (またはガイドの逆相補鎖) を除去するために 5 ml の 0.1 M NaOH で洗浄し、室温にて 5 分間混合し、次いで 4 にて 2500 g で 15 分間遠心してペレット化する。

20

【0224】

9) 0.1 M NaOH 洗浄を繰り返す。

【0225】

10) ビーズに 5 ml の水を加え、4 にて 2500 g で 15 分間遠心してペレット化する。

【0226】

11) 水洗を繰り返して、ビーズは化学反応をガイドする準備が整う。

【0227】

(4: ケミカルライブラリのガイド付きアセンブリ)

モノマーの DNA ガイドアセンブリを従来の化学を用いて合成し、RNA タグを IDT によって予め合成した。最後の 3 つのスクレオチドは、エキソスクレアーゼによる切断を防ぐためにホスホロチオエート結合を含む。次いで、個々の試薬に、ガイドオリゴヌクレオチドに組み込まれたユニークな配列に対して特異的である特定の RNA に対するガイドでタグ付けする (最大 4 つのガイド配列を 100,000,000 を超えるユニークな化合物にすると仮定して、100 のユニークモノマーが組み立てられ得る)。ガイドおよびタグは 18 ~ 25 マーで、DNA に対する Tm は > 60 であるが、RNA - DNA 相互作用がより安定しているため、これらのオリゴヌクレオチドの実際の融解温度は 75 ~ 85 であることが分かった。

30

【0228】

1) ビーズをカラムに充填し (各ビーズはガイドアセンブリに対してユニークな DNA 配列を持つクローニングであるが、各ビーズ上のこのクローニングガイドは μ M の濃度である)、20 μ M では、ビーズ容量 1 ml あたり 20 億が存在し得る。

40

【0229】

2) 次に、モノマーと適切な試薬とのプールをカラム上で洗浄し、反応を進行させる。カラムを洗浄し、必要に応じて新しい反応化学を添加することができる (注: 新鮮なモノマーも追加できる)。

【0230】

3) 化学合成は使用するモノマーによって異なる (実施例 2、セクション 4 を参照)。

【0231】

4) 最後に、ビーズを 100 mM NaCl を含む 10 カラム容量の TE で洗浄し、次

50

いで表現型スクリーンにおける細胞の増殖のために 2 カラム容量の適切な培地（例えば、R P M I）で洗浄する。

【0 2 3 2】

5) 次にビーズを増殖培地中に集め、標的細胞をカプセル化する準備をする。新たに合成された化合物は、D N A ガイド - R N A タグ相互作用を介して結合したままである（p H が 5 ~ 9、温度が 7 5 以下に保たれている限り（新規化合物は 2 ~ 4 のガイドを介して結合されるので、それは非常に安定である））。

【0 2 3 3】

（5：指標細胞による化学ビーズのカプセル化）

ビーズ上の化学物質はカプセル化されるまで結合したままである。ジャーカット細胞を 2 ~ 8 個 / 液滴を捕捉するように希釀する。

【0 2 3 4】

1) アガロースビーズ、R P M I 培地中の 2 ~ 8 個のジャーカット細胞、および 0 . 4 % w / v のタイプ I X - A アガロースおよび 0 . 1 μ g / m l の R N a s e A を、1 0 0 μ m の接合部を有する液滴発生チップにおいて 1 0 0 μ L / 分の水性流速および 2 0 0 μ L / 分で Picosurf 1 (Dolomite、英国) でカプセル化する。クローニ性を維持するために、液滴ごとに < 1 アガロースビーズをカプセル化する。

【0 2 3 5】

2) ハイブリダイズした化合物からの化学物質の放出は、細胞混合物中に 0 . 1 μ g / m l の R N a s e A を含めたことによる。これは細胞の増殖には影響せず、試験した増殖培地で少なくとも 4 8 時間有効である。R N A ガイドの切断は、R P M I、溶原性プロス、トリプシンソイプロスおよび D M E M 中で 1 5 ~ 2 0 分以内に起こる。R N a s e A は R N A タグを切断して遊離させ（D N A では起こらない）、タグがつかなかつた化合物はもはやガイドに結合せず、アガロースビーズから指標小滴中に自由に拡散する。これは 0 . 5 ~ 1 0 0 μ M の濃度で起こる。

【0 2 3 6】

（6：表現型スクリーン）

1) 指標細胞と共に化学ビーズを 2 4 時間インキュベートした後、液滴は破壊される。細胞をより長期間インキュベートすることが可能である：例えば、ヒト細胞はアッセイにおいて 1 0 日間インキュベートすることができ、そして細菌細胞は 2 8 日後に回収される。しかし、通常のインキュベーション時間は 2 4 ~ 1 4 4 時間である。

【0 2 3 7】

2) 氷上に置くことによってビーズを固化させ、次いで 4 容量のリン酸緩衝食塩水（P B S）+ 1 % T w e e n 8 0 を添加することによって破壊し、転倒混和し、次いで 4 にて 3 5 0 0 g で 1 5 分間遠心分離する。

【0 2 3 8】

3) 上清を除去し、ビーズペレットを 4 容量の P B S + 1 % T w e e n 8 0 で再度洗浄する。

【0 2 3 9】

4) 次にビーズペレットを 1 2 5 μ m から 4 5 μ m の粒子フィルターを通してろ過し、これによって、より大きな液滴を除去し、より小さな破片および細胞を通して洗浄する。

【0 2 4 0】

5) フィルター上のビーズを 5 容量の P B S ですすぎ、次いで遠心分離管に集める。

【0 2 4 1】

6) P B S で混合液を 1 0 0 m l にする。

【0 2 4 2】

7) T M R M および Hoescht 33342 (Thermo Fisher Scientific) 染料をそれぞれ 2 0 μ M の最終濃度および 1 μ g / m l で添加する。室温で 3 0 分間インキュベートする。

【0 2 4 3】

8) 4 にて 3 5 0 0 g で 1 5 分間遠心分離してビーズをペレット化する。

10

20

30

40

50

【0244】

9) 50 ml の PBS に再懸濁し、洗浄工程を繰り返し、染料を除去する。

【0245】

10) 蛍光活性化セルソーター (FACS) を使用して、405 nm レーザーを使用して Hoesch および 488 nm レーザーを使用して TMRM を励起し、既知の対照と比較してこれらのチャンネルの出力を検出する。

【0246】

11) TMRM / Hoescht 染色比の増加を示す液滴をチューブに選別する。

【0247】

(7: ヒット化合物を同定するための標的の配列決定)

10

1) 「ヒット」ビーズをペレット化し、25 μl の水に再懸濁する。

【0248】

2) 各ヒットのコピー数を増やすために第一ラウンドの PCR を設定する - 長いリンクによってアガロースに液滴あたり数百万が付着した：

10 μl の HF 緩衝液 (Thermo Fisher Scientific)

1 μl 5' タグ (10 μM) (リンクなしバージョン ATTATGACCGTAGGCCTTGGC)

1 μl 3' Rev-comp オリゴヌクレオチド (10 μM) (GGGTTAACGGCTAATATCGCG)

0.25 μl Phusion DNA ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific)

25 μl の水中ビーズ

2.75 μl のヌクレアーゼフリー水で 50 μl にする

20

【0249】

PCR 98 にて 2 分、[98 にて 15 秒、54 にて 15 秒、72 にて 10 秒]
× 15、72 にて 2 分。

【0250】

3) Ampure XP ビーズ (Beckman Coulter) でクリーンアップする

- 1.8 倍量 (90 μl の Ampure XP ビーズ) を添加し、ピベッティングでよく混ぜる
- 2 分待ってからマグネットの上に置き、ビーズが 2 ~ 5 分で集まったら上清を取り除く

・ 200 μl の 80% エタノールで洗浄し、室温で 2 分間インキュベートする

・ 2 ~ 5 分間マグネットに戻してエタノールを除去する

・ エタノール洗浄を繰り返し、ビーズが乾くまで 5 分間風乾する

30

・ 20 μl の 10 mM トリス HCL pH 7.0 に再懸濁し (これにより DNA が溶出する)、マグネット上に戻す

・ 上清を集めて保管する

【0251】

4) プライマーを添加して第二ラウンド PCR。

【0252】

5) 5' タグおよび 3' タグおよび修飾 RC_INDEX および PS_I2 インデックス プライマー (illumina より) を使用して、プライマーの 3' 末端にタグ配列を用いてコード化する (12 × EC および 8 × PS_I2)。これらのタグは変わらないが、インデックスは、以下の条件で 96 ウェルプレート PCR をコードするように変わる：

40

・ 10 μl 2 × NEBNext PCR マスター ミックス (New England Biolabs)

・ 2.5 μl の RC_INDEX (3.3 μM) (1/30 希釀のストック)

・ 2.5 μl の PS_I2 プライマー (3.3 μM) (1/30 希釀のストック)

・ 5 μl の DNA (PCR (工程 3) から溶出したもの)

・ PCR 98 にて 2 分、[98 にて 10 秒、54 にて 60 秒、72 にて 30 秒] × 30、72 にて 2 分。

【0253】

6) Ampure XP ビーズ (Beckman Coulter) を用いて PCR 産物セレクチン 250 ~ 350 bp のサイズ選択。

50

【0254】

より大きなフラグメントを除去するには：

- ・15 μl の水を加えて容量を65 μl に増やす。
- ・49 μl (0.75 × 容量) のAmpureビーズを加えてよく混ぜ、5分間インキュベートする。
- ・マグネット上に2分間置き、上清をきれいなウェルに移す。
- ・目的のフラグメントをビンに入れる。
- ・10 μl (0.15 × 容量のAmpureビーズ) を加えてよく混ぜ、5分間インキュベートする。
- ・マグネットの上に置き、今度は上清を捨てる。
- ・80%エタノール200 μl で洗浄し、室温で2分間インキュベートする。
- ・2～5分間マグネットに戻してエタノールを除去する。
- ・エタノール洗浄を繰り返し、ビーズが乾くまで5分間風乾する。
- ・35 μl の10 mM トリス-HCl pH 7.0 に再懸濁し(これによりDNAが溶出する)、マグネット上に戻す。
- ・25 μl の上清を集めて保管する。

10

【0255】

7) 希釀液を1:100、1:10000および1:200000に設定する。Illumina定量キット用のKapa Fast qPCR (Kapa Biosystems) を12 μl 反応液中で使用して、qPCRによりDNA濃度を決定する。

20

【0256】

8) qPCR結果を使用して、NextSeq500システムガイド(15046563)およびNextSeq Denature and Dilute Libraries Guide(15048776)のIlluminaプロトコルに従って、すべてのサンプルの2nMライブラリミックスを作製し、シーケンサーにロードする。

【0257】

9) 2つのタグでフラグ付けしたガイド核酸の戻り配列は、容易に同定され、化合物組立の順序およびその構造を決定するために使用される - ガイド(200ヌクレオチド未満である)は、必要であればIDTからのウルトラマーを用いて合成することができ、このようにして迅速にモノマーからより多くの化合物を作製し、活性を確認する。あるいは、化合物は、DNA配列決定データから解読された構造に基づいて直接合成される。

30

【0258】

(実施例2-固体ビーズ上の固定化DNAガイドを用いたタグなし化合物ライブラリの生成)

(1:ガイド配列のアセンブリ)

5) タグをアミンではなくビオチン化することを除き、実施例1のセクション1に記載の通り。

【0259】

(2:ストレプトアビジンコートビーズへの單一ガイドの付着)

付着を可能にするためにストレプトアビジンでコーティングされた活性化ビーズに單一のDNA分子を付着させる。ビーズは、平均直径4.95 μmのBangs Laboratories Cat No: P01Nから購入した。ビーズはストレプトアビジンでポリマーコーティングされている。

40

【0260】

1) 1000 μl (5 mgのビーズ)を採取し、室温にて5000 gで5分間の遠心分離によりペレット化した。

【0261】

2) 上清を除去し、ビーズを1000 μl の100 mM トリス-HCl pH 8.0 . 1% Tween 20で洗浄した。

【0262】

3) 残存する緩衝液を除去するために洗浄をさらに2回繰り返した。

【0263】

50

4) 最終容量 $100\text{ }\mu\text{l}$ の 100 mM トリス - HCl pH 8、 0.1% Tween 20 にビーズを再懸濁する。

【0264】

5) ビーズは 6×10^7 ビーズ / mg なので、 $1000\text{ }\mu\text{l}$ の中に 6×10^8 ビーズがあり、これはビーズあたり平均 1 つのガイドを得るのに同じ数のガイドが必要であることを意味する。このためには約 3 フェムトモルの DNA が必要である。平均的なガイドの長さは 123 bp であるので、これは経験的に 0.25 ng のオリゴヌクレオチド DNA が必要であることを意味する。最良の結果を得るために、このほぼ 2 倍が必要であることを見出し、 0.4 ng のガイド構築物を使用した - これを $100\text{ }\mu\text{l}$ の 100 mM トリス - HCl pH 8、 0.1% Tween 20 に希釈し、そしてビーズと混合する。

10

【0265】

6) ビーズを室温で 1 時間混合する。

【0266】

7) 工程 1 および 2 に記載のように、ビーズを遠心分離によりペレット化し、そして $500\text{ }\mu\text{l}$ の 100 mM トリス - HCl pH 8、 0.5% Tween 20 で 5 回洗浄して未結合 DNA を除去する。

【0267】

8) 最終再懸濁は $500\text{ }\mu\text{l}$ の 10 mM トリス - HCl pH 8、 1 mM EDTA 緩衝液中にあり、4) にて数週間保存することができ、 $10\text{ }\mu\text{l}$ を 0.5% アガロースゲル上で泳動し、そしてビーズ上のタンパク質を染色するために $1 \times$ sypro-ruby で、そして DNA を染色するために $1 \times$ Sybr Gold で染色し、両方との局在が見られるはずであるが、Sybr gold はゲル上では非常に弱く、最大 4 つの異なるバンド（ガイド内の 1 ~ 4 の可変領域）となり得、大部分はより大きな断片で流れる。ビーズに付着すると、フラグメントはすべての場合において $> 10\text{ kb}$ であるように見える。より多くのバンドが見える場合、バッチは均質ではないので繰り返さなければならない。

20

【0268】

9) 液滴あたり 1 つのビーズを与えるよう液滴が作製されるようにサンプルを希釈する。

【0269】

(3: 機能性ビーズ上のガイドオリゴヌクレオチドの増幅)

30

1) 以下の混合物中にオリゴヌクレオチド官能基化ビーズを $70,000$ ビーズ / μL に希釈する：

反応は 1 mL 容量 / カプセル化を構成する：

$200\text{ }\mu\text{l}$ $5 \times$ Phusion HF 緩衝液 (Thermo Fisher Scientific)

$20\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM dNTP ミックス (等量ミックス)

$2\text{ }\mu\text{l}$ の 3' Rev-comp オリゴヌクレオチド (GGGTTAACGGCTAATATCGCG) (IDT)

$50\text{ }\mu\text{l}$ Phusion HS II ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific)。

【0270】

2) 連続相 ($20\text{ }\mu\text{L}$ / 分の水相、 $40\text{ }\mu\text{L}$ / 分の油相) として Pico-Surf 1 (2% 界面活性剤、Dolomite、英国) を使用して、 $14\text{ }\mu\text{m}$ のエッティングされた液滴生成チップ (Dolomite、UK) 中にカプセル化する。ビーズ希釈は 10 滴ごとに 1 つのビーズとしてクローン性を保証し、そして全混合物をカプセル化するのに約 1 時間かかる。

40

【0271】

3) 得られた $14\text{ }\mu\text{m}$ の液滴 ($18\text{ }\mu\text{L}$) をエッペンドルフチューブに集める。

【0272】

4) 液滴混合物全体をまとめて PCR し、60 ウェル間で等分 (スプリット) する ($50\text{ }\mu\text{l}$ / ウェル)。

【0273】

5) 98 にて 2 分、[98 にて 15 秒、54 にて 15 秒、72 にて 10 秒] \times 30、72 にて 2 分、次いで 4 にして 20 分で凝固させる (行う直前まで 4 に保つ

50

)。

【0274】

6) 製造業者のプロトコルに従ってビーズをプールし、Pico-break 1 (Dolomite、英国)を使用して液滴を粉碎する。

【0275】

7) ビーズを回収し、ビーズを5容量(5ml)のPBS + 1%Tween 80で再度洗浄してすべての油を除去し、4にて2500gで15分間遠心してペレット化する。

【0276】

8) ビーズにはオイルがなくなり、ハイブリダイズした、架橋していないDNA(またはガイドの逆相補鎖)を除去するために5mlの0.1M NaOHで洗浄し、室温で5分間混合し、次いで4にて2500gで15分間遠心してペレット化する。

【0277】

9) 0.1M NaOH洗浄を繰り返す。

【0278】

10) ビーズに5mlの水を加え、4にて2500gで15分間遠心してペレット化する。

【0279】

11) 水洗を繰り返し、ビーズの使用準備を整える。

【0280】

(4:ビーズ上でのDNAテンプレート化アシスト合成)

DNA指向性アセンブリのためのタグ付きモノマーのアセンブリを、従来の化学を用いて合成した。RNAタグをIDTによって予め合成し、そして最後の3ヌクレオチドには、エキソヌクレアーゼによる切断を防ぐためにホスホロチオエート結合を含ませた。次いで、個々の試薬を、ガイドオリゴヌクレオチドに組み込まれたユニークなガイド配列に対して特異的である特定のRNAに対するガイドでタグ付けする(最大4つのガイド配列を100,000,000を超えるユニークな化合物にすると仮定して、100のユニークなモノマーが組み立てられ得る)。設計したガイドおよびタグは18~25マーで、DNAに対するTmが>60であるが、RNA-DNA相互作用がより安定しているため、これらのオリゴヌクレオチドでは75~85にて安定性が見られた。交差反応性を最小限に抑えるために、モノマー濃度を0.5μM以下に保つ。ガイドオリゴヌクレオチドのプールに対応して、試薬を配列の5'末端に連結した。この例示的な実施例では、(a)アルデヒドまたは(b)アミンのいずれかを含有するビルディングブロックを使用してモノマーを互いに連結し、還元的アミノ化後に第二級アミン結合をもたらす。

【0281】

1) 250mM NaCl、10mM水素化ホウ素ナトリウムおよび0.5μM反応性オリゴヌクレオチド結合モノマーを有する50mM TAPS緩衝液、pH 8.0中で官能基化ガイダンスビーズ(実施例2のセクションXから)を20,000ビーズ/μLに希釈する。

【0282】

2) 20μmのエッティング深さのマイクロフルイディックチップ(Dolomite、英国)を使用して、50μL/分および100μL/分のPico-surf1(2%界面活性剤、Dolomite、英国)の水性流速でこの混合物をカプセル化し、直径20μmの液滴(42pL)を生じる。

【0283】

3) 液滴を50mL Falconチューブに集め、25にて24時間反応させる。

【0284】

(5:組み立てられた化合物、ガイダンスビーズ、および指標細胞の液滴融合)

この工程は、小さな液滴生成部位、直径100μmの液滴を生成するための別のより大きい液滴生成部位、液滴同期のためのY字型チャネル、および液滴合体のための一対のアドレス可能電極を含む特注のマイクロ流体チップを含む。これらのデバイスは、Dolomite

10

20

30

40

50

(英国)またはMicronit(オランダ)のような企業から容易に入手可能である。

【0285】

1) 指標液滴のために以下を含む混合物を調製する:

ジャーカット細胞(5細胞/液滴で21,000細胞/ μL)

R N a s e A、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

0.5重量%IX-A型アガロース(Sigma)

R P M I 培地

【0286】

2) カスタムメイドのチップに実施例2の工程4からの20 μm 液滴の再注入を開始する。

10

【0287】

3) Pico-surf1の流速200 $\mu\text{L}/\text{分}$ で、100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の流速で100 μm 液滴の作製を開始する。

【0288】

4) 高速度カメラ(PixelLink、カナダ)を使用して、20 μm 液滴の再注入の速度を100 μm 液滴の生成速度に合わせて、Yチャネルで1:1の同期を確実にする。小さい方の液滴の方がチャネル内での流体力学的抗力が小さく、より速く移動し、100 μm 液滴に追い付き、自己同期させて対にする。

【0289】

5) パルス発生器(Aim-TTi、RS components、英国)および高電圧増幅器(Trek 2220、Trek、米国)からの1KHzの方形波パルスで4kV/cmの電場を印加することによって、電極でのエレクトロフュージョンにより隣接する液滴対を融合させる。

20

【0290】

6) チップから融合された液滴を収集し、5%CO₂、37にて組織培養フラスコ(Fisher、英国)中にインキュベートする。

【0291】

(6: 表現型スクリーン)

実施例1のセクション6に記載の通り。

【0292】

(7: ヒット化合物を同定するための標的の配列決定)

30

実施例1のセクション7に記載の通り。

【0293】

(実施例3-既存の化合物ライブラリを可逆的にタグ付け)

(1: 化合物ライブラリに追加するためのランダムオリゴヌクレオチドタグの生成)

1) ランダムタグをTwist Bioscienceから購入する。これらは、Tm > 55を有する18~25マーの100,000~1,000,000個のユニークな配列を含み、それぞれに5'RNA_アダプター-1オリゴヌクレオチドおよび3'DNA_アダプター-1オリゴヌクレオチドを付加し、それぞれ修飾して、特異的末端への付加を確実にする。

【0294】

2) 200 μl 反応用の反応混合物:

20 μl 10×緩衝液(1×反応緩衝液(50 mMトリス-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl₂、1 mM DTT))

100 μl 50% PEG 8000(w/v)(1×25%(w/v)PEG 8000)

20 μl 10 mMヘキサミンコバルトクロリド(1×1 mMヘキサミンコバルトクロリド)

20 μl (100単位)T4 RNAリガーゼ

20 μl 10 mM ATP(1×1 mM ATP)

【0295】

20 μl のオリゴヌクレオチドミックス(ランダムバーコードオリゴヌクレオチドならびにRNAおよびDNAアダプターの各々水中30 μM の等量ミックス)。25にて1

50

6時間インキュベートする。40 μ lの10 mM トリス-HCl pH 8.0、2.5 mM EDTAを添加して反応を停止させる。

【0296】

【表2】

オリゴ名	オリゴ配列	5'修飾	3'修飾
5' DNA_アダプター1	ATTATGACCGTAGGCCTTGGC	なし	なし
3' RNA_アダプター1	CGC GAT ATT AGC CAT TAA CCC	リン酸化	なし
バーコードオリゴ	可変の18~25マー	リン酸化	なし
捕捉オリゴ	GGGTTAACGGCTAATATCGCG	NH ₂ -C ₁₂ リンカー	

10

【0297】

3) 10 mM トリス、1 mM EDTA緩衝液、pH 7で300 μ lを調製し、そしてIllustra S-200マイクロスピンHRカラム(GE Healthcare)を使用して反応物をクリーンアップし、ライゲートしなかったオリゴヌクレオチドおよび試薬を除去する。

【0298】

4) 40 μ lの酢酸ナトリウムpH 5.2および2.5容量(1 ml)の100%エタノールを加える。混合し、-20°にて少なくとも1時間置き、次に4°にて15,000 rpmで15分間遠心してDNAをペレット化する。

【0299】

5) 上清を除去し、1 mlの70%エタノールで洗浄し、5分間回転させ、洗浄を繰り返し、次いでペレットを風乾させる。

【0300】

6) 25 μ lのヌクレアーゼフリー水にペレットを再懸濁する。

【0301】

(2: PCR中に架橋させるための5'タグオリゴヌクレオチドのアガロースへの架橋)

1) 25 gの低融点アガロース(Sigma)を50 mlの18.2 M水中に計量して架橋するためのアガロースを調製し、そして4°にて30分間混合して水和させる。濾過して乾燥させ、100 mlの水で洗浄し、スラリーを回収しそして容量を測定する(通常15~20 ml)。

【0302】

2) スラリーをアガロースに等容量の0.05 M NaOHを添加し、pHを確認し、必要ならば10 M NaOHを必要なだけ添加することによって10.5~11に調整する。

【0303】

3) スラリーをマグネットスターラー上に置き、CNBr(Sigma)を添加しながら混合する。

【0304】

4) 100 mg/mlのスラリーCNBrを加える。すなわち、40 mlのスラリーに4 gのCNBrを加える。直ちにpHを確認し、CNBrが完全に溶解するまでモニタリングする。必要に応じて10.5~11の間にpHを保つために1~2 mlの10 M NaOHを加える。反応が15分間進行するごとにpHをモニタリングする。

【0305】

5) 15分後またはpHが安定になった後、反応は完了する。等容量の200 mM NaHCO₃(pH 8.5)を加えることにより、残存する活性CNBrをブロックする。

【0306】

6) ブフナー漏斗を使用してスラリーを濾過し、100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl(pH 8.5)で3×50 ml洗浄する。

【0307】

7) 全容量25 mlの100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl(pH 8.5)

20

30

40

50

) 緩衝液に再懸濁する。

【0308】

8) 5' 末端に NH₂-リンカーを有する 100 μM の 5' タグオリゴヌクレオチド 250 μl を取り、スラリー化アガロースと混合し、室温で 2 時間混合する。

【0309】

9) 等容量 (25 ml) の 0.2 M グリシンを加えて、残存する活性 CNBr 結合部位をブロックする。

【0310】

10) スラリーを濾過し、100 ml の 100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl (pH 8.5) 緩衝液で洗浄し、次いで 100 ml の水で洗浄して風乾させ、ゲルを集めて計量する (この物質は 0.1% アジ化ナトリウムを添加することによって保存用に保存できる。あるいは、それは凍結乾燥して長期使用のために室温で貯蔵することができる。アジドを添加する場合は、使用する前にスラリーを濾過して洗浄し、アジドを除去しなければならない。)

【0311】

11) これは約 40% のアガロースであり、この段階でアミンリンカーを介して架橋した 5' タグオリゴヌクレオチドで飽和しており、後でヒドロゲルマトリックスを製造するために使用することができる。少量のアリコート (100 μl) を採取し、それがまだ約 75% にて融解し、20% 未満で固化することを確認するためにアッセイし、架橋がゲル化特性に悪影響を及ぼしていないことを確認する。

【0312】

(3) 化合物ライプラリのタグ付け (化学法)

この反応の正確な性質は、問題のライプラリおよびその中に含まれる官能基に依存するが、本実施例においては、ライプラリはアミノ基で高度に官能基化する。次いで、バーコード化オリゴヌクレオチドの末端をスクシンイミジルエステルで官能基化する。液滴内で化合物を放出させるために、バーコード化オリゴヌクレオチドを切断可能な基で官能基化する。

【0313】

(1) 個々のライプラリメンバーを 0.1 M 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.3 に最終濃度 1 mM まで溶解する。

【0314】

(2) 1 : 1 のモル比を達成するために、スクシンイミジルエステル官能基化ガイドオリゴヌクレオチドを個々のウェルに添加する。各ウェルに特定の配列が 1 つだけ付加されることを確実にする。

【0315】

(3) 室温で 1 時間インキュベートする。

【0316】

(4) 溶液を 40% に温める。

【0317】

(5) 工程 3 からビーズのストックを希釈し、ウェルにロードする。スクリーニングプロセス中にオーバーサンプリングを確実にするために少なくとも 100 ビーズ / ウェルをロードするよう目標とする。

【0318】

(6) 40% にてインキュベートしてタグ付き化合物をビーズにハイブリダイズさせる。

【0319】

(7) スピンダウンして各ウェルから上清を除去する。1 × PBS 緩衝液で 3 回洗浄する。

【0320】

(8) 1 × PBS 緩衝液を用いてビーズをウェルから洗い流す。一緒にプールしてから

10

20

30

40

50

、新しい1×PBSに再懸濁する。

【0321】

(4) 化合物のタグ付け(酵素法)

この反応および官能基の正確な性質から、いくつか挙げるとグリコシラーゼ、非リボソームペプチドシンターゼ、ユビキチナーゼ、およびホスホリラーゼを含む、本質的に任意の適切な酵素を使用することができる。この説明では、ホスホリラーゼ酵素を使用する。

【0322】

化合物を水またはDMSOに溶解して0.5mMにする(DMSO中の場合は2.5μL以下):

- (1) 5μlの10×反応緩衝液(最終は70mMトリス-HCl、10mM MgCl₂、5mM DTT、pH 7.6(25にて)である) 10
 (2) 10μl 50% (w/v) PEG-4000(最終濃度10%)
 (3) 2.5μlの10mM ATP(最終濃度500μM)
 (4) 5μl T4 PNK(New England Biolabs)
 (5) 水で50μlにする

【0323】

37にて4時間インキュベートする。

【0324】

ランダムタグをTwist Bioscienceから購入する。これらは、Tm > 55を有する18~25マーの100,000~1000,000のユニークな配列を含み、それぞれに5' DNA_アダプター1オリゴヌクレオチドおよび3' RNA_アダプター1オリゴヌクレオチドを付加し、それぞれ修飾して、特異的末端への付加を確実にする。この反応はバーコードと一緒にライゲートする。 20

【0325】

以下のミックスを200μLにする:

- (1) 20μl 10×緩衝液(1×反応緩衝液(50mM トリス-HCl、pH 7.5、10mM MgCl₂、1mM DTT))
 (2) 100μl 50% PEG 8000(w/v)(1×25% (w/v) PEG 8000)
 (3) 20μl 10mMヘキサミンコバルトクロリド(1×1mMヘキサミンコバルトクロリド) 30
 (4) 20μl (100単位) T4 RNAリガーゼ(New England Biolabs)
 (5) 20μl 10mM ATP(1×1mM ATP)(Sigma)
 (6) 20μl オリゴヌクレオチドミックス(ランダムバーコードオリゴヌクレオチドならびにRNAおよびDNAアダプターの各々水中30μMの等量ミックス)

【0326】

25にて16時間インキュベートする。

【0327】

40μlの10mM トリス-HCl pH 8.0、2.5mM EDTAを添加して反応を停止させる。

【0328】

【表3】

オリゴ名	オリゴ配列	5'修飾	3'修飾
5' DNA_アダプター1	ATTATGACCGTAGGCCCTGGC	なし	なし
3' RNA_アダプター1	CGC GAT ATT AGC CAT TAA CCC	リン酸化	なし
バーコードオリゴ	可変の18~25マー	リン酸化	なし

【0329】

1) 10mM トリス、1mM EDTA(pH 7)緩衝液で300μlを調製し、そしてIllustra S-200マイクロスピinn HRカラム(GE Healthcare)を使用して反応物

40

50

をクリーンアップし、ライゲートしなかったオリゴヌクレオチドおよび試薬を除去する。

【0330】

2) 40 μ l の酢酸ナトリウム pH 5.2 および 2.5 容量 (1 ml) の 100% エタノールを加える。混合し、-20°にて少なくとも 1 時間置き、次に 4°にて 15,000 rpm で 15 分間遠心して DNA をペレットにする。

【0331】

3) 上清を除去し、1 ml の 70% エタノールで洗浄し、5 分間回転させ、洗浄を繰り返し、次いでペレットを風乾させる。

【0332】

4) 25 μ l のヌクレアーゼフリー水にペレットを再懸濁する。

10

【0333】

(5) ビーズへの化合物の付着)

1) 上記化合物に、NH-C_{1,2}-GGGTTAACGGCTAATATCGCG オリゴヌクレオチドを有する 50 μ l のジェネリック付着ビーズを添加する (実施例 3、セクション 2 に記載の通り)。

【0334】

(6) 表現型スクリーン)

実施例 1、セクション 6 に記載の通り。

【0335】

(7) ヒット化合物を同定するための標的の配列決定)

20

実施例 1、セクション 7 に記載の通り。

【0336】

(実施例 4 - タグなし D E C L 合成のためのスプリット - プール法)

広く使用されているスプリット・アンド・プール戦略 (例えば、Mannocci et al. (2011) Chem. Commun., 47: 12747-12753; Mannocci et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 17670-17675 を参照) が、下記の通り、反復化学合成および DNA コード化工程が関与する複数セットの化学部分構造および対応する DNA コードフラグメントの段階的スプリット・アンド・プールコンビナトリアルアセンブリに基づいて、本発明に従って使用する単一ファーマコフォア D E C L を生成するために、使用することができる。

【0337】

30

(1) 概要)

ここで図 1 を参照して、まずガイドオリゴヌクレオチドを官能基化アガロースビーズに付着させる。各ビーズは、オリゴヌクレオチド付着のために、少なくとも 10¹¹ 個の官能基を含む。タグ付き部分構造 (本明細書では「ファーマコア (pharmacore)」と呼ぶことがある) を、切断可能なリンカーを介してガイドオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドに連結し、次いでライゲーションによってガイドオリゴヌクレオチドに付着させる。これは、一次ファーマコアとして機能し、それからさらなるファーマコア (二次、三次などのファーマコア) で「装飾」される (以下に説明する)。

【0338】

40

次いで、連続したラウンドの合成を行い、さらなる部分構造 / ファーマコアとの反応により一次ファーマコア部分構造を装飾する。各反応およびビルディングブロック用のコードオリゴヌクレオチドもまた、ライゲーションによってガイドオリゴヌクレオチドに付加する。ライプラリを、代替ラウンドの化学合成およびコードライゲーションを伴うスプリット・アンド・プール技術を用いて構築する。ライプラリ生成後、各ビーズを単一化合物の複数コピーで装飾する。

【0339】

ここで図 2 を参照して、次いで、ライプラリビーズを、指標細胞を有する微小液滴の内側にカプセル化する (タンパク質標的もまた使用され得る)。化合物は、液滴内で切断可能なリンカーを切断する酵素の添加によって放出され、水性内部に化合物を放出させる。次いで、液滴を所定の期間インキュベートし、化合物の表現型効果を F A C S を用いて測

50

定する。細胞が所望の表現型を示す液滴を選別して、収集する。したがって、ライプラリメンバーコード化するオリゴヌクレオチドは、それが引き起こす表現型効果に物理的には連結していないが、空間的に連結している。

【0340】

化合物の同定は、ガイドオリゴヌクレオチドをビーズからの制限消化によって切断し、続いて配列決定することによって行われる。オリゴヌクレオチドのコード配列は、ファーマコアが曝された合成工程と F A C S によって観察された表現型効果の原因となる化合物の構造とを記述する。ガイドオリゴヌクレオチドの P C R 増幅は、 10^{10} を超えるオリゴヌクレオチド分子が存在するので必要とされないが、必要ならば P C R を使用して増幅することができる。

10

【0341】

このタグ付きライプラリ合成は、D N A コード化（バーコード化）および合成規模の重要な利点を保持しながら、少数の比較的高価なタグ付き化学部分構造を使用する分子ライプラリの合成を可能にする。それはまた、いかなる痕も単一の切断事象から生じる痕まで減少させる。したがって、スプリット・アンド・プール方法は、すべてのファーマコア部分構造単位をタグ付けする必要がないので、既知の化学を利用する多様なファーマコア附加を可能にする。

【0342】

(2) アガロースアミンビーズの官能基化)

アミン官能基化アガロースビーズ (Cube Bioscience) の 5.0 % 懸濁液の 2 m L アリコートを $500 \times g$ で 10 分間遠心し、そして R O 水で 3 回洗浄し、次いで 5 m L の 1.00 mM M E S + 1.50 mM N a C l カップリング緩衝液、p H 5.5 に懸濁した。別個の管中で、アジド官能基化ミックスを調製した。N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S、Sigma Aldrich) の 2.0 mM 溶液 2.5 m L および N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C、Sigma Aldrich) の 2.0 mM 溶液 2.5 m L (両方ともカップリング緩衝液中) を混合した。2 - アジド酢酸 (5 μ L、Carbosynth) を加え、そしてこの混合物を室温で 20 分間反応させた。20 分後、アミンビーズをスピンドウンし、5 m L のアジド官能基化混合物に再懸濁した。この管を室温で 1 時間ローター上に置き、次に回転させ、そして 5 m L の新鮮なアジド官能基化混合物中に再懸濁した。これをローター上に置き、一晩反応させた。次にビーズを 3×5 m L の 1 x P B S (p H 7.4) で洗浄し、次いで 5 m L の 1.00 mM 炭酸水素ナトリウム (p H 7.5) に再懸濁し、必要になるまで 4 にて保存した。

20

【0343】

(3) 官能基化アジド - アガロースビーズへの捕捉オリゴヌクレオチドの付着)

1 m L のアジドビーズストックをスピンドウンし、1 m L の 1.00 mM M O P S 、p H 7.0 で 3 回洗浄した。次にビーズを 7.85μ L の M O P S 緩衝液に懸濁した。100 μ L の捕捉オリゴヌクレオチド (5' - GAAGGGTCGACTAAG ATTATACTGCATAGCTAGGGAAATGGATCCG C C T T T T T T T (Int 5-オクタジイニル(Octadiynyl) Du) T T T T T T T T T G G C G G G A T C C - 3' 、ADT bio、4.8 . 9.2 μ M) を添加し、続いて 1.0 μ L の 5.0 mM トリス (3 - ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル) アミン (T H P T A、Sigma Aldrich) 、5 μ L の 2.0 mM 硫酸銅 (I I) 溶液 (Sigma Aldrich) および 1.00 μ L の 1.0 mM アスコルビン酸ナトリウム (Sigma Aldrich) 溶液を加えた。ビーズをローター上に置き、一晩反応させ、次いで混合物を遠心沈降させ、1 x m L の 1.00 mM M O P S 緩衝液で洗浄し、次いで 7.58 μ L の M O P S 緩衝液、1.00 μ L の 1.0 mM プロパルギルアルコール (Sigma Aldrich) に再懸濁した。続いて 1.0 μ L の 5.0 mM T H P T A 、5 μ L の 2.0 mM 硫酸銅 (I I) 溶液および 1.00 μ L の 1.0 mM アスコルビン酸ナトリウム溶液。1 時間後、ビーズを 3×1 m L の M O P S 緩衝液で洗浄し、次いで 1.00 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液、p H 7.5 に再懸濁した。

30

【0344】

(4) 切断可能なオリゴヌクレオチドの一次ファーマコアとのライゲーション)

40

50

1 m l のアジドアガロースビーズ + 捕捉オリゴヌクレオチドを遠心し、500 μ L のヌクレアーゼフリー水 (NFW) で3回洗浄した後、475 μ L のNFWおよび500 μ L の2×クイックリガーゼ緩衝液 (Quick Ligase Buffer) (NEB) に再懸濁した。15 μ L のペイロードオリゴヌクレオチド (5' ATTCCCTAGCTATGCAAGTrGrArGRrArArGrUX 3'、ここでX=ヘキシルヒドロキシプロリノール、ADTbio、81.53 μ M) を10 μ L のクイックリガーゼと共に加えた。ビーズを37 °Cにて回転させながらインキュベートし、次いで100 mM炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 7.5で3回洗浄しそして必要になるまで4 °Cにて貯蔵した。

【0345】

(5) タグ付け

10

ビーズ上の捕捉オリゴヌクレオチドへのコード化オリゴヌクレオチドのライゲーションによるタグ付けは、ビーズを水中で洗浄することにより行った (5000 gで5分間ビーズを遠心分離し、5×ビーズ容量のヌクレアーゼフリー水 (NFW) に再懸濁し、合計2回洗浄を繰り返す)。次いで、ビーズを5×ビーズ容量のライゲーション混合物 (これは、最終濃度1×クイックリガーゼ緩衝液 (New England Biolabs)、250 nMスプリント (Splint) オリゴヌクレオチド、250 nMコード化オリゴヌクレオチド、20 U / μ l T4 DNAリガーゼ (New England Biolabs) を有し、次いでヌクレアーゼフリー水で5×ビーズ容量にしたものである) 中に再懸濁した。

【0346】

20

ライゲーション効率を試験しそしてライゲーション効率を最大にするために、サンプルを2つに等分 (スプリット) した。一方のサンプルを95 °Cに2分間加熱し、次いでサーマルサイクラー中で0.2 °C / 秒で4 °Cに冷却した。他方のサンプルは熱処理せずに室温で放置した。加熱工程の後にT4 DNAリガーゼ (20 U / μ l) を加えた。

【0347】

30

両方の反応物を37 °Cにて1時間インキュベートしてライゲーションを進行させた。一旦インキュベートしたら、95 °Cに20分間加熱することによりリガーゼを熱失活し、次いで20 U / μ lのBamHI (NEB) を用いてオリゴヌクレオチドをビーズから切り出し、さらに37 °Cにて1時間インキュベートした。ビーズを遠心分離 (5000 g、5分) によってペレット化し、次いで上清を取り除いた。ビーズから切り出した (cute) このDNAを、0.1×容量の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) および2.5×容量の100%エタノールを添加することによって試験のために沈殿させた。次にこれを氷上で1時間インキュベートし、沈殿した物質を17,000 gで20分間の遠心分離によりペレット化し、上清をデカントし、500 μ lの70%エタノールで2回洗浄した。次いでペレットを風乾し、100 μ lのヌクレアーゼフリー水に再懸濁した。次に、この25 μ lを変性ローディング染料 (95%ホルムアミド、0.1%キシレンシアノール、0.1%プロムフェノールブルー、20 mMトリス-塩酸pH 7.5) と1:1で混合し、サンプルを95 °Cにて2分間ボイルし、次いで4 °C / 秒の冷却速度で4 °Cまで冷却した。沈殿したサンプルを次に変性TBEゲル (12.5%ポリアクリルアミド、7 MのUREA) にロードした。150 Vで、室温にて45分間泳動させる。泳動したら、ゲルをミリQグレードの水で2回洗浄して尿素を除去し、次いで1×TBE中で1×SyBr gold (thermoscientific) DNA染色液で20分間染色した後、染色液を除去するために再度2回水で洗浄した。

40

【0348】

次いで、ゲルをSyngene InGenius 3ゲルドックシステムを使用して画像化した (図3)。全ての試薬が存在する場合にライゲーションが起こるが、これは加熱工程を用いた場合により効率的であることが分かる - これは、合成小胞上に各DNAの多数のコピーがあるので、妥当なレベルでライゲーションが生じるために必要とされるわけではない。

【0349】

(6) コード化タグからの化学構造の放出)

50

コード化オリゴヌクレオチドタグは、オリゴヌクレオチドからペイロードを切断するこ

とによって除去される。

【0350】

ここで図4を参照して、リンカーの切断およびファーマコアの放出を示すために、切断可能なオリゴヌクレオチドの配列内の切断可能なリンカーの5'側にフルオロフォア (FITC、図4ではFとして示す)を組み込むオリゴヌクレオチドを作製した。次に、クエンチング分子、BHQ-1を切断可能なリンカーに付着させた。これは、ライプラリ作製において使用される任意の化学構造と同じ様式での切断によって放出され得る。クエンチング剤が切断可能なリンカーから除去されると、オリゴヌクレオチドのライトアップが見られる。

【0351】

それらの関連するリンカーを痕なしに切断する3つの異なる酵素が同定されている (RNase A、RNase T1 AおよびRNase 1 A; 図4においてそれぞれ酵素A、BおよびCと表示)。3つ全部を同胞のリンカーを用いて試験した。それぞれの場合において、10 μlの反応をセットした: 10 mM トリス-HCl、1 mM EDTA、150 nM 切断可能なオリゴヌクレオチド、0.1 μlのストック酵素 (RNase A = 10 mg/ml、RNase T1 = 10 mg/ml、RNase 1 = 1.5 mg/ml)、次いでヌクレアーゼフリー水で10 μlにする。サンプルを37にて15分間インキュベートし、次いで10 μLの変性ローディング染料 (95% ホルムアミド、0.1% キシレンシアノール、0.1% ブロムフェノールブルー、20 mM トリス-HCl pH 7.5) を添加した。サンプルを95にて2分間ボイルし、次いで4/秒で4に急冷した。次にこれらのサンプルを変性TBEゲル (12.5% ポリアクリルアミド、7 M 尿素) にロードした。ゲルを150 Vで75分間泳動し、FITCを励起するSyngene Ingenuity 3システムを用いて画像化した。クエンチング剤の放出は、フルオロフォアが「ライトアップ」として見られそして画像化され得ることを意味する。これは酵素の存在下にて黄色のDNAバンドの出現として見られる。SyBr gold (Thermo) で染色することによりDNAを見ることができ、クエンチング剤が存在する場合にこれもまたクエンチされるが、質量の変化に対応するサイズシフトならびにシグナルの増加が見られる (フルオロフォアの下のグレースケール画像、図4)。両方の場合において、放出が酵素の存在下でのみ起こり、そして急速である (< 15分) ことを見ることができる。さらに、酵素は非常に活性であり、酵素の10倍段階希釈を10 mM トリス-HCl pH 7.5、1 mM EDTA 中で行い、そして反応を同様にして行った。酵素を10^-2から10^-5に希釈した後、RNase Aが10^-4、RNase T1とRNase 1が10^-3で活性を見ることができる。これは、酵素活性の大きな窓があること、およびこのプロセスが複数の酵素に対して10^-4希釈で30分以内に起こり得ることを意味する。

【0352】

また、酵素が液滴環境で機能することを確認した (図5を参照)。RNase Aについての結果を示す。1 mlの水相を10 mM トリス-HCl、1 mM EDTA、150 nM 切断可能なオリゴヌクレオチド、10 μlのストックRNase A (10 mg/ml) を用いて、次いでヌクレアーゼフリー水で1 mlにすることで調製した。100 μmの平均直径の液滴を、2% w/v のGransurf G67 (Grant Industries Inc.) と共に上記のような水相とPSF-2 CST油 (Clearco Products Inc.) で構成される油相と、100 μmエッティング深さチップを用いて作製した。液滴を酵素と共にまたは酵素なしで37にて15分間インキュベートし、それらを482/18 nmで照射するFluor 蛍光顕微鏡および532/59 nmの発光フィルターの下で画像化した。酵素の存在下にて液滴内でライトアップが起こり、反応が液滴環境によって影響されないことが分かる。

【0353】

(7) ヒュースゲン1, 3-双極子環化付加およびチオウレタン形成を用いた切断可能な化学構造ペイロードの官能基化)

切断可能なリンカーおよびコアペイロード (ヘキシニルヒドロキシプロリノール (hexyl

10

20

30

40

50

nyl hydroxyprolinol)) で官能基化されたビーズの 2 つの 1 0 0 μ L 部分を 1 0 0 m M の M O P S p H 7 . 0 で 3 回洗浄し、そして 1 0 0 μ L の同じものの中に再懸濁した。両方の部分に、D M S O 中の 5 - F A M - アジド (Jena Bioscience) の 1 0 m M ストック 2 μ L を加えた。一方の部分を未反応の陰性コントロールとして保持し、他方の部分に 5 μ L の 5 0 m M トリス (3 - ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル) アミン (T H P T A、Sigma Aldrich)、2 . 5 μ L の 2 0 m M 硫酸銅 (I I) (Sigma Aldrich) 溶液および 1 0 0 μ L の 1 0 m M アスコルビン酸ナトリウム (Sigma Aldrich) 溶液を添加した。捕捉オリゴスクレオチドのみで官能基化されたビーズ (切断可能なリンカーまたは機能的コアを含まない) を含むさらなるサンプルも同様に処理した。ビーズをローテーター上に置き、一晩反応させた後、混合物をスピンドウンさせ、1 × m L の 1 0 0 m M M O P S 緩衝液 p H 7 . 0 で洗浄した。

10

【 0 3 5 4 】

官能基化を確認するために、3 0 μ L の N E B 緩衝液 3 . 1、1 0 μ L の B a m H I を有する 2 6 0 μ L のヌクレアーゼフリー水中に懸濁することにより、官能基化ペイロードをビーズサンプルから切り離した。3 7 にて 1 時間インキュベートした後、サンプルを 2 × 1 5 0 μ L ずつに等分 (スプリット) した。5 μ L の R N a s e A を添加し、そしてサンプルを 3 7 にてさらに 1 時間インキュベートし、次いでビーズをペレット化した。上清を清潔なチューブに移し、1 5 μ L の 3 M 酢酸ナトリウム (p H 5 . 2) および 3 7 5 μ L の 1 0 0 % エタノールを加えた。サンプルを - 2 0 にて一晩沈殿させ、次いでペレット化し、5 0 0 μ L の 7 0 % エタノールで洗浄し、そして 2 0 分間風乾させた。ペレットを 2 0 μ L のヌクレアーゼフリー水に再懸濁し、2 0 μ L の変性ローディング染料を加えた (9 5 % ホルムアミド、0 . 1 % キシレンシアノール、0 . 1 % ブロムフェノールブルー、2 0 m M トリス - H C l p H 7 . 5)。サンプルを 9 5 にて 5 分間加熱し、次いで 4 に冷却した。サンプルを T B E 尿素ゲルにロードし、1 0 0 V で 7 5 分間泳動した。

20

【 0 3 5 5 】

図 6 に示されるように、遊離する染色された成分は処理されたサンプル中に見られ、ともにライゲートされた切断可能なリンカー、機能的なコアおよび染料を有し、未ライゲートサンプルに存在する遊離 5 - F A M アジドの存在よりも、官能基化され放出されたコアを示す。

30

【 0 3 5 6 】

別に、官能基化ビーズのさらに 2 つの 1 0 0 μ L 部分を乾燥アセトニトリル (M e C N、Sigma Aldrich) で 3 回洗浄した。一方の部分を、M e C N 中の 1 m M フルオレセインイソチオシアネート異性体 1 (Sigma Aldrich) 中に、M e C N 中のトリエチレンジアミン (Sigma Aldrich) の 1 0 m g / m L 溶液 0 . 6 μ L と共に懸濁した。3 7 にて一晩回転させた後、ビーズを M e C N で 3 回洗浄し、次いで 1 0 0 m M 炭酸水素ナトリウム緩衝液、p H 7 . 5 で 3 回洗浄した。官能基化を確認するために、サンプルを上記のように酵素的に切断し、T B E ゲル上で泳動した。フルオロフォアを観察するために、Syngene InGenius3 ゲルドックシステムを使用してゲルを画像化し、次いで、T B E 中の 5 0 μ L の 1 × Sybr gold で染色した。次に第二の画像を記録した。

40

【 0 3 5 7 】

図 7 に示すように、R N a s e A で処理した消化サンプルにおいて、染料なしのコントロールと比較して強いシグナルが見られ、これは切断された化合物の官能基化を示す。

【 0 3 5 8 】

(8) スプリット・アンド・プール法を用いたタグ付けを伴うビーズ上の 1 0 0 個のメンバーの機能的ライプラリの構築)

アジド官能基化ビーズのストックを、実施例 4 のセクション 3 に記載したように捕捉オリゴで官能基化した。次いで、このビーズストックを、切断可能なペイロードを有する切断可能なオリゴ (5 ' ATTCCCCTAGCTATGCAAGTrGrArGRrArArGrUX 3 '、ここで X = 3 ' - (O - プロパルギル) - アデノシン (ADTBio)) と、実施例 4 (セクション 4) に記載され

50

ているのと同じ技術を使用してライゲートした。血球計により、ビーズの数は 5.6×10^6 ビーズ / mL であると測定された。このストック 200 μ L を、ディープ 96 ウェルプレート (Fisher) の 10 個の別個のウェルに添加した。以下の説明では、特記しない限り、全てのストック溶液は 100 mM MOPS pH 7.0 中で調製した。プレートを遠心分離し、140 μ L の 100 mM MOPS pH 7.0、100 mM を各占有ウェルに添加し、続いて 20 μ L の 50 mM ストックのトリス (3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル) アミン (Sigma-Aldrich) および 10 μ L の 20 mM ストックの 20 mM 硫酸銅 (II) (Sigma-Aldrich) を添加した。

【0359】

10 個の個々に選択されたアジド (10 μ L の 50 mM DMSO、Enamine) の 1 つをそれぞれの別個の占有されたウェルに加えた。20 μ L の 100 mM ストックのアスコルビン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) を添加し、そして平らな密封キャップ (Fisher) を使用してプレートを密封した。プレートを振盪しながら室温にて 18 時間インキュベートした。次いでプレートを遠心分離し、各占有ウェルを 3 x 1 mL のヌクレアーゼフリー水 (NFW、Fisher) で洗浄し、次いで 250 μ L のクイックリガーゼ緩衝液 2 x (NEB) に再懸濁した。

【0360】

200 μ L の 50 mM ストックのコードオリゴ (配列 GAAGGGTCGACTCCGXXXXXXXXXGATGG GCATCATCCT を含み、ここで XXXXXXXXX は、20 個のユニークなコードオリゴのセレクションから選ばれたヌクレオチド (A、C、G または T) のランダム配列を表し、それぞれ Integrated DNA Technologies (IDT) から入手) を各ウェルに加えた。50 μ L の 100 μ M スプリンティングオリゴ (CTT AGT CGA CCC GGC AGG ATG ATG CCC AT/3ddC/ /3ddC = ジデオキシシチジン、IDT) を 2.5 μ L のクイックリガーゼ (NEB) と共に加えた。プレートを密封し、そして振盪しながら 37 にてインキュベートした。

【0361】

10 個のウェルに渡るビーズの各個々の集団は、特定のアジドと結び付けられたユニークな DNA 配列でコード化されており、用いたビルディングブロックをスクリーニング後に追跡して化合物の構造を決定することを可能とした。2 時間インキュベートした後、各ウェルを 3 x 1 mL の NFW で洗浄し、200 μ L の 200 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.5 に再懸濁した。次いで、各ウェルの内容物を 15 mL の遠心分離管内に 2 mL の混合プールとして一緒に合わせ、ボルテックスによって完全に混合した後、新たなディープ 96 ウェルプレート上の 10 個の別個のウェルに 200 μ L ずつに等分 (スプリット) した。プレートを遠心分離し、ビーズを 190 μ L の 200 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5 に再懸濁した。個々に選択された 10 個のアルデヒドのうちの 1 つのストック (83 μ L の 50 mM DMSO ストック、Enamine) を個々のウェルに添加した。次いで、26 μ L の 10 mg / mL ストックのシアノ水素化ホウ素ナトリウム (200 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5 (Sigma-Aldrich) 中) を各占有ウェルに添加した。プレートを密封し、振盪しながら室温で 18 時間インキュベートした。全てのウェルをヌクレアーゼフリー水で 3 x 1 mL 洗浄し、次いで 250 μ L のクイックリガーゼ緩衝液に再懸濁し、そしてアジドブロックについて前述したのと同じプロセスを用いて、各ウェルをユニークなコードオリゴとライゲートした。次いで、各ウェルを 3 x 1 mL の NFW で洗浄し、200 μ L のヌクレアーゼフリー水に再懸濁した後、15 mL 遠心チューブ中の 2 mL ストックにプールした。ビーズをペレット化し、200 μ L の 2 x クイックリガーゼ緩衝液に再懸濁した。200 μ L の 100 μ M ストックのオリゴ (配列 CGGGTCGACTTCGGTTAGACTTCCGACCTGATGGG CATCATCCT を有する) を、10 μ L のクイックリガーゼ (New England Biolabs) と共に添加した。次いでビーズを回転させながら 37 にて 2 時間インキュベートし、次いで 1 mL の 10 mM トリス HCl + 1 mM EDTA pH 7.5 で 3 回洗浄した。ビーズを 1 mL のトリス緩衝液に再懸濁し、次いで必要になるまで 4 にて保存した。

【0362】

(同等)

10

20

30

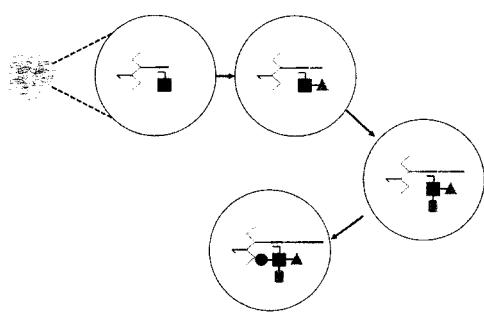
40

40

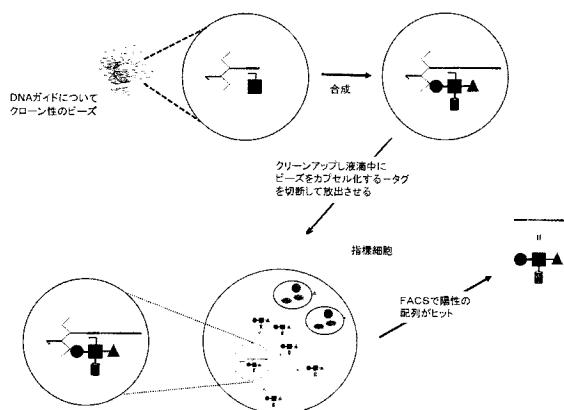
50

前述の説明は、本発明の現在好ましい実施形態を詳述している。これらの説明を考慮すれば、それらの実施における多数の改変および変形が当業者には想起される。それらの改変および変形は、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されている。

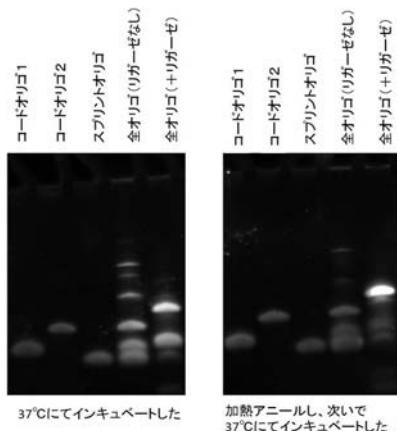
【図 1】



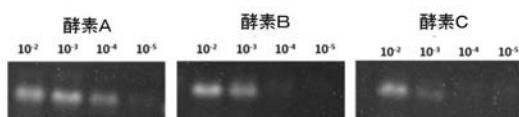
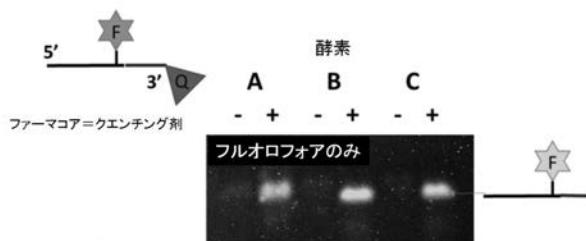
【図 2】



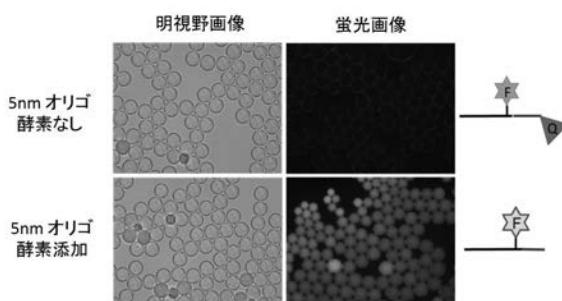
【図 3】



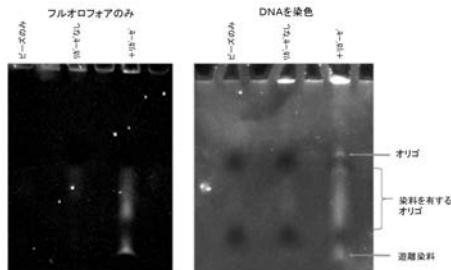
【図4】



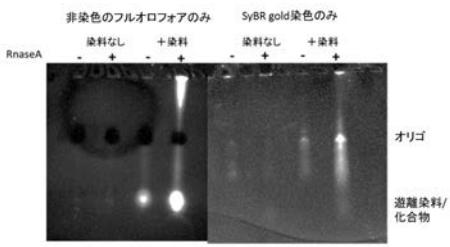
【図5】



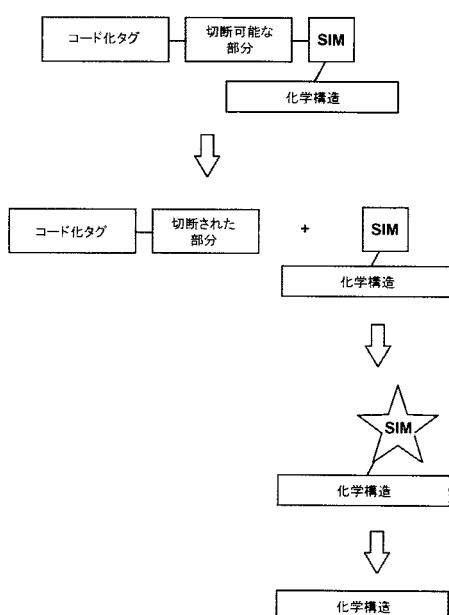
【図6】



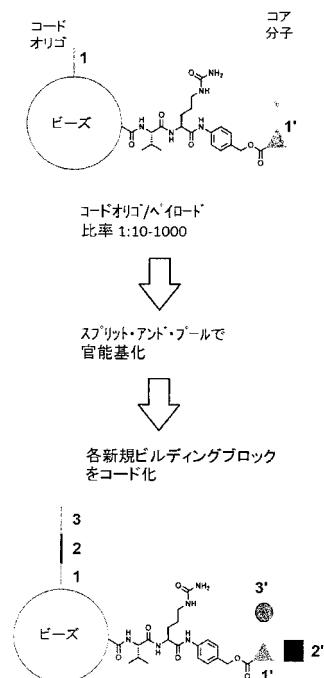
【図7】



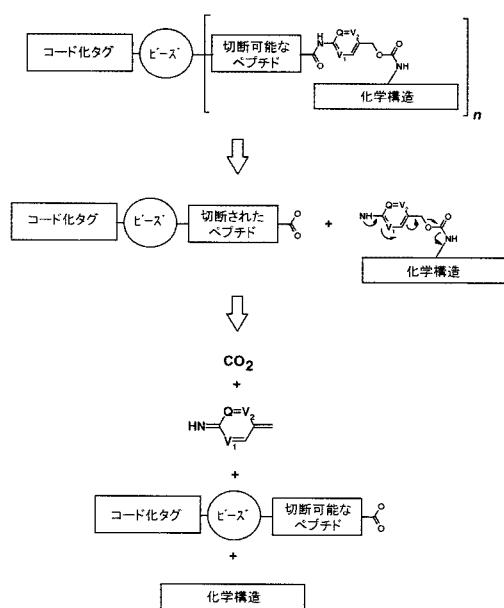
【図8】



【図9】



【図10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2017/053360									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/10 C12Q1/6823 C40B40/06 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12Q C40B											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">NACHIKET SHEMBEKAR ET AL: "Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics", LAB ON A CHIP, vol. 16, no. 8, 18 March 2016 (2016-03-18), pages 1314-1331, XP055451515, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C6LC00249H page 1322; figure 6D</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-86</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">----- WO 2004/087308 A1 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; GRIFFITHS ANDREW DAVID [GB]; ABELL CHRIS [GB] 14 October 2004 (2004-10-14) page 28; figure 2 ----- -----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-86 -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	NACHIKET SHEMBEKAR ET AL: "Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics", LAB ON A CHIP, vol. 16, no. 8, 18 March 2016 (2016-03-18), pages 1314-1331, XP055451515, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C6LC00249H page 1322; figure 6D	1-86	X	----- WO 2004/087308 A1 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; GRIFFITHS ANDREW DAVID [GB]; ABELL CHRIS [GB] 14 October 2004 (2004-10-14) page 28; figure 2 ----- -----	1-86 -/-
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	NACHIKET SHEMBEKAR ET AL: "Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics", LAB ON A CHIP, vol. 16, no. 8, 18 March 2016 (2016-03-18), pages 1314-1331, XP055451515, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C6LC00249H page 1322; figure 6D	1-86									
X	----- WO 2004/087308 A1 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; GRIFFITHS ANDREW DAVID [GB]; ABELL CHRIS [GB] 14 October 2004 (2004-10-14) page 28; figure 2 ----- -----	1-86 -/-									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 16 February 2018		Date of mailing of the international search report 06/03/2018									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aslund, Fredrik									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2017/053360

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/019765 A1 (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LAB EMBL [DE]; GAGNEUR JULIEN [DE]; PELECHA) 16 February 2012 (2012-02-16) example 7 -----	73-84
A	WO 2016/145409 A1 (BROAD INST INC [US]; ECOLE SUPERIEURE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE IND DE) 15 September 2016 (2016-09-15) paragraphs [0130], [0164] - paragraph [0167]; figures 22, 23 -----	1-86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2017/053360

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004087308	A1 14-10-2004	AU 2004226693	A1 14-10-2004	
		CA 2520630	A1 14-10-2004	
		EP 1606049	A1 21-12-2005	
		EP 2540389	A1 02-01-2013	
		JP 6100736	B2 22-03-2017	
		JP 2006521922	A 28-09-2006	
		JP 2012070750	A 12-04-2012	
		JP 2014221907	A 27-11-2014	
		US 2006154298	A1 13-07-2006	
		US 2010210479	A1 19-08-2010	
		WO 2004087308	A1 14-10-2004	
<hr/>				
WO 2012019765	A1 16-02-2012	NONE		
<hr/>				
WO 2016145409	A1 15-09-2016	CN 107614700	A 19-01-2018	
		EP 3268462	A1 17-01-2018	
		WO 2016145409	A1 15-09-2016	
<hr/>				

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	C 4 0 B 30/04	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 3
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	M
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G, T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許序注:以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ウィリアムズ, デイヴィッド ヒュー イギリス国 ケンブリッジシャー エスジー8 6 ピーピー, メルボルン, オーチャード ロード 56, レッドコート ハウス
(72)発明者 マンダール, イプシタ イギリス国 ケンブリッジ シービー1 3 エルキュー, ローズマリー レーン, メリフィールド センター, バクテボ リミテッド内
(72)発明者 ウッド, スチュアート ロバート イギリス国 ケンブリッジ シービー2 4 3 ビーエフ, ロングスタントン, ミッチクラフト ロード 72
(72)発明者 ブラットン, ダニエル イギリス国 ケンブリッジシャー シービー2 2 3 ビーエヌ, ソーストン, ニュー ロード 25

F ターム(参考) 2G045 AA24 CB21
4B029 AA07 BB15 BB20 CC03
4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR66 QS28
QS34 QS36 QX02