

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6164535号
(P6164535)

(45) 発行日 平成29年7月19日 (2017. 7. 19)

(24) 登録日 平成29年6月30日 (2017. 6. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	16/28	(2006. 01)	C O 7 K	16/28	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 27 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-516358 (P2014-516358)
(86) (22) 出願日	平成24年6月21日 (2012. 6. 21)
(65) 公表番号	特表2014-525735 (P2014-525735A)
(43) 公表日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/062036
(87) 国際公開番号	W02012/175643
(87) 国際公開日	平成24年12月27日 (2012. 12. 27)
審査請求日	平成27年6月22日 (2015. 6. 22)
(31) 優先権主張番号	61/571, 159
(32) 優先日	平成23年6月21日 (2011. 6. 21)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	11181357.2
(32) 優先日	平成23年9月15日 (2011. 9. 15)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	509333933
	フエー・イー・ペー・フエー・ゼット・ウ エー
	ベルギー国、ペー・9052・ヘント、レ イファイセストラート・120
(73) 特許権者	509333922
	フリエ・ユニベルシテイ・ブリュッセル
	ベルギー国、ペー・1050・ブリュッセル、 ブレインラン・2

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GPCR：Gタンパク質複合体に対して作製された結合ドメインおよびそれに由来する使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 (1) :

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域 (FR1からFR4) および3つの相補性決定領域 (CDR1からCDR3) を含むアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインであって、前記免疫グロブリン単一可変ドメインが、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体を標的とするか、かつ/または特異的に結合し、前記複合体中のGPCRではなくGタンパク質に特異的に結合し、CDR1は配列番号13であり、CDR2は配列番号25であり、CDR3は配列番号37であるか；CDR1は配列番号15であり、CDR2は配列番号27であり、CDR3は配列番号39であるか；または、CDR1は配列番号16であり、CDR2は配列番号28であり、CDR3は配列番号40である、免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 2】

ヘテロ三量体Gタンパク質単独への結合と比べて、より高い親和性で前記複合体に結合する請求項1に記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 3】

前記複合体が、受容体リガンドをさらに含む請求項1に記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 4】

前記受容体リガンドが、アゴニストである請求項 3 に記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 5】

G タンパク質が、ヌクレオチドがない形態である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 6】

前記 G タンパク質のアルファとベータサブユニット間の界面で立体構造エピトープに特異的に結合する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 7】

a) ヌクレオチドの存在下で前記複合体の解離を防ぐか、もしくは阻害する、または
b) G タンパク質へのヌクレオチドの結合を防ぐか、もしくは阻害する、または
c) G タンパク質からヌクレオチドを移動させることができる、
請求項 1 から 6 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

10

【請求項 8】

前記ヌクレオチドが、GDP もしくは GTP などのグアニンヌクレオチドまたは GTPγS などのそのアナログである請求項 5 または 7 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 9】

GPCR が、活性立体構造状態である請求項 1 から 8 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

20

【請求項 10】

G タンパク質が、Gs、Gi、Go、Gt、Ggust、Gz、Golf、Gq、G12、G13 からなる群から選択される請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 11】

前記 GPCR が、ヒトタンパク質である請求項 1 から 10 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 12】

免疫グロブリン単一可変ドメインが、ナノボディ (VHH) である請求項 1 から 11 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

30

【請求項 13】

ナノボディが、配列番号 1、3 及び 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 12 に記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 14】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインが、ポリペプチドに含まれる請求項 1 から 13 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 15】

請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインを含む複合体。

【請求項 16】

請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列をコードする配列を含む核酸。

40

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組換えベクターまたは請求項 16 に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 19】

GPCR と、G タンパク質と、任意選択的に受容体リガンドとを含む複合体を活性立体構造で安定化するための、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインの使用。

【請求項 20】

50

ヌクレオチドまたはそのアナログの存在下で前記複合体の解離を防ぐための、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

ヌクレオチドが、グアニンヌクレオチド又はそのアナログである請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

アナログが GTPγS である請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

GPCR と、Gタンパク質と、任意選択的に受容体リガンドを含む複合体を結晶化するか、かつ／または該複合体の構造を解明するための、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインの使用。

10

【請求項 24】

GPCR のシグナル伝達活性を調節する化合物についてスクリーニングするための、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインまたは請求項 18 に記載の細胞または請求項 18 に記載の細胞の膜調製物の使用。

【請求項 25】

GPCR および Gタンパク質を含む複合体を捕捉するか、かつ／または精製する方法であって、

a) 請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインを用意する段階と、

20

b) 前記免疫グロブリン単一可変ドメインを、GPCR と、Gタンパク質と、任意選択的に受容体リガンドを含む複合体に結合させる段階と、

c) 任意選択的に、段階 b) において形成された複合体を単離する段階とを含む方法。

【請求項 26】

GPCR および Gタンパク質を含む複合体を標的とする、かつ／または特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを産生する方法であって、

a) 適切な細胞発現系において請求項 16 に記載の核酸を発現させる段階と、任意選択的に、

b) 免疫グロブリン単一可変ドメインを単離および／または精製する段階とを含む方法。

30

【請求項 27】

GPCR および Gタンパク質を含む複合体を標的とする、かつ／または特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインについてスクリーニングする方法であって、

a) Gタンパク質及び受容体リガンドに結合した GPCR を含む標的複合体により動物（ヒトを除く）を免疫して、複数の免疫グロブリン単一可変ドメインを生じさせる段階と、

b) GPCR および Gタンパク質を含む複合体における Gタンパク質に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインについて、前記複数の免疫グロブリン単一可変ドメインをスクリーニングする段階と、

40

c) 前記複合体に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを単離する段階とを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）構造生物学およびシグナル伝達分野に関する。特に、本発明は GPCR：Gタンパク質複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインに関する。そのような結合ドメインをコードする核酸配列およびそのような結合ドメインを発現するまたは発現することができる細胞も提供される。本発明の結合ドメインは、下流の Gタンパク質と複合体を形成し、種々の天然また

50

は合成リガンドに結合しているGタンパク質共役受容体の構造的および機能的特徴付けのため、Gタンパク質活性化の動的特徴を調べるためならびにGPCR：Gタンパク質複合体を利用するスクリーニングおよび創薬努力のための汎用ツールとして用いられ得る。

【背景技術】

【0002】

7回膜貫通受容体(7TMR)は、Gタンパク質共役受容体(GPCR)とも呼ばれているが、ヒトゲノムにおいて最大クラスの受容体であり、医薬治療法のためのもっとも広く標的にされるタンパク質クラスである。薬理学からインビボでの機能的特徴付けまで多様なGPCRの理解はこの30年でかなり前進してきた。最近の高分解能構造研究は、GPCR活性化および構成的活性についての分子機構を明らかにしてきた(たとえば、Rasmussenら2011年)。しかし、GPCRがその下流標的の活性とどのように相互作用し調節しているのかについての分子詳細はいまだに不足している。その下流タンパク質と複合体を形成したGPCRの構造は、これらの相互作用が薬理学的に関連しているからというだけではなく、分子間相互作用の原子的理解が、機能的選択性の秘密、すなわち、異なるアゴニストが一種類の受容体から別個の下流効果を達成させる能力を解き明かすので、非常に興味深い。最近の構造データによれば、GPCRは、そのサイズは小さいけれども、複数のシグナル伝達出力を有する精巧なアロステリック機械であるというアイデアが支持されている。

【0003】

GPCRは、活性化されると、ヘテロ三量体Gタンパク質または $G\alpha\beta\gamma$ として知られる3つのタンパク質の複合体を介してGTP依存的な形態でそのシグナルを伝達する。細胞外リガンドがGPCRに結合すると、 $G\alpha\beta\gamma$ においてGDP-GTP交換を触媒するその能力を調節し、それによって二次メッセンジャーの細胞内レベルを調節する。不活性 $G\alpha\beta\gamma$ ヘテロ三量体は2つの主要なエレメント、 $G\alpha$ -GDPおよび $G\beta\gamma$ ヘテロ二量体で構成されている。 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ 上のスイッチIIエレメントを隔離し、その結果、スイッチIIエレメントはcAMP、ジアシルグリセロールおよびカルシウムを伴う系などの二次メッセージ系と相互作用することができない。活性化されたGPCRはGDPの $G\alpha$ からの放出を触媒し、GTPが結合して活性化された $G\alpha$ -GTPサブユニットを遊離させることが可能になる。この状態では、スイッチIIはGTPの γ -リン酸により安定化されるヘリックスを形成し、前記ヘリックスがアデニルシクラーゼなどのエフェクターと相互作用することが可能になる。 $G\alpha$ サブユニットがどのようにしてその下流標的と相互作用しその活性を調節するかについての理解は大いに前進したが、活性化されたGPCRが $G\alpha\beta\gamma$ 上でのヌクレオチド交換を触媒することによりどのようにしてこのプロセスを開始するのかははっきりしていない。

【0004】

創薬の努力は一般的には、出発点として標的の静的モデルを使用して、特定の触媒または活性部位に競合的に結合する小分子リガンドに焦点を合わせる。この方法により、今日使用されている多数の活性部位治療法が同定され検証されてきた。しかし、新薬化合物の高い失敗率(第1相臨床治療法のうち最終的に食品医薬品局の承認を得るのはおよそ8%のみと推算されており、薬剤あたり8億ドルの保存費が掛かっている)に反映されるように、多くの努力がうまくいかず、多くの場合、標的は新薬の開発につながらないと見なされると破棄される(LeeおよびCraink、2009年)。これらの失敗のうちの相当な部分が、問題の標的のもっとも突き出した立体構造が、薬剤が治療的徴候にとって効果的であるためには結合しなければならない新薬の開発につながる立体構造と一致していないという事実に起因する。たとえば、アゴニスト結合活性状態GPCR構造を得るための努力により、Gタンパク質の非存在下でのこの状態の固有の不安定性のせいで困難を伴うことが判明している。最近では、Gタンパク質を模倣しオルソステリック部位でアゴニストに対する親和性を増加する立体構造選択的な安定化に寄与するナノボディまたはグザペロン(Xaperone)(登録商標)を利用してGPCRの活性状態の構造を得ることが可能になった(Rasmussenら2011年)。これにより、治療的関連立体

構造においてもっとも難解な薬剤標的の構造をロックするXaperones（登録商標）の威力（SteyaertおよびKobilka、2011年）および特定の標的に対するより高い感受性および選択性を有する潜在的薬剤について特異的にスクリーニングすることができる指向性創薬のためのその有用性（WO2012007593）が実証されている。この技術的アプローチの1つの限界は、GPCR標的ごとに特異的な安定化に寄与するナノボディを同定する必要があることであり、そのために時間がかかり高価であるだけでなく、中でも免疫化および選択目的のための生体物質のような異なるツールの利用能も暗に意味している。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0005】

【特許文献1】国際公開第2012/007593号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Rasmussenら、2011年、NATURE 469, 175-180

【非特許文献2】LeeおよびCrainik、2009年、Science, April; 324 (5924): 213-5

【非特許文献3】SteyaertおよびKobilka、2011年、Curr Opin Struct Biol. Aug; 21 (4): 567-72

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、GPCR薬剤標的の構造および薬理学的解析のための新しい直接的なツールの開発が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

その下流ヘテロ三量体Gタンパク質と複合体を形成し、様々な天然および合成リガンドに結合しているGPCRの構造的および機能的特徴を解明することは、GPCRシグナル伝達の機構を理解するためにも、ならびに創薬の努力のためにも価値がある。たとえば、アゴニスト、GPCRおよびGタンパク質で構成されている活性状態三元複合体の構造を得ることは今までのところ成功していないが、その生物学の理解が不十分なためにシグナル伝達の構造生物学において大いに望まれていた。この複合体の結晶生成は、1つのパートナー（受容体）が可溶化されるためには界面活性剤を必要とし、Gタンパク質は界面活性剤中では不安定であるために、極めて困難であることが判明していた。その上、複合体の形成に必要なヌクレオチドは過渡過程の複合体を解離させもする。

30

【0009】

したがって、全く予想外に、本発明者らはGPCRとGタンパク質の複合体を安定化するツールであって、そのような複合体を捕捉し精製し、最終的にそのような複合体を結晶化することを可能にするツールを同定した。これにより、たとえば、構造ベースのパーティクルスクリーニングもしくは設計、ハイスループットスクリーニングまたは断片ベースの創薬によりリガンドまたは薬剤化合物の同定が促進されることになる（たとえば、実施例10参照）。さらに具体的には、本発明者らは、アゴニスト、GPCRおよびGタンパク質で構成されている活性状態複合体の構造的および機能的解析に適した結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインを同定した（たとえば、実施例4-7参照）。興味深いことに、これらのGPCR：Gタンパク質複合体選択的結合ドメインの一部はGタンパク質に対して特異的に作製されており、GPCRに対してではないことが実証された。たとえば、ベータアドレナリン受容体に接触することなくGαsとGβγの界面でGsに結合する結合ドメインが同定され（たとえば、実施例3参照）、したがって、アルギニンバソプレシン受容体2（V2R）について実証されたように、他のGs共役受容体を捕捉し

40

50

安定化するのに有用であることになる（たとえば、実施例9参照）。したがって、結合ドメインがGPCR：Gタンパク質複合体のGタンパク質に対して作製されているのは、そのような結合ドメインはその特定のGタンパク質と相互作用するGPCRの範囲の活性状態複合体を安定化し捕捉する一般的ツールとして使用することができるので、特に有利な点である。

【0010】

したがって、第一の態様によると、本発明は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインに関する。さらに具体的には、本明細書に記載される結合ドメインは、それぞれGタンパク質単独および／またはGPCR単独に結合することと比べた場合、GPCR：Gタンパク質複合体により高い親和性で結合する。その上、本明細書に記載される結合ドメインは、GPCRに対するGタンパク質の親和性を増強する。したがって、本発明は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体の立体構造エピトープに対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインを提供し、前記複合体を特定の立体構造状態、さらに具体的には活性な立体構造状態で安定化するもしくはロックする。

10

【0011】

一般には、本明細書に記載される結合ドメインは、GPCRとGタンパク質の複合体により利用可能または接近可能になるどんな立体構造エピトープにも結合し得る。これらの立体構造エピトープは、前記複合体中に含まれる個々のタンパク質により表されてもよいおよび／または複合体を形成した際にのみ表されてもよい。さらに、これらの立体構造エピトープは、個々のタンパク質単独により表されても表されなくてもよい。一特定の実施形態によれば、本明細書に記載される結合ドメインは、前記複合体中に含まれるGタンパク質に特異的に結合するが、GPCRには結合しない。

20

【0012】

典型的には、本来、Gタンパク質はヌクレオチド結合型である。さらに具体的には、Gタンパク質（または、少なくとも α サブユニット）は、本明細書においてさらに記載されるように、特定のGPCRの活性化状態に応じて、GTPまたはGDPのどちらかに結合している。アゴニストがGPCRに結合すると、GDPが結合した $G\alpha\beta\gamma$ ヘテロ三量体との相互作用が促進され、GDPと $G\alpha$ 上のGTPが交換されて、Gタンパク質は追加の細胞内シグナル伝達のために必要とされる $G\alpha-GTP$ と $G\beta\gamma$ サブユニットに機能的に解離する。特定の実施形態では、本明細書に記載される結合ドメインは、ヌクレオチドの非存在下ではGPCR：Gタンパク質複合体に特異的に結合して前記複合体を安定化し、さらに具体的には、前記結合ドメインは、Gタンパク質が無ヌクレオチド形態であるGPCR：Gタンパク質複合体に結合して前記複合体を安定化する。特定の実施形態では、本明細書に記載される結合ドメインは、前記Gタンパク質のアルファとベータ-ガンマサブユニット間の界面で立体構造エピトープに特異的に結合することになり、したがってGDP/GTP結合部位を遮断し、GDP/GTP結合に干渉する。したがって、驚くべきことに、本明細書に記載される結合ドメインは、ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドまたはGTP γ Sなどのそのアナログの存在下でGPCR：Gタンパク質複合体の解離を妨げるまたは阻害する。その上、本明細書に記載される結合ドメインは、ヌクレオチドのGタンパク質への結合を防ぐまたは阻害する。

30

40

【0013】

好ましくは、本明細書に記載される結合ドメインは、GPCR、Gタンパク質および1つ以上の受容体リガンドを含む複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。典型的には、前記受容体リガンドは、アゴニストもしくはポジティブアロステリックモジュレーターまたはそれらの組合せになる。

【0014】

別の好ましい実施形態によると、本明細書に記載される結合ドメインは、Gsタンパク質共役受容体およびGsタンパク質を含む複合体に、またはGiタンパク質共役受容体およびGiタンパク質を含む複合体に、またはGtタンパク質共役受容体およびGtタンパ

50

ク質を含む複合体に、またはG g u s t タンパク質共役受容体およびG g u s t タンパク質を含む複合体に、またはG z タンパク質共役受容体およびG z タンパク質を含む複合体に、またはG o l f タンパク質共役受容体およびG o l f タンパク質を含む複合体に、またはG q タンパク質共役受容体およびG q タンパク質を含む複合体に、またはG 1 2 タンパク質共役受容体およびG 1 2 タンパク質を含む複合体に、またはG 1 3 共役受容体およびG 1 3 タンパク質を含む複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。前記複合体に含まれるG P C Rおよび／またはGタンパク質は、同じまたは異なる種由来、特に哺乳類種由来でもよい。好ましくは、G P C Rはヒトタンパク質である。

【0015】

一般に、本発明の結合ドメインは、G P C R：Gタンパク質複合体に特異的に結合することができるいかなる天然に存在しない分子またはその部分であっても可能である。特に、本明細書に記載される結合ドメインは、以下の式(1)：

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域(FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(CDR1からCDR3)を含むアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインである。

【0016】

好ましくは、本明細書に記載される結合ドメインは、ラクダ科の種由来の免疫グロブリン単一可変ドメインであり、特にナノボディまたはV_HHである。

【0017】

特定の実施形態によると、本明細書に記載される結合ドメインは、以下の式(1)：

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域(FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(CDR1からCDR3)を含むアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインであり、CDR1は

a) 配列番号13-18、
b) 配列番号13-18と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
c) 配列番号13-18と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチドからなる群から選択され、CDR2は

a) 配列番号25-30、
b) 配列番号25-30と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
c) 配列番号25-30と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチドからなる群から選択され、CDR3は

a) 配列番号37-42、
b) 配列番号37-42と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
c) 配列番号37-42と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチドからなる群から選択される。

【0018】

特に好ましい実施形態では、本発明は、以下の式(1)：

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域(FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(CDR1からCDR3)を含み、CDR1は配列番号13、CDR2は配列番号25、CDR3は配列番号37であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

【0019】

極めて特定の実施形態によると、結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号1から6からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0020】

さらに、本明細書に記載される結合ドメインはポリペプチドに含まれていてもよい。その上、前記結合ドメインは固体支持体上に固定化されていてもよい。

10

20

30

40

50

【0021】

一特定の態様では、本発明はGタンパク質に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインに関する。

【0022】

本発明の別の態様は、本明細書に記載される結合ドメインを含む複合体を想定している。特に、前記複合体は、GPCR、Gタンパク質および場合によって受容体リガンドを含む。ある種の適用では、本明細書に記載される前記複合体は結晶である。

【0023】

さらに、本発明は、核酸配列、特に本明細書に記載される結合ドメインのうちのいずれかの任意のアミノ酸配列をコードする核酸配列、ならびに本明細書に記載される核酸配列のうちのいずれかを含む組換えベクターを提供する。本発明の特に好ましい態様は、本明細書に記載されるベクターまたは核酸のいずれかを含み、したがってGPCRおよび／またはGタンパク質を発現することがあるまたは発現することができる細胞である。本発明に従った細胞の細胞培養物ならびにそれに由来する膜調製物も本発明の範囲内である。

10

【0024】

本明細書に記載される結合ドメイン、複合体および細胞は、種々の文脈および適用において有用であり得る。このように、したがって、本発明の一態様は、GPCRおよびGタンパク質、ならびに場合によって受容体リガンドを含む複合体を、機能的な立体構造状態で、さらに具体的には活性な立体構造状態で安定化するための本明細書に記載される結合ドメインの使用に関する。一特定の実施形態では、本明細書に記載される結合ドメインを使用して、ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドまたはGTPγSなどのそのアナログの存在下で前記複合体の解離を防ぐことができる。したがって、GPCR：Gタンパク質複合体を安定化し、GPCRを機能的な立体構造状態、好ましくは活性な立体構造状態で遮断するためのツールとしての結合ドメインは、今後概要を述べるように、一定範囲の適用に非常に有用である。

20

【0025】

GPCRおよびGタンパク質、ならびに場合によって受容体リガンドを含む複合体を結晶化するおよび／または前記複合体の構造を解明することが、本明細書に記載される結合ドメインの使用に対する本発明の目的である。

【0026】

本明細書に記載される結合ドメインまたは本明細書に記載される細胞もしくはそれに由来する膜調製物を使用して、GPCRのシグナル伝達活性を調節する化合物についてスクリーニングすることも本発明の範囲内で想定されている。

30

【0027】

さらに、本明細書に記載される結合ドメインを使用して、1つ以上の相互作用をするタンパク質、特にGタンパク質とおよび／またはGPCRと相互作用するタンパク質を捕捉し得る。

【0028】

特定の実施形態によると、本発明はGPCRおよびGタンパク質を含む複合体を捕捉および／または精製する方法であって、

40

- a) 本明細書に記載される結合ドメインを用意する段階、
 - b) 前記結合ドメインをGPCRおよびGタンパク質ならびに場合によって受容体リガンドを含む複合体に結合させる段階、ならびに
 - c) 場合によって、段階b)において形成される複合体を単離する段階
- を含む方法を提供する。

【0029】

別の特定の実施形態では、本発明は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体の結晶構造を決定する方法であって、

- a) 本明細書に記載される結合ドメインを用意する段階、
- b) 前記結合ドメインをGPCRおよびGタンパク質ならびに場合によって受容体リガ

50

ドを含む複合体に結合させる段階、ならびに
c) 段階b)において形成される複合体を結晶化する段階
を含む方法に関する。

【0030】

本明細書に記載される結合ドメインの一部は治療上の有用性を有し得る。したがって、本明細書に記載される結合ドメインを使用してGPCR受容体シグナル伝達、特にGタンパク質媒介GPCR受容体シグナル伝達を調節することも本発明の目的である。

【0031】

本発明は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインを産生する方法であって、

a) 適切な細胞発現系において本明細書に記載される核酸を発現させる段階、ならびに場合によって

b) 前記結合ドメインを単離および／または精製する段階
を含む方法をさらに包含する。

【0032】

本発明の別の態様は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインについてスクリーニングする方法であって、

a) 複数の結合ドメインを用意する段階、

b) GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に結合する結合ドメインについて前記複数の結合ドメインをスクリーニングする段階、ならびに

c) 前記複合体に結合する結合ドメインを単離する段階
を含む方法に関する。

【0033】

本発明の他の目的は、本明細書における記載からさらに明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】a) β_2 AR:Gs複合体に対するGタンパク質サイクルを示す図である。細胞外アゴニストが β_2 ARに結合すると、膜貫通セグメントの細胞質末端が立体構造的に再配置され、Gsヘテロ三量体(α 、 β および γ)が受容体(R、R*)に結合できるようになる。GDPは、R:G複合体が形成されると α サブユニットから放出される。GTPは無ヌクレオチド α サブユニットに結合して、 α および $\beta\gamma$ サブユニットが受容体から解離する。前記サブユニットはそのそれぞれのエフェクタータンパク質のアデニリルサイクラーゼ(AC)および Ca^{2+} チャネルを調節する。Gsヘテロ三量体は、 α サブユニットにおけるGTPのGDPへの加水分解に続いて α および $\beta\gamma$ サブユニットから再構成される。b) β_2 AR:Gs複合体に対するGタンパク質サイクルを示す図である。精製された無ヌクレオチド β_2 AR:Gsタンパク質複合体は界面活性剤ミセル中に維持される。Gs α サブユニットは2つのドメイン、Rasドメイン(α Ras)と α ヘリックスドメイン(α AH)からなる。両方ともヌクレオチド結合に関与している。無ヌクレオチド状態では、 α AHドメインは α Rasドメインに対して様々な位置を有する。

【図2】安定な β_2 AR:Gs複合体の形成を示す図である。安定な β_2 AR:Gs複合体は、1) 高親和性アゴニストを受容体に極めて遅い解離速度で結合させる(Rasmussenら、2011年に記載される)；2) 放出されたGDPを加水分解するアピラーゼの存在下で無ヌクレオチド複合体を形成し、GDPが再結合してR:G相互作用の安定性が低下するのを防ぐ；および3) DDMをMNG-3に界面活性剤交換して前記複合体を安定化する、の併用効果により達成された。

【図3-1】a) β_2 AR:Gs複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。分析的ゲル濾過は、ヌクレオチドGDPおよびGTP γ S(0.1mM)が β_2 AR-365:Gs複合体の解離を引き起こすことを示している。b) β_2 AR:Gs複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。リン酸のピロリン酸およびホスカルネット(5mMで

10

20

30

40

50

使用)がヌクレオチドリン酸基に類似していることは複合体の崩壊を引き起こさなかった。リン酸のピロリン酸およびホスカルネットは、 $T4L-\beta 2AR:Gs$ 複合体(ナノボディなし)、 $T4L-\beta 2AR:Gs:Nb37$ および $T4L-\beta 2AR:Gs:Nb35$ の両方の結晶成長を改善したので添加物としての役割を果たした。

【図3-2】c) $\beta 2AR:Gs$ 複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。結晶化スクリーンの調製を導くためにpH限界が決定された。同じ目的で、イオン強度の効果(データは示されず)は、NaClを様々な濃度で使用して決定された。前記複合体は20、100および500mMでは安定であるが、2.5M NaClでは解離する。

【図3-3】d) $\beta 2AR:Gs$ 複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。ナノボディ35(Nb35、赤破線)は $T4L-\beta 2AR:Gs:Bl167107$ 三元複合体(青実線)に結合して、処理されたR:G複合体(緑破線)とは対照的に、GTPγS処理(緑実線)に非感受性であるR:G:Nb35複合体(赤実線)を形成する。Nb35およびNb37はGsヘテロ三量体上の別々のエピトープに結合してR:G:Nb35:Nb37複合体(紫実線)を形成する。

【図3-4】e) $\beta 2AR:Gs$ 複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。ナノボディ36(Nb36、赤破線)はR:G複合体(黒実線)に結合して、GTPγS処理(緑実線)に感受性が低いR:G:Nb36複合体(赤実線)を形成する。Nb36およびNb37はGsヘテロ三量体上の別々のエピトープに結合して、R:G:Nb36:Nb37複合体(紫実線)を形成する。

【図3-5】f) $\beta 2AR:Gs$ 複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。ナノボディ37(Nb37、緑線)はR:G複合体(黒実線)に結合してR:G:Nb37複合体(赤実線)を形成する。g) $\beta 2AR:Gs$ 複合体の安定性に対するヌクレオチドアナログ、pHおよびナノボディの効果を示す図である。R:G:Nb37複合体は、処理されたR:G複合体(青破線)とは対照的にGTPγS処理(青実線)に非感受性である。

【図4】a) R:G複合体に対するMNG-3の安定化効果を示す図である。4℃での48時間のインキュベーションに続いて、DDM(黒)、MNG-3(青)または2つのMNG-3アナログ(赤および緑)において精製された $\beta 2AR-365:Gs$ 複合体の分析的ゲル濾過。DDMとは対照的に、R:G複合体はMNG界面活性剤中では安定している。b) R:G複合体に対するMNG-3の安定化効果を示す図である。3H-ジヒドロアルプレノロール(3H-DHA)飽和結合によりアッセイされた場合の、界面活性剤の臨界ミセル濃度(CMC)より下でのDDMまたはMNG-3におけるリガンド非結合精製 $\beta 2AR$ を希釈する効果。DDMにおいて維持される $\beta 2AR$ をCMCの1000分の1未満に希釈すると20秒後に3H-DHA結合(黒データ点)が失われる。これとは対照的にCMCの1000分の1未満に希釈されたMNG-3における $\beta 2AR$ は24時間後、放射性リガンドに結合する全能力を維持した。

【図5】R:G複合体の精製および均一性を示す図である。a) $T4L-\beta 2AR:Gs$ 精製の種々の段階で得られる試料の分析的SDS-PAGE/クーマシーブルー染色。過剰量のGsヘテロ三量体中でのBl167107アゴニスト結合、脱リン酸化および脱グリコシル化受容体は、Gタンパク質の機能的部分との最適結合効率のために使用される。Gsの機能的精製は、非機能的/非結合Gsは洗い流される一方でM1樹脂上に固定化された受容体とのその相互作用を通じて実現される。b) 4つの連続調製用ゲル濾過のうちの1つの代表的溶出プロファイル、分画は赤で示されている。R:G複合体を含有する画分は指示された破線内にプールされ、スピン濃縮され、c)におけるSDS-PAGE/クーマシーブルー(a、右側から2番目のレーン)、ゲル濾過によりおよびd)における陰イオン交換クロマトグラフィーにより純度および均一性について解析された。上パネルは、脱リン酸化されず不均一な調製物を生じる複合体(下パネル)と比べて、複合体形成に先立ってλPPaseで処理された $\beta 2AR-365:Gs$ 複合体の分析的IECからの溶出プロファイルを示す。b)における指示された破線外の画分内の均一性が低い材料

10

20

30

40

50

は、様々な化学物質の存在下でのR：G複合体の分析的ゲル濾過実験のために使用された（図1の例）。

【図6】Nb35を用いてR：G複合体を調製するための精製手順のフローチャートを示す図である。

【図7】a) Nb35の精製およびR：G：Nb混合率の決定を示す図である。ナノボディ35（Nb35）のニッケル親和性クロマトグラフィー精製に続く分取イオン交換クロマトグラフィー。ナノボディは2つの集団（赤で示す）中に小ピークおよび大均一ピークとして溶出され、収集され、スピン濃縮され、（b）に示されるR：G複合体を用いた適切な混合率の決定に続く結晶学のために使用された。b) Nb35の精製およびR：G：Nb混合率の決定を示す図である。アゴニスト結合T4L-β2AR：Gs複合体は、そのタンパク質濃度に基づいてわずかに過剰のNb35（1から1.2のモル比のR：G複合体対Nb35）と混合され、分析的ゲル濾過により確かめられた。

【図8】スポンジ様中間相におけるT4L-β2AR：Gs：Nb35複合体の結晶を示す図である。

【図9-1】a) β₂AR：Gs複合体の全体構造を示す図である。複合体の格子パッキングは、結晶内の受容体とGタンパク質の交互層を示している。大量の接触は水層内のタンパク質間で形成されている。b) β₂AR：Gs複合体の全体構造を示す図である。非対称ユニット内容物の全体構造は、β₂AR（緑）がアゴニスト（黄球体）に結合し、Gsα（橙）との広範な相互作用に参与していることを示している。GsαはGβ（青緑）およびGγ（紫）と一緒にヘテロ三量体Gタンパク質Gsを構成している。Gs結合ナノボディ（Nb35、赤）はαとβサブユニット間のGタンパク質に結合している。ナノボディ（Nb35）は、β₂ARのアミノ末端に融合されたT4リゾチーム（紫紅色）と同様に、結晶化を促進する。

【図9-2】c) β₂AR：Gs複合体の全体構造を示す図である。生物学的複合体が結晶化を省くことは助けとなり、細胞膜内でのその位置および配向を示す。

【図10】a) B1-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複体内でのNb35とGsの相互作用を示す図である。Nb35（赤）のCDR1（空間充填表示）とGβ（空間充填、青緑）の相互作用についての2つの代表的表示。b) B1-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複体内でのNb35とGsの相互作用を示す図である。Nb35（赤）のCDR3（空間充填表示）とGsα（空間充填、橙）およびGβ（空間充填、青緑）の相互作用についての2つの代表的表示。GsαおよびGβとの相互作用により、Nb35は複合体の立体構造柔軟性を減少することがある。c) B1-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複体内でのNb35とGsの相互作用を示す図である。Nb35（空間充填表示、赤）のフレームワーク領域とGsα（橙）の相互作用についての2つの代表的表示。

【図11】a) 隣接する複合体のNb35とGsαサブユニット間の結晶接触を示す図である。-x, y-1/2, -z+1対称関連複合体のNb35（赤、空間充填表示）およびGsα（橙）を伴う結晶接触。b) 隣接する複合体のNb35とGsαサブユニット間の結晶接触を示す図である。x, y-1, z対称関連複合体のNb35（赤、空間充填表示）およびGsα（橙）を伴う結晶接触。

【図12-1】a) 活性および不活性β2AR構造の比較を示す図である。不活性カラゾロール結合β2AR構造（青、Rosenbaumら、2007年）と比べたβ2AR：Gs構造（緑）の側面図および細胞質図。TM5およびTM6の細胞内ドメインについては著しい構造変化が見られる。TM5は2つの螺旋回転により拡張しており、TM6は、2つの構造においてGlu268（黄色矢印）のα炭素で測定した場合14 Å外側に移動している。b) 活性および不活性β2AR構造の比較を示す図である。ナノボディ安定化している活性状態β2AR：Nb80構造（橙、Rasmussenら、2011年）と比べたβ2AR：Gs。

【図12-2】c) 活性および不活性β2AR構造の比較を示す図である。細胞質側から見たE/DRYおよびNPxxYモチーフにおける残基ならびにβ2AR：Gsおよびβ

10

20

30

40

50

2AR: Nb80 構造の他のキーとなる残基の位置。β2AR: Nb80 構造中でナノボディと相互作用する Arg131 を除いて、すべての残基が極めて類似する位置を占めている。

【図13-1】 a) R: G 界面における残基の電子密度の図である。TM3 の細胞質末端の D/ERY モチーフ。電子密度マップは 1 シグマで輪郭を描いた 2Fo-Fc マップである。b) R: G 界面における残基の電子密度の図である。E/DRY モチーフの Arg131 と C 末端 GαS の Tyr391 間のパッキング相互作用。電子密度マップは 1 シグマで輪郭を描いた 2Fo-Fc マップである。c) R: G 界面における残基の電子密度の図である。TM7 の細胞質末端の NPxxY。電子密度マップは 1 シグマで輪郭を描いた 2Fo-Fc マップである。

10

【図13-2】 d) R: G 界面における残基の電子密度の図である。Thr68 および Tyr141 の E/DRY モチーフの Asp130 との相互作用。IL2 の Phe139 は GαS 中の疎水性ポケットに埋もれている。電子密度マップは 1 シグマで輪郭を描いた 2Fo-Fc マップである。e) R: G 界面における残基の電子密度の図である。ヌクレオチド結合に参与している GαS の β1-α1 ループ (P-ループ)。電子密度マップは 1 シグマで輪郭を描いた 2Fo-Fc マップである。

【図14】 a) 受容体: G タンパク質相互作用を示す図である。GαS の α5 ヘリックスは、膜貫通型ヘリックス 5 および 6 の開口により受容体の細胞内側上に形成された空洞に入り込む。膜貫通コア内では、相互作用は主に非極性である。例外は、TM3 における保存された DRY 配列の Arg131 に対する α5 ヘリックスの Tyr391 のパッキングを含む (図13 も参照)。Arg131 も、TM7 における保存された NPxxY 配列の Tyr に対して詰め込まれる。b) 受容体: G タンパク質相互作用を示す図である。GαS の α5 ヘリックスは、膜貫通型ヘリックス 5 および 6 の開口により受容体の細胞内側上に形成された空洞に入り込む。α5 ヘリックスは、受容体から抜けると、TM5 および TM3 との極性相互作用のネットワークを形成する。c) 受容体: G タンパク質相互作用を示す図である。受容体残基の Thr68 および Asp130 は Tyr141 を介して β2AR の IL2 ヘリックスと相互作用し、受容体の Phe139 が G タンパク質表面上の疎水性ポケットに入り込み、それによって受容体-G タンパク質相互作用を β2AR の高度に保存された DRY モチーフに構造的に連結するように、前記ヘリックスを配置する。

20

【図15】 a) GαS の立体構造変化を示す図である。β2AR: Gs 複合体中の GαS (橙) の GTPγS 結合 GαS (灰色) との比較 (PDB ID: 1AZT; Sunahara ら、1997 年)。GTPγS は球体として示されている。GαS のヘリックスドメイン (GαS AH) は、GTPγS 結合状態でのその位置と比べて劇的な移動を示している。b) GαS の立体構造変化を示す図である。GαS の α5-ヘリックスは回転され、β2AR の方に移動され、そうでなければ GTPγS 結合ポケットの一部を形成する β6-α5 ループを攪乱している。c) GαS の立体構造変化を示す図である。GαS の β1-α1 ループ (P-ループ) および β6-α5 ループは、GTPγS-GαS 構造中の GTPγS のそれぞれリン酸およびプリン環と相互作用する。d) GαS の立体構造変化を示す図である。β1-α1 および β6-α5 ループは無ヌクレオチド β2AR: Gs 構造に再配置される。

30

40

【図16】 Nb37 が GTPγS の GαS への結合を阻害することを示す図である。ボディパイ-GTPγS (100 nM) は 1 μM の精製された GαS と一緒にインキュベートされ、蛍光増加は漸増する濃度の Nb37 の存在下、リアルタイムで測定された。

【図17】 Nb35 は GTPγS の GαS への結合に影響を与えないことを示す図である。ボディパイ-GTPγS (100 nM) は 1 μM の精製された GαS と一緒にインキュベートされ、蛍光増加は漸増する濃度の Nb35 の存在下、リアルタイムで測定された。

【図18】 Nb35 が GTPγS の Gsαβγ ヘテロ三量体への結合を阻害することを示す図である。ボディパイ-GTPγS (100 nM) は 1 μM の精製された Gsαβγ ヘテロ三量体と一緒にインキュベートされ、蛍光増加は漸増する濃度の Nb35 の存在下、リアルタイムで測定された。

50

【図19】a) 安定なAVP:NT4LV2R:Gs複合体の精製を示す図である。Ni-NTA続いてFLAG-タグ親和性精製を使用するAVP:NT4LV2R:Gs複合体の精製の略図。b) 安定なAVP:NT4LV2R:Gs複合体の精製を示す図である。親和性精製されたAVP:NT4LV2R:GsのSECクロマトグラム。c) 安定なAVP:NT4LV2R:Gs複合体の精製を示す図である。精製スキームをモニターするSDS-page。レーン1:FLAG-タグ親和性カラムのフロースルー;レーン2:精製に先立つAVP、NT4LV2RおよびGsの混合物;レーン3:分子マーカー;レーン4:SECから溶出したAVP:NT4LV2R:Gs複合体;レーン5:Ni-NTA続いてFLAG-タグ親和性精製後のAVP:NT4LV2R:Gs複合体。

【図20】SECによりモニターされるAVP:NT4LV2R:Gs複合体の安定性を示す図である。破線:氷上24時間インキュベーション後のAVP:NT4LV2R:Gs複合体のSECクロマトグラム。青線:氷上48時間インキュベーション後のAVP:NT4LV2R:Gs複合体のSECクロマトグラム。赤線:10 μ MのアнтаゴニストSR121463と一緒に前記複合体のインキュベーション後のAVP:NT4LV2R:GsのSECクロマトグラム。

【発明を実施するための形態】

【0035】

定義

特定の実施形態に関して、特定の図面を参照しつつ本発明を説明するが、本発明は、これらに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。特許請求の範囲におけるいかなる引用符号も、範囲を限定するものとして解釈するべきではない。記載されている図面は模式的なものでしかなく、非限定的である。図面において、ある要素のサイズは誇張されている可能性があり、例証目的のスケールで描かれてはいない。本明細書および特許請求の範囲において、用語「含む」が用いられている場合、この用語は、他の要素または段階を除外しない。単数名詞について言及する際に不定冠詞または定冠詞（たとえば、「a」または「an」、「the」）が用いられている場合、特に他の事柄の記載がない限り、これは該名詞の複数を包含する。その上、本明細書および特許請求の範囲における、第1、第2、第3等の用語は、類似の要素間を区別するために用いられており、必ずしも連続的または経時的な順を説明するために用いられていない。このように用いられる用語は、適切な状況下において互換的であり、本明細書に記載されている本発明の実施形態は、本明細書において記載または説明されている以外の順序で実施できることを理解されたい。

【0036】

本明細書において他に定義がなされていなければ、本発明に関連して用いられている科学および技術用語および語句は、当業者によって一般に理解されている意味を持つ。一般に、本明細書に記載されている、分子および細胞生物学、遺伝学、タンパク質、核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して用いられている命名法ならびにその技法は、本技術分野において周知のものであり、一般に用いられている。本発明の方法および技法は、一般に、他に断りがなければ、本技術分野において周知の、本明細書を通じて引用、記述されている様々な一般的な参考文献およびより具体的な参考文献に記載されている従来の方法に従って実施される。たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1989）；Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates（1992、および2002の別冊号）を参照されたい。

【0037】

用語「結合ドメイン」または「タンパク質結合ドメイン」は、特異的分子間相互作用を用いてタンパク質またはペプチドと結合することができる、任意の非天然起源の分子またはその部分を一般に意味する。タンパク質性分子（タンパク質、ペプチド、タンパク質様

またはタンパク質含有)、核酸分子(核酸、核酸様、核酸含有)および炭水化物分子(炭水化物、炭水化物様、炭水化物含有)等が挙げられるが、これらに限定されない様々な分子が、タンパク質結合ドメインとして機能し得る。本明細書においてより詳細な説明をさらに見出すことができる。

【0038】

用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、「ペプチド」は、本明細書において互換的に用いられており、コードされたおよびコードされていないアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸および修飾ペプチド骨格を有するポリペプチドを包含し得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー型を意味する。

【0039】

本明細書において、用語「タンパク質複合体」または単に「複合体」は、2以上の会合したポリペプチド鎖の群を意味する。タンパク質複合体におけるタンパク質は、非共有結合性タンパク質-タンパク質相互作用により連結されている。「四次構造」は、タンパク質複合体における会合し折り畳まれたタンパク質の構造的配置である。前記複合体は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれよりも多いポリペプチドを含む多量体複合体でもよいことは理解される。その上、前記複合体は非タンパク質性分子をさらに含んでもよい。

【0040】

本明細書において、用語「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、「核酸」は、互換的に用いられ、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれかまたはそれらのアナログである、任意の長さのヌクレオチドのポリマー型を意味する。ポリヌクレオチドは、いかなる三次元構造であってもよく、公知または未知のいかなる機能を果たし得る。ポリヌクレオチドの非限定的な例として、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、伝令RNA(mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、調節領域、任意の配列の単離RNA、核酸プローブおよびプライマーが挙げられる。核酸分子は、直鎖状であっても環状であってもよい。

【0041】

本明細書において、用語「リガンド」または「受容体リガンド」は、細胞内または細胞外のいずれかにおいてGPCRと特異的に結合する分子を指す。リガンドは、タンパク質、(ポリ)ペプチド、脂質、小分子、タンパク質スキャフォールド、抗体、抗体断片、核酸、炭水化物でよいが、これらに制限する目的はない。リガンドは、合成であっても天然起源であってもよい。用語「リガンド」は、自然のGPCRに対する内在性の天然リガンドである、「自然のリガンド」を包含する。ほとんどの場合、リガンドは、細胞において発現されたGPCRと接触、たとえば、結合したときに、細胞内応答を増加または減少させる「修飾因子」である。修飾因子であるリガンドの例は、アゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニストおよびアンタゴニストを包含するが、これらは、本明細書においてより詳細な説明をさらに見出すことができる。

【0042】

タンパク質の用語「立体構造」または「立体構造状態」は、タンパク質が、任意の瞬間において形をとり得る構造の範囲を一般に意味する。当業者であれば、立体構造または立体構造状態の決定因子が、タンパク質のアミノ酸配列(修飾アミノ酸を包含する)に反映されるタンパク質の一次構造およびタンパク質を取り巻く環境を包含することを認識する。タンパク質の立体構造または立体構造状態は、タンパク質二次構造(たとえば、とりわけ α -ヘリックス、 β -シート)、三次構造(たとえば、ポリペプチド鎖の三次元フォールディング)および四次構造(たとえば、ポリペプチド鎖と他のタンパク質サブユニットとの相互作用)等の構造的特色にも関する。とりわけリガンド結合、リン酸化、硫酸化、糖鎖付加または疎水性基の付着等、ポリペプチド鎖に対する翻訳後および他の修飾は、タンパク質の立体構造に影響し得る。その上、とりわけ周囲の溶液のpH、塩濃度、イオン強度および浸透圧ならびに他のタンパク質および補助因子との相互作用等の環境要因が、

10

20

30

40

50

タンパク質立体構造に影響を及ぼし得る。タンパク質の立体構造状態は、活性もしくは別の分子との結合の機能アッセイまたは他の方法の中でもX線結晶構造解析、NMRもしくはスピン標識等の物理的方法のいずれかによって決定され得る。タンパク質立体構造および立体構造状態の総合的な考察のため、Cantor and Schimmel、Biophysical Chemistry、第I部：The Conformation of Biological Macromolecules、W. H. Freeman and Company、1980およびCreighton、Proteins：Structures and Molecular Properties、W. H. Freeman and Company、1993を参照されたい。「特異的立体構造」または「特異的立体構造状態」は、タンパク質が形をとり得る立体構造または立体構造状態の範囲の任意のサブセットである。

10

【0043】

本明細書における「機能的立体構造」または「機能的立体構造状態」は、タンパク質が、ダイナミックレンジ、特に活性なしから最大活性にわたる活性を有する様々な立体構造状態を保有するとの事実を意味する。機能的立体構造状態の例には、活性立体構造および不活性立体構造が含まれる。「機能的立体構造状態」とは、活性がないことを含むいかなる活性でも有するGPCRの任意の立体構造状態を含めることを意図されており、タンパク質の変性状態を含めることは意図されていないのは明らかであるはずである。ここで想定されている特定のクラスの機能的立体構造とは「新薬の開発につながる立体構造」であり、一般には、標的タンパク質の独自の治療関連立体構造状態のことである。事例として、 $\beta 2$ アドレナリン受容体の活性立体構造は、喘息の治療のためのこの受容体の新薬の開発につながる立体構造に対応する。したがって、新薬の開発につながることは、治療徴候に応じて特定の立体構造に限定されることは理解される。

20

【0044】

GPCRの機能的立体構造（本明細書において定義されている）に関する表現「ロックする」または「トラップする」または「固定する」または「凍結する」とは、本明細書で使用される場合、GPCR：Gタンパク質複合体と本発明に従った結合ドメインとの相互作用の効果のため、他に仮定され得る可能な立体構造のサブセットにおけるGPCRの保持または維持である。したがって、「立体構造的にトラップされた」または「立体構造的に固定された」または「立体構造的にロックされた」いるまたは「立体構造的に凍結された」タンパク質は、本明細書で使用される場合、GPCR：Gタンパク質複合体と本発明に従った結合ドメインとの相互作用の効果のせいで、他に仮定され得る可能な立体構造のサブセットにおいて維持されたタンパク質である。この文脈内では、タンパク質の特定の立体構造または立体構造状態に特異的にまたは選択的に結合する結合ドメインとは、前記タンパク質に仮定し得る他の立体構造または立体構造状態よりも高い親和性で立体構造または立体構造状態のサブセットにおけるタンパク質と結合する結合ドメインのことである。当業者であれば、タンパク質の特定の立体構造または立体構造状態に特異的にまたは選択的に結合する結合ドメインはこの特定の立体構造または立体構造状態を安定化することになることは認識される。

30

【0045】

本明細書において、抗体の文脈における用語「相補性決定領域」または「CDR」は、H（重）またはL（軽）鎖（それぞれ V_H および V_L とも略される）いずれかの可変領域を意味し、抗原標的と特異的に結合することができるアミノ酸配列を含有する。これらのCDR領域は、抗体の特定の抗原決定基構造に対する基礎特異性の原因となる。このような領域は、「高頻度可変領域」とも称される。CDRは、可変領域内のアミノ酸の非近接なストレッチを表すが、生物種にかかわらず、可変重および軽鎖領域内のこれらの重大な意味を持つアミノ酸配列の位置的配置は、可変鎖のアミノ酸配列内において同様の配置を有することが判明した。あらゆる標準的抗体の可変重および軽鎖はそれぞれ、個々の軽（L）および重（H）鎖毎に、それぞれ互いに非近接である3個のCDR領域（L1、L2、L3、H1、H2、H3と称する）を有する。特に、ナノボディ（本明細書でさらに定

40

50

義される)などの免疫グロブリン単一可変ドメインは、一般に4つの「フレームワーク配列もしくは領域」またはFR (FR1、FR2、FR3、FR4と呼ばれる)および3つの「相補性決定領域」またはCDR (CDR1、CDR2、CDR3と呼ばれる)を含み、それぞれその他とは隣接していない単一アミノ酸鎖を含む。CDR配列の描写(したがってまたFR配列の描写)は、VドメインおよびV様ドメインのIMGT独自の番号方式に基づく(Leffrancら、2003)。

【0046】

本明細書における「エピトープ」は、ポリペプチドの抗原決定基を意味する。エピトープは、該エピトープ独特の空間的立体構造における3個のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも4、5、6、7個のこのようなアミノ酸からなり、さらに通常は、少なくとも8、9、10個のこのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間的立体構造を決定する方法は、本技術分野において公知のものであり、たとえば、X線結晶構造解析および多次元核磁気共鳴を包含する。

10

【0047】

本明細書における「立体構造エピトープ」は、ポリペプチドの折り畳まれた三次元立体構造に独特である、空間的な立体構造におけるアミノ酸を含むエピトープを意味する。一般に、立体構造エピトープは、タンパク質の折り畳まれた構造において一体となる、直鎖状配列において非連続的なアミノ酸からなる。しかし、立体構造エピトープはまた、ポリペプチドの折り畳まれた三次元立体構造に独特の立体構造の形をとる(変性状態には存在しない)アミノ酸の直鎖状配列からなる。タンパク質複合体において、立体構造エピトープは、異なる折り畳まれたポリペプチドのフォールディングおよび独自の四次構造におけるそれらの会合により一体となる、1つまたは複数のポリペプチドの直鎖状配列における非連続的なアミノ酸からなる。ここで同様に、立体構造エピトープはまた、一体となって四次構造に独特の立体構造の形をとる、1つまたは複数のポリペプチドのアミノ酸の直鎖状配列からなる可能性がある。

20

【0048】

用語「特異性」とは、本明細書で使用される場合、結合ドメイン、特に抗体などの免疫グロブリンまたはナノボディなどの免疫グロブリン断片が異なる抗原に対比して1つの抗原に優先的に結合する能力のことであり、必ずしも高親和性(本明細書でさらに定義される)を意味しない。特定の抗原または抗原決定基(たとえば、エピトープ)に特異的に結合することができるおよび/またはこれらに対する親和性を有する結合ドメイン、特に抗体などの免疫グロブリンまたはナノボディなどの免疫グロブリン断片は、前記抗原または抗原決定基に「対する」または「対して作製されている」と言われる。本発明に従った結合ドメインは、それがこれら両方の異なる抗原または抗原決定基に対して特異的である場合には、2つの異なる抗原または抗原決定基に「交差反応的」とであると言われる。

30

【0049】

本明細書における用語「親和性」は、抗原および結合ドメインの平衡状態をその結合によって形成される複合体の存在に向かってシフトさせるような、結合ドメイン、特に抗体等の免疫グロブリンまたはナノボディ等の免疫グロブリン断片が抗原と結合する程度を意味する。よって、たとえば、相対的に等濃度の抗原および抗体(断片)が組み合わせられる場合、高親和性の抗体(断片)は、利用できる抗原と結合して、その結果生じる高濃度の複合体に向けて平衡状態をシフトさせる。解離定数は、タンパク質結合ドメインおよび抗原標的の間の親和性を説明するよう一般に用いられる。通例、解離定数(K_d)は、 10^{-5} Mよりも低い。好ましくは、解離定数は、 10^{-6} Mよりも低く、より好ましくは、 10^{-7} Mよりも低い。もっとも好ましくは、解離定数は、 10^{-8} Mよりも低い。

40

【0050】

本明細書における用語「特異的に結合」および「特異的結合」は、結合ドメイン、特に、抗体等の免疫グロブリンまたはナノボディ等の免疫グロブリン断片の、異なる抗原の均一な混合物に存在する特定の抗原と優先的に結合する能力を一般に意味する。ある特定の実施形態において、特異的結合相互作用は、試料における望ましいおよび望ましくない抗

50

原の間を識別し、一部の実施形態において、約10倍超から100倍以上（たとえば、約1000または10,000倍超）で識別する。

【0051】

用語「特異的に結合」、「選択的に結合」、「優先的に結合」およびそれらの文法的な均等語は、本明細書において互換的に用いられる。用語「立体構造特異的」または「立体構造選択的」も、本明細書において互換的に用いられる。

【0052】

「欠失」は、それぞれ1つまたは複数のアミノ酸またはヌクレオチド残基が、親ポリペプチドまたは核酸のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかにおける変化として本明細書において定義されている。タンパク質またはその断片の文脈において、欠失は、約2、約5、約10、最大約20、最大約30または最大約50以上のアミノ酸の欠失に関与し得る。タンパク質またはその断片は、2以上の欠失を含有し得る。GPCRの文脈において、欠失は、特にループ欠失であっても、Nおよび／またはC末端欠失であってもよい。

【0053】

「挿入」または「付加」は、親タンパク質のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較した、それぞれ1つまたは複数のアミノ酸またはヌクレオチド残基の付加をもたらした、アミノ酸またはヌクレオチド配列における変化である。「挿入」は、ポリペプチドのアミノ酸配列内部への1つまたは複数のアミノ酸残基への付加を一般に意味するが、一方、「付加」は、挿入となることができる、またはNもしくはC末端または両末端に付加されたアミノ酸残基を意味し得る。タンパク質またはその断片の文脈において、挿入または付加は、通常、約1、約3、約5、約10、最大約20、最大約30または最大約50以上のアミノ酸の挿入または付加である。タンパク質またはその断片は、2以上の挿入を含有し得る。

【0054】

本明細書における「置換」は、親タンパク質またはその断片のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較した、それぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドによる1つまたは複数のアミノ酸またはヌクレオチドの置き換えに起因する。タンパク質またはその断片が、タンパク質の活性における効果が実質的にない保存的アミノ酸置換を有し得ることが理解される。保存的置換は、gly、ala；val、ile、leu、met；asp、glu；asn、gln；ser、thr；lys、arg；cys、met；およびphe、tyr、trp等、所望の組合せによるものである。

【0055】

本明細書で使用される用語「配列同一性」とは、配列が比較の窓にわたりヌクレオチド対ヌクレオチドベースでまたはアミノ酸対アミノ酸ベースで同一である程度のことである。したがって、「配列同一性の百分率」は、比較の窓にわたり2つの最適に整列された配列を比較し、同一の核酸塩基（たとえば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（たとえば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、CysおよびMet）が両方の配列に存在する位置の数を決定して適合する位置の数を得、適合する位置の数を比較の窓における全位置数（すなわち、窓サイズ）で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることにより計算される。配列同一性の百分率を決定することは手動で、または当技術分野で利用可能であるコンピュータプログラムを利用して行うことが可能である。

【0056】

本明細書における「結晶」または「結晶構造」は、その構成原子、分子またはイオンが3つの空間的次元すべてに広がって整然と反復したパターンに配置された固体材料を意味する。液体または液体に溶解された材料から結晶構造を形成するプロセスは、多くの場合、「結晶化」または「結晶生成」と称される。タンパク質結晶は、ほとんどの場合、溶液において成長する。もっとも一般的なアプローチは、その構成分子の溶解性を徐々に低く

することである。溶液における結晶成長は、2段階によって特徴付けられる。すなわち、顕微鏡レベルの結晶子（恐らく100分子しかない）の核形成と、続く、該結晶子の理想的には回折品質の結晶への成長。

【0057】

本明細書における「X線結晶構造解析」は、X線ビームを結晶に当て、多くの特異的な方向に回折させる、結晶内の原子の配置を決定する方法である。この回折したビームの角度および強度から、結晶学者は、結晶内電子の密度の三次元像を作成することができる。当業者に公知であるように、この電子密度から、結晶における原子の平均的な位置ならびにその化学結合、その無秩序（disorder）および様々な他の情報が決定され得る。

10

【0058】

本明細書における用語「原子座標」は、分子構造内の原子の三次元座標のセットを意味する。一実施形態において、原子座標は、生物物理学分野の当業者にとって周知の方法に従ったX線結晶構造解析を用いて得られる。簡単に説明すると、X線回折パターンは、結晶からのX線を回折することによって得ることができる。回折データは、結晶を含む単位格子の電子密度マップの計算に用いられる。前記マップは、単位格子内の原子の位置（すなわち、原子座標）の確立に用いられる。当業者であれば、X線結晶構造解析によって決定された構造座標のセットが、標準誤差を含有することを理解する。他の実施形態において、原子座標は、電子回折（電子結晶構造解析としても知られる）および核磁気共鳴（NMR）方法を包含し得る他の実験生物物理学的構造決定方法を用いて得ることができる。さらに他の実施形態において、原子座標は、アブイニシオなタンパク質フォールディングアルゴリズム、エネルギー最小化および相同性に基づくモデリングのうち1つまたは複数に基づき得られる分子モデリングツールを用いて得ることができる。これらの技法は、生物物理学および生物情報学分野における当業者にとって周知のものである。

20

【0059】

本明細書における「構造を解明すること」は、タンパク質の原子の配置または原子座標の決定を意味し、多くの場合、X線結晶構造解析等の生物物理学的方法によってなされる。

【0060】

本明細書における用語「化合物」または「試験化合物」または「候補化合物」または「薬物候補化合物」は、スクリーニングアッセイまたは創薬アッセイ等、アッセイにおいて検査される天然起源または合成いずれかの任意の分子を説明する。そのようなものとして、これらの化合物は、有機および無機化合物を含む。化合物は、低分子量によって特徴付けられたポリヌクレオチド、脂質またはホルモンアナログを包含する。他のバイオポリマー有機試験化合物は、抗体、抗体断片または抗体コンジュゲート等、約2から約40アミノ酸を含む小分子ペプチドまたはペプチド様分子（ペプチド模倣物）および約40から約500アミノ酸を含むより高分子のポリペプチドを包含する。試験化合物は、タンパク質スキュフォールドでもよい。ハイスループットな目的のため、十分な範囲の多様性をもたらすコンビナトリアルまたはランダム化ライブラリー等の試験化合物ライブラリーを用いることができる。例として、天然化合物ライブラリー、アロステリック化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー、抗体断片ライブラリー、合成化合物ライブラリー、断片ベースのライブラリー、ファージディスプレイライブラリー等が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書においてより詳細な説明をさらに見出すことができる。

30

40

【0061】

本明細書において、用語「決定する」、「測定する」、「評価する」、「モニターする」および「アッセイする」は、互換的に用いられ、量的および定性的決定の両方を包含する。

【0062】

GPCRに関して用語「生物活性のある」は、天然起源のGPCRの生化学的機能（たとえば、結合機能、シグナル伝達機能またはリガンド結合の結果立体構造を変化させる能

50

力)を有するGPCRを意味する。

【0063】

本明細書における用語「治療上有効量」、「治療上有効用量」および「有効量」は、所望の結果（単数または複数）の達成に必要とされる量を指す。

【0064】

本明細書における用語「薬学的に許容される」は、生物学その他の観点から望ましくないことのない材料を指し、すなわち、材料が、望ましくない生物学的効果を決して生じないまたはそれを含有する医薬組成物の他の成分のいずれとも有害な様式で相互作用しない化合物と共に個体に投与され得ることを指す。

詳細な説明

GPCRを活性化し得るリガンドは極めて多様であるが、リガンドは比較的少数の細胞内タンパク質と相互作用して顕著な生理的变化を誘導する。ヘテロ三量体Gタンパク質、βアレスチンおよびGPCRキナーゼは、GPCRをその活性状態で特異的に認識する能力で周知であるが、構造的ならびに機能的観点の両方からは十分に理解されていない。したがって、驚くべきことにおよび有利なことに、GPCR：Gタンパク質複合体に特異的に結合し、前記複合体を機能的立体構造状態で、特に活性な立体構造状態で安定化するまたはロックすることができる結合ドメインが同定された。さらに、前記結合ドメインは一般に好まれるGPCRを、GPCRの活性状態（本明細書において定義されている）を表すと一般に仮定されているそのGタンパク質結合状態で安定化および捕捉するための一般的ツールである。

【0065】

したがって、本発明の第1の態様は、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に向けられているおよび／または特異的に結合する結合ドメインに関する。

【0066】

本発明の結合ドメインは、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体と特異的に結合することができる任意の非天然起源の分子またはその部分（上文に定義されている）であり得る。好ましい一実施形態に従えば、本明細書に記載されている結合ドメインは、タンパク質スキヤフォールドである。用語「タンパク質スキヤフォールド」は、別の分子、たとえばタンパク質との結合のためのフレームワークを含む構造、特にタンパク質またはペプチド構造を形成するフォールディング単位を一般に意味する（概説として、たとえば、Skerre (2000)を参照されたい）。結合ドメインは、天然起源の分子、たとえば、自然または獲得免疫系の成分に由来し得るまたは全く人工的に設計され得る。結合ドメインは、免疫グロブリンに基づいてもよくまたは微生物タンパク質、プロテアーゼ阻害剤、毒素、フィブロネクチン、リポカリン、単鎖アンチパラレルコイルド大腸菌タンパク質 (single chain antiparallel coiled coil proteins) もしくは反復モチーフタンパク質等が挙げられるが、これらに限定されないタンパク質に存在するドメインに基づいてもよい。本技術分野における公知の結合ドメインの例として、抗体、重鎖抗体 (hcAb)、単一ドメイン抗体 (sdAb)、ミニボディ、ラクダ科動物重鎖抗体に由来する可変領域 (VHHまたはナノボディ)、サメ抗体に由来する新規抗原受容体の可変領域 (VNAR)、アルファボディ、プロテインA、プロテインG、設計アンキリンリピートドメイン (DARPin s)、フィブロネクチン III型リピート、アンチカリン、ノッチン、操作されたCH2ドメイン (ナノ抗体)、ペプチドおよびタンパク質、リポペプチド (たとえば、ペプデュシン (pepducin))、DNAならびにRNA (たとえば、Gebauer & Skerre, 2009; Skerre, 2000; Starovasnikら、1997; Binzら、2004; Koideら、1998; Dimitrov、2009; Nygrenら、2008; WO2010066740を参照されたい) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。多くの場合、選択方法を用いて特定の種類の結合ドメインを作製する際、ランダム化された相互作用残基候補を含有するコンセンサスまたはフレームワーク配列を含むコンビナトリアルライブラリーが、タンパク質等の対象の分子への結合に関するスクリーニ

10

20

30

40

50

ングに用いられる。

【0067】

本発明の結合ドメインは、一般に好まれる任意のGPCR：Gタンパク質複合体に対して作製されおよび／または特異的に結合してもよい。好ましい標的複合体は、天然に存在するGPCRとGタンパク質の複合体、または、代わりに、たとえば、GPCRおよびGタンパク質の天然には存在しないバリエーション（本明細書でさらに説明される）の場合は、GPCRおよびGタンパク質が適切な生理的条件下で会合することになる複合体である。GPCRとGタンパク質間の構造的関係が、特定のGPCR：Gタンパク質複合体が形成され得るかどうかを決定することは当業者であれば理解され、これはGタンパク質ファミリーのメンバーおよびGPCRファミリーのメンバーについてさらに下で詳細に論じられることになる。

10

【0068】

「Gタンパク質」は、化学シグナルを細胞の外に伝達し細胞の内部で変化を引き起こすことに関与するグアニンヌクレオチド結合タンパク質のファミリーを意味する。Gタンパク質は、リガンドがGPCRの細胞外ドメインに結合することにより細胞内シグナル伝達におけるキーとなる分子成分である。Gタンパク質は「ヘテロ三量体Gタンパク質」または「大Gタンパク質」とも呼ばれる。Gタンパク質は、3つのサブユニット、アルファ（ α ）、ベータ（ β ）およびガンマ（ γ ）からなり、その分類はその特徴的 α サブユニットの独自性およびその後の伝達事象の性質に大いに基づいている。Gタンパク質の追加の分類は、cDNA配列相同性解析から生まれた。Gタンパク質は、グアノシン二リン酸（GDP）またはグアノシン三リン酸（GTP）のどちらかに結合し、高度に相同的なグアニンヌクレオチド結合ドメインならびに受容体およびエフェクターとの相互作用のための特徴的ドメインを有する。とりわけ、 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 、 $G_{\alpha q}$ および $G_{\alpha 12}$ などの G_{α} タンパク質の異なるサブクラスは、cAMP、イノシトール三リン酸（IP3）、ジアシルグリセロール、細胞内 Ca^{2+} およびRhoA、GTPアーゼなどの二次メッセンジャー分子を伴う特徴的経路を通じてシグナルを送る。このことをさらに説明すれば、 α サブユニット（39-46 kDa）はグアニンヌクレオチド結合部位を含有しており、GTPアーゼ活性を有し、 β （37 kDa）および γ （8 kDa）サブユニットは緊密に会合しており $\beta\gamma$ ヘテロ二量体として機能する。23種類（いくつかのスプライシングアイソフォームを含む）の α サブユニット、6種類の β サブユニットおよび11種類の γ サブユニットが現在記載されている。Gタンパク質のクラスおよびサブユニットは添字が付けられており、したがって、たとえば、 G_s タンパク質の α サブユニット（アデニル酸シクラーゼを活性化する）は $G_{\alpha s}$ 、他のGタンパク質には、 G_s とは構造的に異なり（異なる種類の α サブユニット）、アデニル酸シクラーゼを阻害する G_i が含まれる。追加の例は表1に提供されている。

20

30

【0069】

典型的には、本来、Gタンパク質はヌクレオチド結合型である。さらに具体的には、Gタンパク質（または少なくとも α サブユニット）は、特定のGPCRの活性化状態に応じてGTPまたはGDPのどちらかに結合している。アゴニストがGPCRに結合すると、GDP結合 $G_{\alpha\beta\gamma}$ ヘテロ三量体との相互作用を促進し、 G_{α} 上でGDPはGTPに交換され、Gタンパク質は G_{α} -GTPおよび $G_{\beta\gamma}$ サブユニットに機能的に解離する。別個の G_{α} -GTPおよび $G_{\beta\gamma}$ サブユニットは、下流細胞エフェクター（チャネル、キナーゼまたは他の酵素、表1を参照）を独立してまたは平行して調節することができる。 G_{γ} の内因性GTPアーゼ活性は、GTPをGDPに加水分解し、 G_{α} -GDPと $G_{\beta\gamma}$ サブユニットは再会合して、シグナル伝達は終了する。このように、Gタンパク質は、 α および $\beta\gamma$ サブユニット効果を通じて分岐シグナルを誘発することができる調節された分子スイッチとしての役割を果たす。前記スイッチは受容体によりオンになり、シグナル伝達をかなり増幅するのに十分な時間である数秒以内にオフになる。

40

【0070】

本明細書における「Gタンパク質共役受容体」または「GPCR」は、それぞれ膜を貫

50

通する7個のアルファヘリックスを形成する、22から24個の間の疎水性アミノ酸の7領域を備える共通構造的モチーフを共有するポリペプチドである。各貫通領域は、番号により同定され、すなわち、膜貫通-1 (TM1)、膜貫通-2 (TM2) 等とする。膜貫通ヘリックスは、それぞれ「細胞外」領域1、2および3 (EC1、EC2およびEC3) と称される、細胞膜の外部または「細胞外」側における膜貫通-2と膜貫通-3との間、膜貫通-4と膜貫通-5との間および膜貫通-6と膜貫通-7との間のアミノ酸の領域によって連結されている。膜貫通ヘリックスは、それぞれ「細胞内」領域1、2および3 (IC1、IC2およびIC3) と称される、細胞膜の内部または「細胞内」側における膜貫通-1と膜貫通-2との間、膜貫通-3と膜貫通-4との間および膜貫通-5と膜貫通-6との間のアミノ酸の領域によっても連結されている。受容体の「カルボキシ」(「C」) 末端は、細胞の内側にある細胞内空間に位置し、受容体の「アミノ」(「N」) 末端は、細胞の外側にある細胞外空間に位置する。これらの領域のいずれも、GPCRの一次アミノ酸配列の解析により容易に同定可能である。

10

【0071】

GPCR構造および分類は、一般に本技術分野において周知のものであり、GPCRに関するさらなる考察は、Probstら、1992; Marcheseら、1994; Lagerstrom & Schioth、2008; Rosenbaumら、2009ならびに次の書籍、Jurgen Wess (編) *Structure-Function Analysis of G Protein-Coupled Receptors*, Wiley-Liss 発行 (第1版; 1999年10月15日); Kevin R. Lynch (編) *Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors*, John Wiley & Sons 発行 (1998年3月); Tatsuya Haga (編)、*G Protein-Coupled Receptors*, CRC Press 発行 (1999年9月24日) および Steve Watson (編) *G-Protein Linked Receptor Factsbook*, Academic Press 発行 (第1版; 1994年) に見出すことができる。GPCRは、配列相同性に基づいて、数種の別々のファミリーにグループ分けすることができる。あらゆるGPCRは、7個の膜貫通 α -ヘリックスの類似の構造を有するが、この受容体クラス内の異なるファミリーは、互いに配列相同性を示さず、よって、これらの膜貫通ドメイン構造の類似性が、共通の機能的要件を定義し得ることを示唆する。ヒトゲノムの最初のドラフト配列が利用できるようになったとき、GPCRレパートリーの包括的見解が可能となった。Fredrikssonおよび同僚らは、系統発生的判断基準に基づいて802種のヒトGPCRをファミリー分けした。その結果は、ヒトGPCRの多くが、ロドプシン、接着、セクレチン、グルタミン酸、Frizzled/Taste2と称される5種の主要ファミリーに存在することを示した (Fredrikssonら、2003)。

20

30

【0072】

ロドプシンファミリー (クラスA (Kolakowski、1994) またはクラス1 (Foordら、(2005)、古い分類システムにおける) に相当) のメンバーは、小型の細胞外ループしか持たず、リガンドの相互作用は、膜貫通間隙内の残基との間で行われる。これは、圧倒的最大の群 (GPCRの>90%) であり、匂い分子、カテコールアミンおよびアミン等の小分子、(神経) ペプチドおよび糖タンパク質ホルモンの受容体を含む。このファミリーの代表であるロドプシンは、構造が解明された最初のGPCRである (Palczewskiら、2000)。構造が解明された拡散性リガンドと相互作用する最初の受容体である β 2AR (Rosenbaumら、2007) も、このファミリーに属す。系統発生的解析に基づき、クラスB GPCRまたはクラス2 (Foordら、2005) 受容体は、近年、接着およびセクレチン (Fredrikssonら、2003) の2ファミリーに細分化された。接着およびセクレチン受容体は、リガンド結合に関与する相対的に長いアミノ末端細胞外ドメインによって特徴付けられる。膜貫通ドメインの配向性に関してほとんど分かっていないが、恐らく、ロドプシンの配向性とは全く

40

50

異なる。これらのGPCRのリガンドは、グルカゴン、セクレチン、性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび副甲状腺ホルモン等のホルモンである。グルタミン酸ファミリー受容体（クラスCまたはクラス3受容体）も大型の細胞外ドメインを有し、このドメインは、内側に結合したアゴニストにより開閉できることから「ハエジゴク（Venus fly trap）」の様に機能する。ファミリーメンバーは、代謝型グルタミン酸、 Ca^{2+} 感知および γ -アミノ酪酸（GABA）-B受容体である。

【0073】

GPCRは、セロトニン嗅覚受容体、糖タンパク質ホルモン受容体、ケモカイン受容体、アデノシン受容体、生体アミン受容体、メラノコルチン受容体、神経ペプチド受容体、走化性受容体、ソマトスタチン受容体、オピオイド受容体、メラトニン受容体、カルシトニン受容体、PTH/PTHrP受容体、グルカゴン受容体、セクレチン受容体、ラトロトキシシン受容体、代謝型グルタミン酸受容体、カルシウム受容体、GABA-B受容体、フェロモン受容体、プロテアーゼ活性化型受容体、ロドプシンおよび他のGタンパク質共役型7回膜貫通セグメント受容体を限定することなく包含する。GPCRは、ホモマーもしくはヘテロマーのダイマーまたはより高次のオリゴマーとして互いに会合したGPCR受容体も包含する。GPCRのアミノ酸配列（およびこれをコードするcDNAのヌクレオチド配列）は、たとえば、GenBank（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>）を参照することにより容易に入手できる。

【0074】

したがって、特定の実施形態によると、本発明は、Gタンパク質がGs、Gi、Go、Gt、Ggust、Gz、Golf、Gq、G12およびG13からなる群から選択されるGPCR：Gタンパク質複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインを提供する。一好ましい実施形態では、Gタンパク質はGsである。別の好ましい実施形態では、Gタンパク質はGiである。さらに別の好ましい実施形態では、Gタンパク質はGt、さらに具体的にはトランスデュシンである。それに対応して、前記複合体内に含まれるGPCRは、Gs共役受容体、Gi共役受容体、Go共役受容体、Gt共役受容体、Ggust共役受容体、Golf共役受容体、Gq共役受容体、G12共役受容体およびG13共役受容体からなる群から選択される。一好ましい実施形態では、GPCRはGs共役受容体である。別の好ましい実施形態では、GPCRはGi共役受容体である。さらに別の好ましい実施形態では、GPCRはGt共役受容体、さらに具体的にはロドプシンである。特定の非限定的例は表1に与えられている。

【0075】

【表 1】

表1. Gタンパク質共役受容体およびシグナル伝達経路の関係の非限定的例

Gタンパク質ファミリー	α サブユニット	エフェクター/シグナル伝達経路	使用/受容体
Giファミリー			
Gi Go	α_i α_o	アデニル酸シクラーゼの阻害 (cAMP ↓) Ca^{2+} チャネルを閉じる (Ca^{2+} ↓)	アセチルコリン M2 および M4 受容体 アデノシン A1 および A3 受容体 アドレナリン α_2A, α_2B, および α_2C 受容体 アペリン受容体 カルシウム感知受容体 ケモカイン CXCR4 受容体 ドーパミン D2, D3, D4 GABAB 受容体 グルタミン酸 mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR6, mGluR7, および mGluR8 受容体 ヒスタミン H2 および H3 および H4 受容体 メラトニン MT1, MT2, および MT3 受容体 ムスカリン性 M2 および M4 受容体 オピオイド δ, κ, μ, および ノセプチン受容体 プロスタグランジン EP1, EP3, FP, および TP 受容体 セロトニン 5-HT1 および 5-HT5 受容体
Gt	α_t (トランスデューシン)	活性化ホスホジエステラーゼ 6 (ビジョン)	ロドプシン
Ggust	α_{gust} (ガストデューシン)	活性化ホスホジエステラーゼ 6 (ビジョン)	味覚受容体
Gz	α_z	阻害アデニル酸シクラーゼ (cAMP ↓)	未知
Gsファミリー			
Gs	α_s	活性化アデニル酸シクラーゼ (cAMP ↑)	5-HT 受容体型 5-HT4 および 5-HT7 ACTH 受容体 アデノシン受容体型 A2a および A2b アルギニンバソプレシン受容体 2 β-アドレナリン受容体型 β_1, β_2 および β_3 カルシトニン受容体 カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 ドーパミン受容体 D1 様ファミリー (D1 および D5) FSH 受容体 胃抑制ポリペプチド受容体 グルカゴン受容体 ヒスタミン H2 受容体 黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体

10

20

30

40

			メラノコルチン受容体 副甲状腺ホルモン受容体 1 プロスタグランジン受容体型 D2 および I2 セクレチン受容体 甲状腺刺激ホルモン受容体
Golf	α olf	活性化アデニル酸シクラーゼ (cAMP ↑)	臭覚受容体
Gq ファミリー			
Gq	α q	ホスホリパーゼ C の活性化 (IP ₃ ↑)	5-HT ₂ セロトニン受容体 アルファ 1 アドレナリン受容体 バソプレシン型 1 受容体 アンジオテンシン II 受容体型 1 カルシトニン受容体 ヒスタミン H ₁ 受容体 メタボトロピックグルタミン酸受容体、グループ I M ₁ , M ₃ , および M ₅ ムスカリン性受容体
G12/G13 ファミリー			
G12	α 12		
G13	α 13	Na ⁺ /H ⁺ 交換 ↑	
	$\beta\gamma$ サブユニット	エフェクター/シグナル伝達経路	
	$\beta\gamma$	K ⁺ チャンネルを開く (K ⁺ ↑)	
	$\beta\gamma$	アデニル酸シクラーゼ (cAMP) ↑ or ↓	
	$\beta\gamma$	ホスホリパーゼ C (IP ₃)	

10

20

【0076】

一般に、本発明の結合ドメインは、当業者には明らかになるように、生物学のおよび／または治療の観点からもっとも関連のある種類の GPCR：G タンパク質複合体に少なくとも結合することになる。したがって、目的と適用に応じて、標的複合体に含まれる GPCR および G タンパク質は天然に存在していてもまたは天然に存在していなくても（すなわち、ヒトにより変更されていても）よい。用語「天然に存在する」は、本明細書で 사용되는場合、天然に産生される GPCR または G タンパク質を意味する。特に、GPCR および G タンパク質の野生型多形バリエーションおよびアイソフォーム、ならびに異なる種にわたるオルソログは、天然に存在するタンパク質の例であり、たとえば、制限なしに、とりわけ、哺乳動物に、さらに具体的にはヒトに、またはウイルスにまたは植物に、または昆虫に見出される。したがって、そのような GPCR または G タンパク質は天然に見出される。用語「天然に存在しない」は、本明細書で 사용되는場合、天然には存在しない GPCR または G タンパク質を意味する。ある種の状況では、前記複合体に含まれる GPCR および／または G タンパク質は天然には存在しないタンパク質であることが有利な場合もある。たとえばおよび説明のみを目的に、本発明の結合ドメインにより安定化された GPCR：G タンパク質複合体の結晶を得る可能性を高めるために、リガンド結合親和性に影響を与えずにまたは最小限度の影響を与えるだけであるタンパク質操作を実施するのは望ましいことがある。あるいは、代わりにまたはさらに、GPCR および／もしくは G タンパク質の細胞発現レベルを増加するために、または安定性を高めるために、対象の GPCR および／または G タンパク質にある種の変異を導入することを検討してもよい。天然に存在しない GPCR の非限定的例には、制限なく、変異を通じて構造的に活性になっている GPCR、ループ欠失のある GPCR、N-および／または C-末端欠失のある GPCR、置換、挿入もしくは付加のある GPCR、またはそのアミノ酸もしくはヌクレオチ

30

40

50

ド配列に関するそれらの任意の組合せ、または天然に存在するGPCRの他のバリエーションが含まれる。同様に、天然に存在しないGタンパク質の非限定的例には、制限なく、N-および/またはC-末端欠失のあるGタンパク質、置換、挿入もしくは付加のあるGタンパク質、またはそのアミノ酸もしくはヌクレオチド配列に関するそれらの任意の組合せ、または天然に存在するGタンパク質の他のバリエーションが含まれる。本発明の範囲内には、キメラもしくはハイブリッドGPCR、たとえば、1つのGPCR由来のN-および/もしくはC-末端と第二のGPCRのループを有するキメラGPCRを含む、またはT4リゾチームなどの部分に融合しているGPCRを含む標的GPCR：Gタンパク質複合体も含まれる（実施例のセクションも参照）。

【0077】

本発明の範囲内における特定の実施形態に従えば、非天然起源のGPCRまたはGタンパク質は、GPCR：Gタンパク質複合体に含まれるように、天然起源のGPCRまたはGタンパク質に対して少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有し得る。これをさらに説明するために、および β_2 -アドレナリン受容体を本発明の範囲内におけるGPCRの特定の非限定的な例とすると、上の記述から、ヒト β_2 -アドレナリン受容体（たとえば、GenBank受託番号NP_000015に記載の配列）に加えて、マウス β_2 -アドレナリン受容体（たとえば、GenBank受託番号NM007420に記載）または他の哺乳動物 β_2 -アドレナリン受容体が網羅されてよいことは明らかである。特定の生物種の β_2 -アドレナリン受容体の野生型多型変種および特定の他の活性変種も想定される。たとえば、「ヒト β_2 -アドレナリン受容体」は、GenBank受託番号NP_000015の天然起源の「ヒト β_2 -アドレナリン受容体」に対して少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有する。同様に、Gas、GaiおよびGatを本発明の範囲内のGタンパク質のサブユニットの特定の非限定的な例とすると、ヒトGasもしくはGaiもしくはGatに加えて、マウスGasもしくはGaiもしくはGatタンパク質または他の哺乳動物GasもしくはGaiもしくはGatタンパク質が包含されることは上記から明らかになるはずである。特定の種由来のGasもしくはGaiもしくはGatの野生型多形バリエーションおよびある種の他の活性バリエーションも想定されている。たとえば、「ヒトGas」または「ヒトGai」または「ヒトGat」は、それぞれジェンバンク受託番号P63092、P63096およびP11488の天然に存在する「ヒトGas」または「ヒトGai」または「ヒトGat」に少なくとも80%同一の、少なくとも90%同一の、少なくとも95%同一の、少なくとも97%同一のまたは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有する。さらに、たとえば、GsおよびGiタンパク質のアイソフォーム（HGNCヒト遺伝子標準命名法によると、Gas：GNAS；Ga0：GNAO1；Gai：GNAI1またはGNAI2またはGNAI3；G β ：GNB1またはGNB2またはGNB3またはGNB4またはGNB5またはGNB1LまたはGNB2L；G γ ：GNGT1またはGNGT2またはGNG2またはGNG3またはGNG4またはGNG5またはGNG7またはGNG8またはGNG10またはGNG11またはGNG12またはGNG13；異なる生物由来の異なるアイソフォームの受託番号はwww.uniprot.orgより入手可能である）を含むGタンパク質サブユニットの多くのアイソフォームが存在する。Gタンパク質サブユニットのアイソフォームのいくつかの特定の例は表5に与えられている。当業者であれば、異なるGタンパク質サブユニットのアミノ酸配列は種および生物間で100%ではないにしてもほぼ100%保存されていることを認識する。とりわけ、Gタンパク質のヒト、ウシ、ラットおよびマウス β サブユニットのアミノ酸配列の配列アライメントにより、これらの生物間のアミノ酸配列は100%保存されていることが明らかになっている。同様に、Gタンパク質のヒト、マウスおよびウシ γ サブユニットのアミノ酸配列は100%同一である。ラットおよびマウスGasアミノ酸配列も100%同一であり、ヒトおよびウシGasはそれぞれ1または2アミノ酸が異なるだけである。したがって、GPCR：Gタンパク質複合体に対して作製されたお

10

20

30

40

50

よび／または特異的に結合する、特に前記複合体に含まれるGタンパク質に結合する結合ドメインは交差反応性であると予想される。標的複合体に含まれるGPCRおよびGタンパク質は同一種由来でも異なる種由来でもよいことも明らかになる。好ましくは、GPCRおよび／またはGタンパク質は哺乳動物タンパク質、または植物タンパク質、または微生物タンパク質、またはウイルスタンパク質、または昆虫タンパク質である。さらに好ましくは、GPCRはヒトタンパク質である。

【0078】

本発明の結合ドメインは一般に、前記複合体中に含まれる特定のGPCRおよび／またはGタンパク質のすべての天然に存在するまたは合成のアナログ、バリエーション、変異体、アレル、部分、断片およびアイソフォームを含むGPCR：Gタンパク質複合体に、または少なくとも前記複合体中に含まれる特定のGPCRおよび／またはGタンパク質のアナログ、バリエーション、変異体、アレル、部分、断片およびアイソフォームであって、本発明の結合ドメインが前記複合体中に含まれる特定のGPCRおよび／またはGタンパク質に結合する抗原決定基（複数可）またはエピトープ（複数可）と基本的に同じである1つ以上の抗原決定基またはエピトープを含有する上記アナログ、バリエーション、変異体、アレル、部分、断片およびアイソフォームに結合することができるとも予想される。

【0079】

たとえば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、表面プラズモン共鳴法、ファージディスプレイ等を含めた様々な方法が、結合ドメインおよび標的GPCR：Gタンパク質複合体の間の特異的結合（上文に定義されている）の決定に用いることができ、これらの方法は、本技術分野において慣行的であり、たとえば、Sambrookら（2001）、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバーに記されており、実施例の節でさらに説明される。この目的のため、多くの場合、本明細書にさらに記載されているペプチド標識、核酸標識、化学標識、蛍光標識または高周波タグ等の独特の標識またはタグが用いられることが認識される。

【0080】

特定の実施形態によると、GPCR：Gタンパク質複合体に対する結合ドメインは、Gタンパク質単独および／またはGPCR単独それぞれに結合する場合と比べて高い親和性で前記複合体に結合する。一実施形態では、GPCR：Gタンパク質複合体に対する結合ドメインは、前記複合体に含まれるGPCRに特異的に結合し、Gタンパク質には結合しない。好ましくは、別の実施形態では、GPCR：Gタンパク質複合体に対する結合ドメインは、前記複合体に含まれるGタンパク質に特異的に結合し、GPCRには結合しない。さらに具体的には、GPCR：Gタンパク質複合体に対する結合ドメインは、Gs共役受容体およびGsタンパク質の複合体に含まれるGsタンパク質であるGタンパク質に特異的に結合する。

【0081】

GPCRが、天然および合成リガンドに応じて機能的挙動のスペクトルを示す立体構造的複合体膜タンパク質であることは周知である。本来、リガンド結合GPCRは、Gタンパク質と会合して、特定の機能的立体構造状態、さらに具体的には活性立体構造状態となり、特定の生物活性を生じることになる複合体となり得る。本発明は、本明細書に記載される結合ドメインが、Gタンパク質と複合体を形成し様々な天然のまたは合成のリガンドに結合しているGPCRのこれらの種々の活性立体構造を安定化することができるという特定の利点を提供する。当業者であれば、リガンド：GPCR：Gタンパク質複合体に特異的に結合する結合ドメインが、前記複合体に含まれるGPCRの特定の立体構造を安定化することを認識する。好ましい実施形態では、前記結合ドメインは、好ましくはGPCRが活性立体構造状態にある、GPCR：Gタンパク質複合体の特定の機能的立体構造状態を安定化する、または別の方法で、その安定性を増加することができる。一般に、前記GPCRの機能的立体構造状態は基本的な立体構造状態である、または活性立体構造状態

であるまたは不活性立体構造状態であることが可能である。好ましくは、本発明の結合ドメインは、受容体リガンドの存在下であれ非存在下であれ、GPCRをその活性立体構造状態で安定化することができるおよび／またはGPCR：Gタンパク質複合体に結合するとGPCRを活性立体構造状態でロックすることができる。

【0082】

本発明の特に好ましい実施形態では、前記結合ドメインはGPCR、Gタンパク質および受容体リガンド（本明細書に定義されている）を含む複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合することが想定されている。さらに好ましくは、前記結合ドメインはGPCR、Gタンパク質および受容体リガンドからなる複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。受容体リガンドは、結合すると応答を始動させる小化合物、ペプチド、抗体、または抗体断片などでもよい。本明細書における受容体リガンドまたは単にリガンドは、受容体の活性部位と結合し、その有効性またはすなわち、特異的経路を通した受容体シグナル伝達におけるその効果に従って分類されるオルソステリックリガンド（天然および合成の両方）でよい。本明細書において、「アゴニスト」は、受容体と結合することにより、受容体のシグナル伝達活性を増加させるリガンドを意味する。完全アゴニストは、最大受容体刺激ができる。部分アゴニストは、飽和濃度であっても完全活性を誘発できない。部分アゴニストは、より強いアゴニストの結合を抑制することにより、「遮断薬」としても機能し得る。「アンタゴニスト」は、いかなる活性も刺激することなく受容体と結合するリガンドを意味する。「アンタゴニスト」は、他のリガンドの結合を抑制するその能力、したがって遮断アゴニスト誘導活性のため、「遮断薬」としても知られる。さらに、「インバースアゴニスト」は、アゴニスト効果の遮断に加えて、受容体の基礎または構成的活性をリガンド非結合の受容体の活性よりも低下させるアンタゴニストを意味する。好ましくは、本発明の結合ドメインは、GPCR、Gタンパク質および受容体リガンドを含み、前記受容体リガンドがアゴニストである複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。さらに具体的には、前記アゴニストはオルソステリック部位で受容体に結合する。

【0083】

GPCRのシグナル伝達活性（したがって、その立体構造挙動）は、アロステリック調節因子として公知の別種のリガンドの結合によっても影響され得る。「アロステリック調節因子」あるいは「アロステリック修飾因子」または「エフェクター分子」は、GPCRのアロステリック部位（すなわち、物理的にタンパク質の活性部位と異なる調節性部位）において結合する。オルソステリックリガンドと対照的に、アロステリック修飾因子は、内在性リガンドも結合しているとしても、異なる部位で受容体と結合して受容体機能を修飾するため、非競合的である。このため、アロステリック修飾因子は、多くの薬物がそうであるように、単に受容体をオンにしたりオフにしたりすることに限定されない。その代わりに、これは、むしろ減光スイッチのように作用し、その（内因性）リガンドの受容体の親和性を変更することによって、本体に受容体活性化の惹起に関するその天然の制御を保持させつつ、活性化または非活性化の強度に関する制御をもたらす。タンパク質の活性を増強するアロステリック調節因子は、本明細書において、「アロステリック活性化因子」または「正のアロステリック修飾因子」と称され、一方、タンパク質の活性を減少させるアロステリック調節因子は、本明細書において、「アロステリック阻害剤」あるいは「負のアロステリック修飾因子」と称される。したがって、一特定の実施形態では、本発明の結合ドメインは、GPCR、Gタンパク質および受容体リガンドを含み、前記受容体リガンドがアロステリックモジュレーター、好ましくはポジティブアロステリックモジュレーターである複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。さらに具体的には、前記ポジティブアロステリックモジュレーターはアロステリック部位で受容体に結合する。

【0084】

説明されたように、GPCRが細胞生理をどのように調節しているのかの標準的見方は、リガンド（たとえば、ホルモン、神経伝達物質または感覚刺激）の結合は受容体の活性

立体構造状態を安定化させ、それによってヘテロ三量体Gタンパク質との相互作用を可能にするというものである。Gタンパク質との相互作用に加えて、アゴニスト結合GPCRはGPCRキナーゼ（GRK）と会合し、受容体をリン酸化する。GRKによりGPCRがリン酸化される結果、一般的には、GPCRのGタンパク質との相互作用が減少し、GPCRのアレスチンとの相互作用が増加し、Gタンパク質のさらなるシグナル伝達が立体的に阻害され、受容体脱感作をもたらす。βアレスチンはGタンパク質のシグナルを打ち消すため、MAPK経路などの第二の平行なセットのシグナルカスケードを同時に開始することができる。GPCRは、一般的なGPCR相互作用タンパク質（Gタンパク質、GRK、アレスチンおよび他の受容体）のファミリーの他に様々なタンパク質とも会合する。これらのGPCR選択性パートナーは、GPCRシグナル伝達を媒介し、Gタンパク質を通じてGPCRシグナル伝達を組織化し、GPCR輸送を指示し、GPCRを特定の細胞内領域に固定しおよび／またはGPCR薬理に影響を及ぼすことができる（RitterおよびHall、2009年）。この点に関して、本明細書で使用されるリガンドは、サブセットの受容体シグナル伝達活動、たとえば、Gタンパク質またはβアレスチン機能の選択的活性化を選択的に刺激する能力を有する「バイアスリガンド」であってもよい。そのようなリガンドは、「バイアスリガンド」、「バイアスアゴニスト」または「機能的選択性アゴニスト」として知られる。さらに詳細には、リガンドバイアスは、リガンドが複数の受容体活動を異なるシグナルに対して異なる相対的有效性で刺激すること（非絶対的選択性）を特徴とする不完全バイアスであることが可能であり、またはリガンドが1つの受容体活動を刺激して別の既知の受容体活動を全く刺激しないことを特徴とする完全バイアスであることが可能である。したがって、一特定の実施形態では、本発明の結合ドメインは、GPCR、Gタンパク質および受容体リガンドを含み、前記受容体リガンドがバイアスリガンドである複合体に対して作製されているおよび／または特異的に結合する。

【0085】

さらに、本発明の好ましい実施形態によると、GPCR：Gタンパク質複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する本発明の結合ドメインは、上文に記載されているように、自然または適応免疫系由来であることが特に想定されている。好ましくは、前記結合ドメインは免疫グロブリンに由来する。好ましくは、本発明による結合ドメインは、抗体または抗体断片である。用語「抗体」（Ab）は、抗原を特異的に結合および認識する、免疫グロブリン遺伝子によってコードされたポリペプチドまたはその機能的断片を一般に意味し、当業者にとって公知のものである。従来の免疫グロブリン（抗体）構造的単位は、テトラマーを含む。各テトラマーは、各対が1本の「軽」（約25kDa）および1本の「重」鎖（約50-70kDa）を有する同一の2対のポリペプチド鎖によって構成されている。各鎖のN末端は、主として抗原認識に関与する約100から110以上のアミノ酸の可変領域を画定する。用語、可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）はそれぞれ、これらの軽および重鎖を意味する。用語「抗体」は、単鎖全抗体および抗原結合断片を含めた全抗体を包含するよう企図されている。一部の実施形態において、抗原結合断片は、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv（dsFv）およびVLまたはVHドメインのいずれかを含むまたはそれからなる断片ならびに標的抗原と結合することができる免疫グロブリンペプチドのこれらまたは任意の他の機能的部分の任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されない抗原結合抗体断片でよい。用語「抗体」は、本明細書においてさらに定義されている単ドメイン抗体、より具体的にはVHHまたはナノボディ等の免疫グロブリン単一可変ドメインの、重鎖抗体またはその機能的断片も包含するよう企図されている。

【0086】

好ましくは、本発明の結合ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインである。さらに好ましくは、前記結合ドメインは、4つのフレームワーク領域（FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（CDR1からCDR3）を含むアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインであり、好ましくは以下の式（1）に従う：

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

またはその任意の適切な断片（よって通常、相補性決定領域のうち少なくとも1個を形成するアミノ酸残基の少なくとも一部を含有する）。

【0087】

4個のFRおよび3個のCDRを含む結合ドメインは、当業者にとって公知のものであり、非限定的な例として、Wesolowskiら（2009、Med. Microbiol. Immunol. 198:157）に記載されている。免疫グロブリン単一可変ドメインの典型的であるが非限定的な例には、通常は従来の4本鎖抗体に由来する軽鎖可変ドメイン配列（たとえば、V_Lドメイン配列）または重鎖可変ドメイン配列（たとえば、V_Hドメイン配列）が含まれる。好ましくは、免疫グロブリン単一可変ドメインはラクダ科動物抗体由来、好ましくは軽鎖が欠けている重鎖ラクダ科動物抗体由来であり、V_HHドメイン配列またはナノボディとして知られる（本明細書においてさらに記載される）。

【0088】

本明細書における用語「ナノボディ」（Nb）は、天然起源の重鎖抗体に由来する最小の抗原結合断片または単一可変ドメイン（V_HH）を意味し、当業者にとって公知のものである。これは、ラクダ科動物に見られる重鎖のみの抗体に由来する（Hamers-Castermanら、1993；Desmyterら、1996）。「ラクダ科動物」のファミリーにおいて、軽ポリペプチド鎖を欠く免疫グロブリンが見出される。「ラクダ科動物」は、旧世界ラクダ科動物（カメルス・バクトリアヌス（*Camelus bactrianus*）およびカメルス・ドロメダリウス（*Camelus dromedarius*））ならびに新世界ラクダ科動物（たとえば、ラマ・パコス（*Lama paccos*）、ラマ・グラマ（*Lama glama*）、ラマ・グアニコエ（*Lama guanicoe*）およびラマ・ビクニャ（*Lama vicugna*））を含む。前記単一可変ドメイン重鎖抗体は、本明細書において、NanobodyまたはV_HH抗体と命名される。Nanobody（ナノボディ）（商標）およびNanobodies（商標）は、Ablynx NV（ベルギー）の商標である。Nbの小サイズおよび独特の生物物理学的特性は、稀少なまたは隠れたエピトープの認識およびタンパク質標的の空洞または活性部位への結合に関して従来の抗体断片よりも優れている。さらに、Nbは、多重特異性および／または多価抗体として設計され得るまたはレポーター分子と付着され得る（Conrathら、2001）。Nbは、容易に製造されて胃腸管系に残存し得る安定的で強固な単一ドメインタンパク質である。したがって、Nbは、創薬および治療等、多くの用途において用いられ得る（Saerensら、2008）が、タンパク質の精製、機能研究および結晶化のための多用途および有用なツールとしても用いられ得る（Conrathら、2009）。天然の標的の立体構造エピトープに結合する結晶化シャペロンとして機能する特定クラスのナノボディは、グザペロンと呼ばれ、ここでは特に想定されている。グザペロンは構造生物学における独自のツールである。グザペロン（商標）はVIBおよびVUBの商標である（Belgium）。結晶化補助としてラクダ科動物抗体断片を使用する大きな利点は、グザペロンは（1）隠れたエピトープに結合しタンパク質を独自の天然立体構造にロックする、（2）可溶性タンパク質および可溶化膜タンパク質の安定性を増加する、（3）可溶性タンパク質および可溶化膜タンパク質の立体構造複雑性を減少する、（4）回折結晶の成長を可能にする極性表面を増加し、（5）集合性または重合性表面を隔離する、（6）活性タンパク質を親和性トラップすることを可能にすることである。

【0089】

したがって、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に本発明のナノボディは一般に、典型的には式（1）

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1)

に従って、4つの「フレームワーク配列」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを含む単一アミノ酸鎖を含む。

【0090】

用語「相補性決定領域」または「CDR」とは、免疫グロブリン単一可変ドメインにおける可変領域のことであり、抗原標的に特異的に結合することができるアミノ酸配列を含有する。これらのCDR領域は、特定の抗原決定構造に対するナノボディの基本的特異性を説明する。そのような領域は「超可変領域」とも呼ばれる。免疫グロブリン単一可変ドメインは、3つのCDR領域を有し、それぞれのCDRがその他のCDRとは隣接していない（CDR1、CDR2、CDR3と呼ばれる）。免疫グロブリン単一可変ドメインのフレームワーク領域も、その抗原の結合に寄与し得ることは明らかである（Desmyterら、2002；Korotkovら、2009）。本発明のそのような免疫グロブリン単一可変ドメインならびにFRとCDRの特定の組合せの非限定的例は、本明細書に記載される通りである（表2-3を参照）。CDR配列（したがって、FR配列も）の描写は、VドメインおよびV様ドメインのIMGT独自の付番方式に基づいている（Lefrancら、2003年）。代わりに、FRおよびCDR配列の描写は、RiechmanおよびMuyldermansの論文（2000年）でラクダ科動物由来のV_HHドメインに適用されるKabatt付番方式を使用することにより行うことが可能である。当業者であれば知ることになるように、免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にナノボディは、たとえば、参照により本明細書に組み込むWO 8/020079、75頁、表A-3に記載されているように、フレームワーク配列のうちの1つ以上における1つ以上のラクダ科ホールマーク残基（Kabatt付番に従って）の存在を特に特徴とすることができる。

10

【0091】

20

好ましい実施形態では、本発明は、基本的に4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなるアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列のCDR配列が配列番号1-6、好ましくは配列番号1および／または4の免疫グロブリン単一可変ドメインのうちの少なくとも1つのCDR配列（表3を参照）と少なくとも70%アミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%アミノ酸同一性、さらに好ましくは少なくとも90%アミノ酸同一性、たとえば少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%アミノ酸同一性さえ有する上記アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。免疫グロブリン単一可変ドメインの1つ以上の配列のCDRのアミノ酸配列のアミノ酸同一性の程度を決定するためには、フレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視されることは理解される。本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインのいくつかの好ましいが非限定的例は、配列番号1から6、好ましくは配列番号1および／または配列番号4に与えられる（表2を参照）。

30

【0092】

本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にナノボディは、そのもっとも広い意義において、特定の生物学的ソースまたは特定の調製方法に限定されないことに留意されたい。たとえば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にナノボディは、一般に、（1）天然起源の重鎖抗体のV_HHドメインを単離することにより、（2）天然起源のV_HHドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により、（3）天然起源のV_HHドメインの「ヒト化」によりまたはこのようなヒト化V_HHドメインをコードする核酸の発現により、（4）任意の動物種、特にヒト等の哺乳動物種から得られた天然起源のVHドメインの「ラクダ化（camelization）」によりまたはこのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現により、（5）本技術分野において説明されている「ドメイン抗体」または「Dab」の「ラクダ化」によりまたはこのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現により、（6）それ自体は公知のタンパク質、ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列を調製するための合成または半合成技法を用いることにより、（7）それ自体は公知の核酸合成技法を用いてナノボディをコードする核酸を調製し、次に、このようにして得られた核酸を発現することにより、および／または（8）前述の1つまたは複数の任意の組合せにより得ることができる。

40

50

【0093】

免疫グロブリン単一可変ドメインの好ましい1クラスは、GPCRおよびGタンパク質の標的複合体に対して作製された天然起源の重鎖抗体のV_HHドメインに相当する。免疫グロブリン単一可変ドメインのナイーブまたは合成ライブラリーは、標的複合体に対する立体構造結合剤を含有し得るが、本発明の好ましい一実施形態は、標的複合体によりラクダ科を免疫化して、複合体独特の立体構造エピトープに、この動物の免疫系を曝露することを包含する。動物は相互作用する単量体の混合物で免疫することが可能である。場合によって、前記複合体は、化学架橋によりまたは前記複合体を安定化する協調的／アロステリックリガンド／代謝物（オルソステリックアゴニスト、アロステリック活性化物質、Ca⁺⁺、ATP、等）を付加することにより安定化することが可能である。前記複合体は、前記複合体のメンバー（のうちの1つ）の共有結合性修飾（リン酸化、等）により安定化することも可能である。別の実施形態では、GPCRおよび／またはGタンパク質単独で、したがって互いと複合体を形成せずに用いてラクダ科を免疫してもよい。場合によって、GPCRおよび／またはGタンパク質を、たとえば、GPCRおよび／またはGタンパク質を安定化する協調的／アロステリックリガンド／代謝物（とりわけ、オルソステリックアゴニスト、アロステリック活性化物質、Ca⁺⁺、ATP）を付加することにより安定化してもよい。

10

【0094】

したがって、そのようなV_HH配列は一般に、ラクダ科動物の一種をGPCRおよびGタンパク質を含む標的複合体でまたはその構成メンバータンパク質のうちの1つもしくは両方のどちらかで適切に免疫することにより（すなわち、標的複合体に対して作製された免疫応答および／または重鎖抗体を産生するために）、前記ラクダ科動物から適切な生体試料（たとえば、血液試料またはB細胞の任意の試料）を得ることにより、ならびに、それ自体が公知である任意の適切な技法を使用して前記試料から開始して標的複合体に対して作製されたV_HH配列を産生することにより作製されるまたは得ることができる。そのような技法は当業者には明らかである。代わりに、そのような天然に存在するV_HHドメインは、たとえば、それ自体公知の1つ以上のスクリーニング技法を使用して、標的複合体またはその少なくとも一部分、断片、抗原決定基もしくはエピトープを使用してそのようなライブラリーをスクリーニングすることによりラクダ科動物V_HH配列のナイーブライブラリーから得ることが可能である。そのようなライブラリーおよび技法は、たとえば、WO9937681、WO0190190、WO03025020およびWO03035694に記載されている。代わりに、たとえば、WO0043507に記載されているランダム変異誘発および／またはCDRシャフリングなどの技法によりナイーブV_HHライブラリーから得られるV_HHライブラリーなどの、ナイーブV_HHライブラリーに由来する改良された合成または半合成ライブラリーを使用してもよい。標的に向けられたV_HH配列を得るためのさらに別の技法は、重鎖抗体を発現することのできるトランスジェニック哺乳動物を適切に免疫化し（すなわち、標的に対して作製された免疫応答および／または重鎖抗体を産生できるよう）、前記トランスジェニック哺乳動物から適切な生物試料（血液試料または任意のB細胞試料等）を得て、次に、それ自体は公知の任意の適切な技法を用いて前記試料から出発して標的に対して作製されたV_HH配列を産生することに関与する。たとえば、この目的のため、WO02085945およびWO04049794に記載されている重鎖抗体発現マウスならびにさらなる方法および技法を用いることができる。

20

30

40

【0095】

本発明の特に好ましいクラスの免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に本発明のナノボディは、天然に存在するV_HHドメインのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列であって、しかし、すなわち、前記天然に存在するV_HH配列のアミノ酸配列（特に、フレームワーク配列内）における1つ以上のアミノ酸残基をヒト由来の従来の4鎖抗体由来のVHドメインにおける対応する位置（複数可）に存在するアミノ酸残基のうちの1つ以上で置き換えることにより「ヒト化」されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ド

50

メインを含む。これは、たとえば、当業者であれば本明細書におけるさらなる説明および本明細書で参照するヒト化に関する先行技術に基づき明らかとなる、それ自体は公知の様式で行われ得る。一方、本発明のこのようなヒト化免疫グロブリン単一可変ドメインが、それ自体は公知の任意の適切な様式で（すなわち、上記のポイント（１）－（８）に表示）得られ、よって、出発材料として天然起源の V_H Hドメインを含むポリペプチドを用いて得られたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意されたい。ヒト化免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にナノボディは、対応する天然起源の V_H Hドメインと比較した免疫原性の低下等、いくつかの利点を有し得る。このようなヒト化では、一般に、天然起源の V_H Hの配列における１つまたは複数のアミノ酸残基を、ヒト $VH3$ ドメイン等のヒト VH ドメインにおける同一位置に存在するアミノ酸残基に置き換える。ヒト化置換は、得られたヒト化免疫グロブリン単一可変ドメインが、本明細書において定義されている免疫グロブリン単一可変ドメインの有利な特性を保持し続けるように選ばれるべきである。当業者であれば、一方ではヒト化置換によってもたらされる有利な特性と、他方では天然起源の V_H Hドメインの有利な特性との間の所望のまたは適切なバランスを最適化または達成するヒト化置換またはヒト化置換の適切な組合せを選択することができる。

【0096】

本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に本発明のナノボディの別の特に好ましいクラスは、天然起源の VH ドメインのアミノ酸配列に相当するが、「ラクダ化」された、すなわち、従来の４鎖抗体から得られた天然起源の VH ドメインのアミノ酸配列における１つまたは複数のアミノ酸残基を、重鎖抗体の V_H Hドメインにおける対応する位置（複数可）に存在するアミノ酸残基の１つまたは複数に置き換えることにより「ラクダ化」されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。本明細書において定義されている通り、このような「ラクダ化」置換は、好ましくは、 $VH-VL$ の連結部を形成するおよび／またはそこに存在するアミノ酸位置においておよび／またはいわゆるラクダ科に特徴的な残基に挿入される（たとえば、 $WO9404678$ を参照）。好ましくは、ラクダ化ナノボディを産生または設計するための出発材料または出発点として用いられる VH 配列は、好ましくは、哺乳動物由来の VH 配列、より好ましくは、 $VH3$ 配列等のヒトの VH 配列である。しかし、本発明のこのようなラクダ化免疫グロブリン単一可変ドメインが、それ自体は公知の任意の適切な様式（すなわち、上記のポイント（１）－（８）に表示）で得られ、よって、出発材料として天然起源の VH ドメインを含むポリペプチドを用いて得られたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意されたい。

【0097】

たとえば、「ヒト化」および「ラクダ化」は両者ともに、それぞれ天然起源の V_H Hドメインまたは VH ドメインをコードするヌクレオチド配列を用意し、次に、新たなヌクレオチド配列が、それぞれ本発明の「ヒト化」または「ラクダ化」免疫グロブリン単一可変ドメインをコードするような仕方で、前記ヌクレオチド配列における１つまたは複数のコドンそれぞれをそれ自体は公知の様式で変化させることによって行われ得る。次に、この核酸は、本発明の所望の免疫グロブリン単一可変ドメインを生じるようそれ自体は公知の様式で発現され得る。あるいは、それぞれ天然起源の V_H Hドメインまたは VH ドメインのアミノ酸配列に基づき、それぞれ本発明の所望のヒト化またはラクダ化免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列が設計され、続いてそれ自体は公知のペプチド合成のための技法を用いて新規合成され得る。また、それぞれ天然起源の V_H Hドメインまたは VH ドメインのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に基づき、それぞれ本発明の所望のヒト化またはラクダ化免疫グロブリン単一可変ドメインをコードするヌクレオチド配列が設計され、続いてそれ自体は公知の核酸合成のための技法を用いて新規合成され、その後、このようにして得られた核酸が、本発明の所望の免疫グロブリン単一可変ドメインを生じるようそれ自体は公知の様式で発現され得る。天然起源の VH 配列または好ましくは V_H H配列から出発して、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび／またはこれをコードする核酸を得るための他の適切な方法および技法は、当業者にとって明らかであり、たとえば、１つまたは複数の天然起源の VH 配列のうち１つまたは複数の部分（１つまたは複数の

F R配列および／またはC D R配列等)、1つまたは複数の天然起源のV_H H配列のうち1つまたは複数の部分(1つまたは複数のF R配列またはC D R配列等)および／または1つまたは複数の合成または半合成配列を、本発明のナノボディまたはこれをコードするヌクレオチド配列もしくは核酸を生じるよう適切な様式で組み合わせる段階を含むことができる。

【0098】

本明細書で定義される免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に本発明のナノボディの天然または合成のアナログ、変異体、変種、対立遺伝子、部分または断片(本明細書においてまとめて「バリエーション」と称される)、特に、配列番号1-6(表2-3を参照)の免疫グロブリン単一可変ドメインのバリエーションも、本発明の範囲内に収まるものである。よって、本発明の一実施形態によると、そのもっとも広い意義における用語「本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン」または「本発明のナノボディ」もこのようなバリエーションを網羅する。一般に、このようなバリエーションにおいて、1つまたは複数のアミノ酸残基は、本明細書において定義されている本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインと比較して置換、欠失および／または付加されていてよい。このような置換、挿入または欠失は、F Rのうち1つもしくは複数および／またはC D Rの1つもしくは複数において、特に、配列番号1-6の免疫グロブリン単一可変ドメインのF RおよびC D R(表2-3を参照)に相当する)のバリエーションにおいてなされ得る。バリエーションは、本明細書で使用される場合、それぞれのまたは任意のフレームワーク領域およびそれぞれのまたは任意の相補性決定領域が、P I L E U PおよびB L A S T(50、51)などのアルゴリズムを利用することにより電子工学的に測定することが可能な場合、基準配列の対応する領域に少なくとも80%同一性、好ましくは少なくとも85%同一性、さらに好ましくは90%同一性、さらに好ましくは95%同一性、またはいっそうさらに好ましくは99%同一性を示す(すなわち、F R 1__バリエーション対F R 1__基準、C D R 1__バリエーション対C D R 1__基準、F R 2__バリエーション対F R 2__基準、C D R 2__バリエーション対C D R 2__基準、F R 3__バリエーション対F R 3__基準、C D R 3__バリエーション対C D R 3__基準、F R 4__バリエーション対F R 4__基準)。B L A S T解析を実施するためのソフトウェアは国立バイオテクノロジー情報センター(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公的に利用可能である。免疫グロブリン単一可変ドメインの1つ以上の配列のC D Rのアミノ酸配列のアミノ酸同一性の程度を決定するためには、フレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視されることは理解される。同様に、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインの1つ以上の配列のF Rのアミノ酸配列のアミノ酸同一性の程度を決定するためには、相補性領域を形成するアミノ酸残基は無視される。免疫グロブリン単一可変ドメインのそのようなバリエーションは、改良された効力／親和性を有し得るので特に有利になることがある。

【0099】

非限定的な例によると、置換は、たとえば、保存的置換(本明細書に記載されている)であり得るおよび／またはアミノ酸残基は、別のV_H Hドメインにおける同一位置における天然起源の別のアミノ酸残基に置き換えることができる。よって、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインの特性を改善するまたは本発明のナノボディの所望の特性もしくはバランスもしくは所望の特性の組合せを少なくとも過度に損なう(すなわち、免疫グロブリン単一可変ドメインがもはや目的の用途に適さなくなる程度まで)ことのない任意の1つまたは複数の置換、欠失もしくは挿入またはそれらの任意の組合せは、本発明の範囲内に包含されている。当業者は、一般に、本明細書における開示に基づき、場合によって、たとえば限られた数の可能な置換を導入し、このようにして得られた免疫グロブリン単一可変ドメインの特性におけるその影響の決定に関与し得る限られた程度のルーチン実験後に、適切な置換、欠失または挿入またはそれらの適切な組合せを決定および選択することができる。

【0100】

特に好ましい実施形態によると、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインのバリエーション

ト、特にナノボディは、C D Rのうちの1つ、2つまたは3つのいずれかにおいて1つ、2つまたは3つのアミノ酸の置換、欠失または挿入、さらに具体的には、(i) C D R 1またはC D R 2またはC D R 3において、(i i) C D R 1およびC D R 2において、またはC D R 1およびC D R 3において、またはC D R 2およびC D R 3において、(i i i) C D R 1およびC D R 2およびC D R 3において1つ、2つまたは3つのアミノ酸の置換、欠失または挿入を有していてもよく、そのC D Rのアミノ酸配列は表3に収載されている通りである。さらに好ましくは、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインのバリエーション、特にナノボディは、C D Rのうちの1つ、2つまたは3つのいずれかにおいて、さらに具体的には、表3に収載されている通りである、(i) C D R 1またはC D R 2またはC D R 3において、(i i) C D R 1およびC D R 2において、またはC D R 1およびC D R 3において、またはC D R 2およびC D R 3において、(i i i) C D R 1およびC D R 2およびC D R 3において1つ、2つまたは3つのアミノ酸の保存的置換（本明細書において定義される）を有していてもよい。

10

【0101】

特定の実施形態によると、本発明は、以下の式(1)

FR1-C D R1-FR2-C D R2-FR3-C D R3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域(FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(C D R1からC D R3)を含むアミノ酸配列であって、C D R1は

- a) 配列番号13-18、
- b) 配列番号13-18と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
- c) 配列番号13-18と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド

20

- a) 配列番号25-30、
- b) 配列番号25-30と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
- c) 配列番号25-30と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド

からなる群から選択され、C D R3は

- a) 配列番号37-42、
- b) 配列番号37-42と少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、
- c) 配列番号37-42と3つ、2つまたは1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

30

【0102】

特に好ましい実施形態では、本発明は、以下の式(1)

FR1-C D R1-FR2-C D R2-FR3-C D R3-FR4 (1)

に従って、4つのフレームワーク領域(FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(C D R1からC D R3)を含むアミノ酸配列であって、C D R1は配列番号13であり、C D R2は配列番号25であり、およびC D R3は配列番号37であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

【0103】

さらに、また、結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインの発現に用いた宿主生物に応じて、欠失および／または置換は、当業者の能力の範囲内にある、1つまたは複数の翻訳後修飾のための部位(1つまたは複数の糖鎖付加部位等)が除去されるような仕方でも設計され得る。あるいは、置換または挿入は、官能基(本明細書に記載されている)付着のための1つまたは複数の部位を導入するよう、たとえば、部位特異的ペグ化を可能にするよう設計され得る。

40

【0104】

修飾と、修飾され得る(すなわち、タンパク質骨格か、好ましくは側鎖のいずれかにおける)結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン内におけるアミノ酸残基、このような修飾の導入に用いられ得る方法および技法ならびにこのような修飾の潜在的な用途および利点の例は、当業者にとって明らかである。たとえば、そのような改変

50

は、1つ以上の官能基、残基または部分を、特に本発明の結合ドメインに1つ以上の望ましい特性または機能性を与える1つ以上の官能基、残基または部分を結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメイン中にまたは上に導入すること（たとえば、共有結合によりまたは別の適切な方法で）を含んでいてもよい。このような官能基およびこれを導入するための技法の例は、当業者にとって明らかであり、当技術分野において言及されているあらゆる官能基および技法ならびに医薬品タンパク質の修飾のため、特に抗体または抗体断片（ScFvおよび単一ドメイン抗体等）の修飾のためのそれ自体は公知の官能基および技法を一般に含むことができ、これに関し、たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mack Publishing Co.、ペンシルベニア州イーストン（1980）について記す。同様に
10 当業者にとって明らかな通り、このような官能基は、たとえば、結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインに直接的に（たとえば共有結合により）連結されても、場合によって、適切なリンカーまたはスペーサーを介して連結されてもよい。半減期を増加および／または医薬品タンパク質の免疫原性を低下させるためにもっとも広く用いられている技法の一法は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）またはその誘導体（メトキシポリ（エチレングリコール）もしくはmPEG等）等、適切な薬理学的に許容されるポリマーの付着を含む。一般に、本技術分野において抗体および抗体断片（（単一）ドメイン抗体およびScFv等が挙げられるが、これらに限定されない）に用いられるペグ化等、任意の適切な形態のペグ化が用いられ得る。たとえば、Chapman、Nat. Biotechnol.、54、531-545（2002）；Veronese and
20 Harris著、Adv. Drug Deliv. Rev. 54、453-456（2003）、Harris and Chess著、Nat. Rev. Drug Discov.、2、（2003）およびWO04060965について記す。タンパク質のペグ化のための様々な試薬は、たとえば、Nektar Therapeutics、米国から市販もされている。好ましくは、特にシステイン残基を介した部位特異的ペグ化が用いられる（たとえば、Yangら、Protein Engineering、16、10、761-770（2003）を参照）。たとえば、この目的のため、PEGが、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインにおける天然起源のシステイン残基に付着されていても、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインが、PEGの付着のための1つもしくは複数のシステイン残基を適切に導入するよう修飾されていてもまたはPEGの付着のため
30 の1つもしくは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列が、本発明のナノボディのNおよび／またはC末端と融合されていてもよく、これらはすべて当業者にとってそれ自体は公知のタンパク質工学の技法を用いる。好ましくは、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインのため、分子量が10,000を超える等、5000を超え、100,000未満等、200,000未満である、たとえば、20,000-80,000範囲のPEGが用いられる。また、通常、より好ましくない修飾として、通常、同時翻訳および／または翻訳後修飾の一部としての、結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインの発現に用いた宿主細胞に応じたN結合型またはO結合型糖鎖付加が挙げられる。結合ドメインの半減期を増加させるための別の技法は、二官能性結合ドメイン（たとえば、一方の免疫グロブリン単一可変ドメインは標的GPCR：Gタンパク質複合体に対し、もう
40 一方はアルブミン等の血清タンパク質に対する）またはペプチド（たとえば、アルブミン等の血清タンパク質に対するペプチド）と結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインの融合体への操作を含み得る。

【0105】

さらに別の修飾は、標識結合ドメインの目的の用途に応じて、1つもしくは複数の検出可能な標識または他のシグナル発生基もしくは部分の導入を含み得る。適切な標識ならびにこれを付着、使用および検出するための技法は、当業者にとって明らかであり、たとえば、インビボ、インビトロまたはインサイチュ診断および画像処理における使用に特に適した蛍光標識（フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オーフタルアルデヒドおよびフルオレサミンなら
50

びにEuまたはランタニド系列由来の他の金属等の蛍光金属等)、リン光標識、化学発光標識または生物発光標識(ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、ジオキセタンまたはGFPおよびそのアナログ等)、放射性同位元素、金属、金属キレートもしくは金属陽イオンまたは他の金属もしくは金属陽イオンならびに発色団および酵素(リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルターVステロイド異性化酵素、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸異性化酵素、ビオチンアビジンペルオキシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコース酸化酵素、ベーターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースV Iーリン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ等)が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な標識は、当業者にとって明らかであり、たとえば、NMRまたはESR分光測定を用いて検出され得る部分を包含する。このような本発明の標識結合ドメインは、たとえば、特異的標識の選択に応じて、インビトロ、インビボまたはインサイチュアッセイ(ELISA、RIA、EIAおよび他の「サンドイッチアッセイ」等、それ自体は公知のイムノアッセイ等)ならびにインビボ診断および画像処理目的に用いられ得る。当業者にとって明らかな通り、たとえば、上に記す金属または金属陽イオンの1つをキレート化するための別の修飾が、キレート化基の導入に参与し得る。適切なキレート化基として、たとえば、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)が限定されることなく挙げられる。さらに別の修飾は、ビオチン(ストレプト)アビジン結合ペア等、特異的結合ペアの一部分である官能基の導入を含み得る。このような官能基は、結合ペアのもう半分と結合している別のタンパク質、ポリペプチドまたは化学物質と本発明の結合ドメインとの、すなわち結合ペアの形成による連結に用いられ得る。たとえば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインは、ビオチンとコンジュゲートされて、アビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートした別のタンパク質、ポリペプチド、化合物または担体と連結され得る。たとえば、このようなコンジュゲートされた免疫グロブリン単一可変ドメインは、たとえば、検出可能シグナル発生薬剤が、アビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートされた診断システムにおけるレポーターとして用いられ得る。このような結合ペアは、たとえば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインと製薬目的に適した担体等の担体との結合にも用いられ得る。非限定的な一例は、Cao and Suresh、Journal of Drug Targeting、8、4、257(2000)によって記載されたりポソーム製剤である。このような結合ペアは、治療上有効な薬剤と本発明の結合ドメインとの連結に用いることもできる。

【0106】

「多価」形態であり、2つ以上の一価免疫グロブリン単一可変ドメインを化学的にまたは組換えDNA技法により一緒に結合させることによって形成される本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインも本発明の範囲内に包含される。多価構築物の非限定的例には、「二価」構築物、「三価」構築物、「四価」構築物などが含まれる。多価構築物内に含まれる免疫グロブリン単一可変ドメインは同一でも異なってもよい。別の特定の実施形態では、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインは「多重特異的」形態であり、その少なくとも1つが異なる特異性を有する2つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインを一緒に結合することにより形成される。多重特異的構築物の非限定的例には、「二重特異的」構築物、「三重特異的」構築物、「四重特異的」構築物などが含まれる。これをさらに説明するならば、本発明の任意の多価または多重特異的(本明細書において定義されている)免疫グロブリン単一可変ドメインは、同じ抗原上の2つ以上の異なるエピトープに、たとえば、GPCR:Gタンパク質複合体に含まれるGタンパク質の2つ以上の異なる部分に適切に対して作製されていてもよいし、または2つ以上の異なる抗原に、たとえば、GPCRのエピトープとGタンパク質のエピトープに対して作製されていてもよい。特に、本発明の一価免疫グロブリン単一可変ドメインは、500nM未満、好

ましくは200 nM未満、さらに好ましくは500 pM未満などの10 nM未満の親和性で標的GPCR：Gタンパク質複合体（本明細書に記載される）に結合することになるようなドメインである。本発明の多価または多重特異性免疫グロブリン単一可変ドメインは、所望のGPCR：Gタンパク質複合体に対して、および／またはそのような多価もしくは多重特異性免疫グロブリン単一可変ドメインの使用により得られる任意の他の所望の特性もしくは所望の特性の組合せに対して増加した結合活性および／または改善した選択性を有していても（または、それらのために操作されるおよび／もしくは選択されても）よい。

【0107】

さらに、本発明の結合ドメイン、特に本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインは、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体が表すまたは前記複合体上で接近可能であるまたは前記複合体の一部である任意の立体構造エピトープに対して一般に作製しまたは特異的に結合することができる。「三次元」エピトープまたは「立体構造」エピトープに特異的に結合する結合ドメインは、折り畳まれたタンパク質またはタンパク質複合体の三次または四次構造に特異的に結合する結合ドメインである。そのような結合ドメインは、線形（すなわち、折り畳まれていない、変性）ポリペプチド鎖にはずっと減少した（すなわち、少なくとも2、5、10、50または100倍低い）親和性で結合する。そのような結合ドメインが結合する構造は通常、タンパク質（複合体）の線形配列において非連続的であるアミノ酸を含有する。言い換えると、そのような結合ドメインのポリペプチドへの結合は、前記ポリペプチドが特定の三次元立体構造に折り畳まれていることに依存している。本発明の結合ドメインにより選択的に認識される立体構造エピトープは、GPCR特異のエピトープ、またはGタンパク質特異のエピトープ、またはそうでなければGPCR：Gタンパク質複合体特異のエピトープになることがあり、これらのエピトープは構成しているタンパク質が会合して、したがって前記GPCRと前記Gタンパク質のアミノ酸残基を結合することによって初めて形成されることは明らかなはずである。一実施形態では、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、任意の所望のGタンパク質またはその部分のどんな立体構造エピトープにでも特異的に結合する。別の実施形態では、前記立体構造エピトープは任意の所望のGPCRの細胞内もしくは細胞外領域の一部、または膜内領域、またはドメインもしくはループ構造になることがある。これらの立体構造エピトープの一部は非会合形態のGPCRおよび／またはGタンパク質において接近可能になり、他の立体構造エピトープは複合体が形成された後においてのみ接近可能になることは明かである。一特定の実施形態によると、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、本明細書においてさらに非限定的例として特定されるように、Gタンパク質の α と β サブユニット間の界面で立体構造エピトープに特異的に結合する（実施例のセクションを参照）。

【0108】

他の特定の実施形態によると、前記結合ドメインは、Gタンパク質がその無ヌクレオチド形態であるGPCR：Gタンパク質複合体に結合する。追加の特定の実施形態によると、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヌクレオチド、特にGDPもしくはGTPなどのグアニンヌクレオチド、またはGTP γ Sなどの非加水分解性GTPアナログ、もしくはフッ化アルミニウムもしくはフッ化ベリリウム種と組み合わされたGDP、もしくはピロリン酸もしくはホスカルネットなどの最小ヌクレオチドアナログなどのそれらのアナログの存在下でのGPCR：Gタンパク質の解離を阻害するまたは防ぐ。本発明の結合ドメインの非存在下では、GPCR：Gタンパク質複合体の解離はこれらのヌクレオチドの存在下で普通に起こる。

【0109】

一特定の態様によると、本発明は、Gタンパク質（すなわち、Gタンパク質単独、したがってGPCRと複合体を形成していない）に対して作製されまたは特異的に結合する結合ドメインも提供する。特定の実施形態では、本明細書に記載される結合ドメインは、Gタンパク質に対して作製されるおよび／または特異的に結合する。この態様の特定の実施

形態によると、本発明の結合ドメインは、ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドまたはアナログ（上文に記載されている）のGタンパク質への結合を防ぐまたは阻害する。または、本発明の結合ドメインは、Gタンパク質からグアニンヌクレオチドまたはアナログを置換することもできる。グアニンヌクレオチドのタンパク質への結合または置換の阻害の程度を決定するアッセイの非限定的例は、実施例のセクション、たとえば、実施例3および8に与えられている。さらに、本発明の結合ドメインに関連する特定の実施形態はすべて、上文に記載されるように、本発明のこの特定の態様についても当てはまることは理解される。

【0110】

GPCRの機能的多用途性は、広範な立体構造を生じるこれらのタンパク質の柔軟性と固有に連動している。立体構造エネルギー景観は、結合リガンド（エフェクター分子、アゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニスト等）の存在、脂質環境または相互作用タンパク質の結合などの要因と内因的に連動している。したがって、一実施形態では、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体の安定性を、前記結合ドメインが結合すると増加する。さらに追加の実施形態では、本発明の結合ドメインが、GPCR：Gタンパク質複合体を含む複合体が表すまたは前記複合体上で接近可能であるまたは前記複合体の一部であるいずれかの立体構造エピソードに結合すると、GPCRの機能的立体構造状態、特に前記GPCRの活性立体構造状態の形成が誘導される。さらに具体的には、本発明の結合ドメインは、受容体に対するGタンパク質の親和性を増加することにより、GPCR：Gタンパク質複合体に含まれるGPCRの活性状態を安定化することができる。同様に、本発明の結合ドメインは、アゴニスト結合GPCR：Gタンパク質複合体を安定化することができるおよび／またはGPCR：Gタンパク質複合体に対するアゴニストの親和性を増強する。好ましくは、結合ドメインはGPCRに対するGタンパク質の親和性および／またはGPCR：Gタンパク質複合体に対するアゴニストの親和性を、 K_d の減少により測定した場合、少なくとも2倍、少なくとも5倍、さらに好ましくは少なくとも10倍増加することができる。代わりに、結合ドメインは、この結合ドメインが非存在である条件と比べて複合体安定化結合ドメインの存在下での受容体とGタンパク質の相互作用強度を比較する任意のアッセイ装置または当業者に公知の親和性もしくは効力の他のいかなる基準においても、 EC_{50} または IC_{50} の変化を少なくとも2倍、少なくとも5倍、さらに好ましくは少なくとも10倍誘導することができる。

【0111】

用語「機能的立体構造状態」とは、本明細書で使用される場合、タンパク質、特にGPCRなどの膜タンパク質が、特に活性なしから最大活性までに及ぶ動的活動範囲を有する多くの異なる立体構造状態を有するという事実のことである（KobilkaおよびDeupi、2007年により概説されている）。「機能的立体構造状態」は、タンパク質の変性状態を網羅するようには意図されていないことは明らかであるはずである。たとえば、基本的立体構造状態は、リガンドの非存在下での受容体の低エネルギー状態として定義することができる。タンパク質が別の立体構造状態への遷移を受ける確率は、2つの状態間のエネルギー差と2つの状態間のエネルギー障壁の高さの関数である。GPCRなどの受容体タンパク質の場合、リガンド結合のエネルギーは、2つの状態間のエネルギー障壁を変えるため、もしくは2つのエネルギー間の相対的エネルギーレベルを変えるために、またはその両方のために使用することができる。エネルギー障壁を変えれば、2つの状態間の遷移速度に影響を与えると考えられ、エネルギーレベルを変えれば2つの状態における受容体の平衡分布に影響を与えると考えられる。アゴニストまたは部分的アゴニストが結合すれば、エネルギー障壁を下げるおよび／または不活性立体構造状態と比べてより活性の高い立体構造状態のエネルギーを減少させると考えられる。インバースアゴニストであれば、エネルギー障壁を増加させるおよび／または活性立体構造と比べて不活性状態立体構造のエネルギーを減少させると考えられる。受容体とそのGタンパク質の共役はエネルギー景観をさらに変化させ得る。リガンド結合アッセイにおいて観察される $\beta 2AR$ と

Gsの協調的相互作用によりGPCR活性化の三元複合体モデルの基礎が形成された（Deleanら、1980年）。アゴニスト、受容体およびGタンパク質からなる三元複合体では、アゴニストに対する受容体の親和性が増強され、グアニンヌクレオチドに対するGタンパク質の特異性はGDPよりもGTPの方に有利に変化する。

【0112】

GPCRを含む膜内在性タンパク質の活動は、膜内で前記タンパク質を取り囲む脂質分子の構造によっても影響を与えられることは注目すべきである。膜タンパク質は固い実体ではなく、変形して周囲を取り囲む脂質二重層に対する良好な疎水性適合を確保する。1つの重要なパラメータは、脂質脂肪アシル鎖の長さにより定義される脂質二重層の疎水性の厚みである。脂質頭部領域の構造も、膜タンパク質のうちの脂質頭部領域に位置する部分の構造を定義するのに重要である可能性がある。他の脂質の中で、パルミトイル化およびGPCRへのコレステロールの結合は単量体受容体内部で構造的役割も果たし、受容体オリゴマーの形成／安定化に寄与している可能性がある（Lee 2004年；ChiniおよびParenti 2009年）。

【0113】

本発明の追加の態様は、本発明の結合ドメインを含む複合体に関する。さらに具体的には、本発明の結合ドメイン、GPCR、Gタンパク質、および場合によって受容体リガンドを含む複合体が提供される。非限定的例として、たとえば、ナノボディ、GPCR、Gタンパク質および受容体リガンドを含有する四元複合体について実行されたように、安定な複合体はゲル濾過により精製し得る（実施例のセクションを参照）。特定の実施形態では、前記複合体は結晶であり得る。したがって、前記複合体の結晶、ならびに前記結晶を作製する方法も提供され、さらに本明細書においてさらに詳細に説明される。

【0114】

別の態様では、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインのいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸配列も本発明の一部であり、非限定的例が表4に与えられている。好ましい実施形態によると、本発明は、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインの核酸配列であって、配列番号49-54の結合ドメインの核酸配列（表4を参照）のうちの少なくとも1つの配列に80%を超える、好ましくは90%を超える、さらに好ましくは99%以上などの95%を超える配列同一性（本明細書において定義されている）を有する核酸配列に関する。割合配列同一性の計算では、タグ（たとえば、HisタグまたはEPEAタグ）の核酸配列は無視されるべきである。その上、本明細書に記載される核酸配列が核酸配列に含まれることもある。

【0115】

さらに、本発明は、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインのいずれかをコードする核酸配列を含む発現ベクター、ならびにそのような発現ベクターを発現する宿主細胞も想定している。適切な発現系には、細菌もしくは酵母における構成的誘導性発現系、バキュロウイルス、セムリキ森林ウイルスおよびレンチウイルスなどのウイルス発現系、または昆虫もしくは哺乳動物細胞における一過性トランスフェクションが含まれる。本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインのクローニング、発現および／または精製は、当業者に公知の技法に従って実行することが可能である。

【0116】

したがって、本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合することができる本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインを発現する細胞または細胞の培養物を包含する。本発明に従った細胞は、原核または真核生物のいずれでも可能である。好ましくは、対象のGPCRおよび／またはGタンパク質を内因的にまたは組換え的に発現する真核細胞、たとえば、酵母細胞もしくは昆虫細胞、または培養細胞株、たとえば、哺乳動物細胞株、好ましくはヒト細胞株である。使用される細胞の性質は典型的には、天然タンパク質（複数可）を産生する容易さおよび経費、所望のグリコシル化特性、標的タンパク質の起源、意図される適用、またはそれらの任意の組合せに依存することになる。タンパク質産生のための真核細胞または改

変されたグリコシル化経路を有する細胞株を含む細胞株は当技術分野では周知であり、非限定的例はこの後与えられることになる。

【0117】

それに続く単離および／または精製のためにタンパク質を宿す、発現および産生するのに適した動物または哺乳動物宿主細胞には、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DG44 (Chasinら、1986年、Som. Cell Molec. Genet.、12:555-556; およびKolkekarら、1997年、Biochemistry、36:10901-10909)、CHO-K1 Tet-On細胞株 (Clontech)、ECACC 85050302と命名されたCHO (CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、CHOクローン13 (GEIMG、Genova、IT)、CHOクローンB (GEIMG、Genova、IT)、ECACC 93061607と命名されたCHO-K1/SF (CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、ECACC 92052129と命名されたRR-CHOK1 (CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ陰性CHO細胞 (CHO/-DHFR、UrlaubおよびChasin、1980年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216) およびdp12 CHO細胞 (米国特許第5,721,121号) などのチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO); SV40により形質転換されたサル腎臓CV1細胞 (COS細胞、COS-7、ATCC CRL-1651); ヒト胎児由来腎臓細胞 (たとえば、293細胞、または293T細胞、または懸濁培養における増殖のためにサブクロニングされた293細胞、Grahamら、1977年、J. Gen. Virol.、36:59、またはGnTI KO HEK293S細胞、Reevesら 2002年、PNAS、99:13419); ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL-10); サル腎臓細胞 (CV1、ATCC CCL-70); アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587; VERO、ATCC CCL-81); マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、1980年、Biol. Reprod.、23:243-251); ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL-2); イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL-34); ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL-75); ヒト肝癌細胞 (HEP-G2、HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562、ATCC CCL-51); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL-1442); TRI細胞 (Mather、1982年、Annals NY Acad. Sci.、383:44-68); MCR 5細胞; FS4細胞が含まれる。特定の実施形態によると、細胞はHeK293細胞またはCOS細胞から選択される哺乳動物細胞である。

【0118】

例となる非哺乳動物細胞株には、Sf9細胞、バキュロウイルス昆虫細胞系 (たとえば、総説Jarvis、Virology 310巻、1号、2003年5月25日、1-7頁)、タバコ細胞、トマト細胞、トウモロコシ細胞、藻類細胞などの植物細胞、またはサッカロマイセス属種 (*Saccharomyces species*)、シゾサッカロマイセス属種 (*Schizosaccharomyces species*)、ハンゼヌラ属種 (*Hansenula species*)、ヤロウイア属種 (*Yarrowia species*) もしくはピキア属種 (*Pichia species*) などの酵母が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態によると、真核細胞は、サッカロマイセス属種 (たとえば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*))、シゾサッカロマイセス属種 (たとえば、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*))、ハンゼヌラ属種 (たとえば、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*))、ヤロウイア属種 (たとえば、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*))、クルイベロミセス属種 (*Kluyveromyces species*) (たとえば、クルイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces la*

ctis))、ピキア属種(たとえば、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*))、またはコマガタエラ属種(*Komagataella species*)(たとえば、コマガタエラ・パストリス(*Komagataella pastoris*))由来の酵母細胞である。特定の実施形態によると、真核細胞はピキア細胞であり、非常に特定の実施形態では、ピキア・パストリス細胞である。

【0119】

標的細胞(たとえば、哺乳動物細胞)のトランスフェクションは、Sambrook and Russel(*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*、第3版、3巻、第16章、第16.1-16.54節)によって概要を述べられた原理に従って行われ得る。さらに、ウイルス形質導入は、アデノウイルスベクター等の試薬を用いても行われ得る。適切なウイルスベクター系、調節領域および宿主細胞の選択は、当業者の技能範囲レベル内の周知の知識である。得られたトランスフェクト細胞は、一般慣例に従って培養において維持されるまたは後に用いるために凍結される。

10

【0120】

したがって、本発明の別の態様は、本発明に従って結合ドメインを産生するための方法であって、少なくとも

a) 適切な細胞発現系(上文に定義されている)において本発明に従った核酸を発現させる段階、および場合によって

b) 前記結合ドメインを単離および/または精製する段階を含む方法に関する。

20

【0121】

本明細書に記載される結合ドメイン、複合体、細胞または細胞株は、種々の状況および適用において、たとえば、制限なしに、GPCR:Gタンパク質複合体を捕捉および/または精製するために、ならびにGPCR:Gタンパク質複合体の結晶化研究および高分解能構造解析において使用することが可能である。したがって、本発明に従った結合ドメイン、特にナノボディなどの免疫グロブリン単一可変ドメインをGPCR:Gタンパク質複合体を安定化させるツールとして使用する、さらにこれらの結合ドメインをGタンパク質と複合体を形成したGPCRの共結晶化補助として、または言い換えると、GPCR:Gタンパク質複合体の結晶生成を促進するために使用することが本発明の目的の1つである。さらにおよび/または代わりに、本明細書に記載される結合ドメイン、好ましくは結合ドメインを発現する細胞系は、リガンドスクリーニング、創薬、免疫化などの他の適用に有用であることが可能であり、これらの適用はすべて下においてさらに詳細に説明されることになる。

30

【0122】

GPCR:Gタンパク質複合体の安定化およびGPCRをGタンパク質結合状態にロックする

したがって、一態様によると、本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体を安定化するための上文に記載される結合ドメインの使用に関する。好ましい実施形態によると、安定化される複合体は、受容体リガンド、さらに具体的にはアゴニストをさらに含む。用語「安定化する(stabilize)」、「安定化する(stabilizing)」または「安定性を増す(increasing the stability)」とは、本明細書で使用される場合、前記複合体の構成タンパク質、特にGPCRおよび/またはGタンパク質のうちの1つまたは両方の構造(立体構造状態)および/または特定の生物活性(細胞内シグナル伝達活性)に関してGPCR:Gタンパク質複合体の安定性を増加することである。一特に好ましい実施形態では、本発明の結合ドメインを使用して、GPCRが活性またはGタンパク質結合状態にロックされるまたは固定されるように、GPCR:Gタンパク質複合体を安定化することができる。そのような活性またはGタンパク質結合状態をとるGPCRは事実上その生物活性を発揮することになる。GPCR:Gタンパク質複合体の(増加した)安定性を決定する方法は、上文に記載されており、実施例

40

50

のセクションでさらに説明される。

【0123】

GPCRの構造および／または特定の生物活性に関して増加した安定性を有することは、熱、界面活性剤、カオトロピック剤および極端なpHを含む他の変性剤または変性条件に対する安定性を含むことは認識される。したがって、追加の実施形態では、本発明に従った結合ドメインは、とりわけ、希釈、濃縮、バッファー組成、加熱、冷却、凍結、界面活性剤、カオトロピック剤、pHにより誘発される非生理的条件下でGPCR：Gタンパク質複合体の安定性を増加することができる。したがって、用語「熱安定化する（thermostabilize）」、「熱安定化する（thermostabilizing）」、「の熱安定性を増加する（increasing the thermostability of）」とは、GPCR：Gタンパク質複合体の熱力学的特性というよりむしろ機能的特性のことであり、加熱、冷却、凍結、化学変性剤、pH、界面活性剤、塩、添加剤、プロテアーゼまたは温度を含むがこれらに限定されない熱的および／または化学的アプローチにより誘発される不可逆的変性に対する構成タンパク質の抵抗性のことである。不可逆的変性により、タンパク質の機能的立体構造は不可逆的にアンフォールディングされ、変性されたタンパク質は生物活性を失い凝集する。用語「（熱）安定化する（（thermo）stabilize）」、「（熱）安定化する（（thermo）stabilizing）」、「の（熱）安定性を増加する（increasing the（thermo）stability of）」とは、本明細書で使用される場合、脂質粒子または脂質層（たとえば、脂質単層、脂質二重層など）に包埋しているGPCR：Gタンパク質複合体に、および界面活性剤中に可溶化されているGPCR：Gタンパク質複合体に当てはまる。

【0124】

熱に対する増加した安定性に関して、これは、リガンド結合を測定することによりまたは漸増する温度でのアンフォールディングに感受性である蛍光、CDまたは光散乱などの分光法を使用することにより容易に決定することができる。結合ドメインは、少なくとも2℃、少なくとも5℃、少なくとも8℃、さらに好ましくは少なくとも10℃または15℃または20℃でのGPCR：Gタンパク質複合体の熱安定性の増加により測定される安定性を増加することができることが好ましい。別の好ましい実施形態によると、結合ドメインは、受容体リガンド、さらに具体的にはGPCR依存性シグナル伝達経路のアゴニストまたは陽性アロステリックモジュレーターを有するGPCR：Gタンパク質複合体の熱安定性を増加することができる。別の好ましい実施形態によると、本発明に従った結合ドメインは、界面活性剤またはカオトロプの存在下でGPCR：Gタンパク質複合体の安定性を増加することができる。好ましくは、結合ドメインは熱的または化学的アプローチによる誘発される変性に対するGPCR：Gタンパク質複合体の安定性を増加することができる。熱、界面活性剤またはカオトロプに対する増加した安定性に関して、典型的にはGPCR：Gタンパク質は、試験界面活性剤または試験カオトロピック剤の存在下で規定された時間インキュベートされ、その安定性は、たとえば、上で考察されたように、場合によって漸増する温度でリガンド結合または分光法を使用して決定される。さらに別の好ましい実施形態によると、本発明に従った結合ドメインは、極端なpHに対するGPCRの機能的立体構造状態の安定性を増加することができる。好ましくは、結合ドメインは極端なpHに対するGPCR：Gタンパク質複合体の安定性を増加することができる。極端なpHに関して、典型的なpH試験は、たとえば、6から8の範囲、5.5から8.5の範囲、5から9の範囲、4.5から9.5の範囲で、さらに具体的には、4.5から5.5の範囲で（低pH）または8.5から9.5の範囲で（高pH）選択されることになる。

【0125】

特に好ましい実施形態では、本発明に従った結合ドメインを使用して、ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドまたはそのアナログの存在下での前記複合体の解離を防ぐことができる。さらに具体的には、グアニンヌクレオチドには、GDPおよびGTPが含まれ

、グアニンヌクレオチドのアナログには、限定的ではなく、GTPγSまたはフッ化アルミニウムもしくはフッ化ベリリウム種と組み合わせたGDPまたはピロリン酸もしくはホスカルネットなどのヌクレオチド断片が含まれる。

【0126】

GPCR：Gタンパク質複合体を捕捉および／または精製する

したがって、安定なGPCR：Gタンパク質複合体を形成する能力はGPCR：Gタンパク質複合体を捕捉および／または精製するのに特に有用であり、これにより、とりわけ、それに続く結晶化、リガンド特徴付けおよび化合物スクリーニング、免疫化が可能になることは理解される。さらに、本発明の結合ドメインが、広範囲のGPCR：Gタンパク質複合体に適用可能であり得る有用な一般的ツールになることができるのは特に有利である。

10

【0127】

したがって、本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体を捕捉および／または精製する方法であって、

- a) 本発明に従った結合ドメインを用意する段階、
 - b) 結合ドメインをGPCRおよびGタンパク質を含む複合体に結合させる段階、ならびに
 - c) 場合によって、段階b) で形成された複合体を単離する段階
- を含む方法も想定している。

20

【0128】

特定の実施形態では、本発明はGPCRとGタンパク質を含む複合体を捕捉する方法であって、

- a) 複数のGPCRおよびGタンパク質を含有する溶液を、本発明に従った固定化された結合ドメインを有する固体支持体に適用する段階、
 - b) 結合ドメイン、GPCRおよびGタンパク質の複合体を形成する段階、ならびに
 - c) 弱く結合しているまたは非結合の分子を取り除く段階
- を含む方法を提供する。

【0129】

本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体を精製する方法であって、

- a) GPCRおよびGタンパク質を含有する溶液を、本発明に従った結合ドメインに接触させる段階、
 - b) 結合ドメイン、GPCRおよびGタンパク質を含む複合体を形成する段階、ならびに
 - c) 段階b) の複合体を単離する段階
- を含み、GPCRとGタンパク質の複合体が基本的に精製されている、方法も想定している。

30

【0130】

特定の実施形態によると、本明細書に記載される結合ドメインを使用して、受容体リガンドおよび／または1つ以上の他の相互作用タンパク質をさらに含む標的GPCR：Gタンパク質複合体を捕捉することもできる。

【0131】

標的GPCR：Gタンパク質複合体を捕捉する／精製するための上記方法には、制限なしに、とりわけ、親和性クロマトグラフィー、親和性精製などの親和性ベースの方法、免疫沈降、タンパク質検出、免疫化学、表面ディスプレイが含まれ、すべてが当技術分野では周知である。

40

【0132】

GPCR：Gタンパク質複合体の結晶化およびこの構造の解明

GPCRを含む膜タンパク質の結晶化は依然として手強い課題である。ミリグラム量の生成を可能にする発現および精製法が現れてきているが、これらの分子の安定性を達成するのはおそらく克服するのがもっとも困難な障害物である。

【0133】

50

第一に、本発明による結合ドメインは、界面活性剤で可溶化したGPCR：Gタンパク質複合体の安定性を増大させ、この受容体をタンパク質分解および／または凝集から保護し、正しく折り畳まれたタンパク質の均一な試料の精製および濃縮を促進することができる。当業者であれば、そのような試料は回折結晶の生成のための好まれる出発点であることを認識する。

【0134】

結晶化は、X線結晶学による巨大分子構造決定のプロセスにおけるもう1つの大きな障害である。結晶化の成功には、核の形成およびこれに続く適切な大きさの結晶へのその成長が必要である。結晶成長は一般に、同種の核形成の結果として過飽和溶液中で自然に起こる。タンパク質は典型的な低密度マトリックススクリーニング実験において結晶化することができ、この実験において沈殿剤、添加剤およびタンパク質濃度が広範にサンプリングされ、核形成と結晶成長に適した過飽和条件を特定のタンパク質について同定することが可能である。たとえば、タンパク質に結合するリガンドを添加することによりまたは優先的に標的タンパク質の表面残基において異なる変異体を作製することによりまたは標的タンパク質の異なる種のオルソログの結晶化を試みることにより、タンパク質それ自体において構造変異を生み出すことは低密度マトリックススクリーニングアプローチに関係している（Chang 1998）。本発明の1つの思いがけない発見は、GPCR：Gタンパク質複合体に特異的に結合して、複合体の全体的フォールドは保存しつつ結合にある程度の構造変異を導入する、結合ドメインの有用性である。

【0135】

結晶化は、結晶格子に組み立てられる分子における立体構造エントロピーの好ましくない喪失を伴うために、まだ溶液のまま標的の立体構造エントロピーを減少させる方法は、格子形成の正味のエントロピーペナルティを低下させることにより結晶化の尤度を増強するはずである。「表面エントロピー減少」アプローチは極めて効果的であることが判明している（Dewenda 2004）。同様に、イオン、小分子リガンドおよびペプチド等の結合パートナーは、タンパク質の立体構造状態のサブセットに結合して安定化させることにより立体構造不均一性を減少させることができる。そのような結合パートナーは効果的ではあるが、すべてのタンパク質が既知の結合パートナーを有しているわけではなく、結合パートナーが既知の場合でも、その親和性、溶解性および化学的安定性は結晶化の試みと両立しないこともある。したがって、驚くべきことに、本発明の結合ドメインは、Gタンパク質の具体的な立体構造に結合することにより標的GPCR：Gタンパク質複合体における立体構造不均一性を最小限に抑えることによって秩序だった結晶を得る可能性を増加させるツールとして使用することが可能であることが見出された。

【0136】

高分解能構造研究のためのGPCRの結晶化は、これらの膜タンパク質の両親媒性表面のせいで特に困難である。膜二重層に埋め込まれているので、リン脂質のアシル鎖とのタンパク質の接触部位は疎水性であり、極曲面は脂質の極性頭部および水相に曝露されている。秩序だった三次元結晶、つまり高分解能でのX線構造解析の必要条件を得るために、GPCRは界面活性剤の助けを借りて可溶化され、タンパク質－界面活性剤複合体として精製される。界面活性剤ミセルは膜タンパク質の疎水性表面を帯状の様式で覆う（Hunte and Michel 2002；Ostermeierら、1995）。GPCR－界面活性剤複合体は、隣接するタンパク質分子間の接触が界面活性剤ミセルから突出しているタンパク質の極曲面により作られる三次元結晶を形成する（Dayら、2007）。明らかに、界面活性剤ミセルには結晶格子における空間が必要である。ミセル間の引力相互作用は結晶パッキングを安定化する可能性はあるが（Rasmussenら、2007；Dunnら、1997）、これらの相互作用は強固な結晶接触をもたらさない。GPCRを含む多くの膜タンパク質が比較的小さなまたは高度に柔軟な親水性ドメインを含有しているので、秩序だった結晶を得る可能性を増加させるための戦略は、タンパク質の極曲面を拡大するおよび／またはその柔軟性を減少させることである。もっとも生理的なアプローチは、Gタンパク質またはアレスチンなどの天然のシグナル伝達パートナーを使

用することである。不運なことに、GPCRとGタンパク質またはアレスチンとの相互作用は高度に脂質依存性であり、結晶学のための十分安定な複合体を形成することは困難であった。したがって、本発明の結合ドメインを使用すれば、Gタンパク質との結合によってGPCRの極曲面を拡大し、Gタンパク質およびナノボディの極曲面によって結晶格子中の分子間の一次接触を促進することができるタンパク質表面の量を補うことが可能である。本発明の結合ドメインは、その細胞外領域の柔軟性を減少させて秩序だった結晶を成長させることも可能である。ナノボディを含む免疫グロブリン単一可変ドメインは、立体構造エピトープに結合しており、単一の強固な球状ドメインで構成されており、従来の抗体またはFab'等の断片由来とは違って柔軟なリンカー領域を欠くために、この目的には特に適している。

10

【0137】

したがって、好ましい実施形態によると、本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体を結晶化し、最終的にはその構造を解明するためのツールとして有用な結合ドメインを提供する。さらに好ましくは、本発明の結合ドメインを利用することにより結晶化される複合体は、受容体リガンド、さらに具体的には、アゴニストをさらに含む。特に好ましい実施形態では、複合体に含まれるGPCRは活性状態または立体構造である。

【0138】

したがって、GPCR：Gタンパク質複合体および場合によって受容体リガンドと複合体を形成している結合ドメインは、膜タンパク質のための種々の特殊化した結晶化法のいずれを使用して結晶化してもよく、前記方法の多くはCaffrey (2003 & 2009) に概説されている。一般的には、前記方法は結晶化に先立って脂質を複合体に添加することを含む脂質ベースの方法である。そのような方法は、他の膜タンパク質を結晶化するために既に使用されてきた。脂質立方相結晶化法およびバイセル (bicelle) 結晶化法を含む、これらの方法の多くが脂質と界面活性剤の自然な自己組織化特性を小胞 (小胞融合法)、円盤状ミセル (バイセル法) および液体結晶または中間相 (中間または立方相法) として利用する。脂質立方相結晶化法は、たとえば、Landauら、1996 ; Gouaux 1998 ; Rummelら、1998 ; Nollertら、2004、Ramussenら、2011に記載されており、これら出版物はそれらの方法の開示について参照により組み込まれる。バイセル結晶化法は、たとえば、Fahamら、2005 ; Fahamら、2002に記載されており、これら出版物はそれらの方法の開示について参照により組み込まれる。

20

30

【0139】

別の実施形態によると、本発明は、GPCRおよびGタンパク質を含み、場合によってさらに受容体リガンドを含む標的複合体の構造を解明するために本明細書に記載されている結合ドメインの使用に関する。本明細書で使用される「構造を解明する」とは、タンパク質の原子の配置または原子座標を決定することであり、X線結晶学等の生物物理学的方法により行われることが多い。

【0140】

X線結晶学において、正しく組み立てられた場合の回折データは、単位胞における分子の電子密度の3Dフーリエ変換の振幅を与える。位相が分かっている場合、電子密度はフーリエ合成により簡単に得ることができる。タンパク質複合体において、構造が既知のタンパク質 (探索モデル) の割合が低い (アミノ酸含有量の50%未満) 場合および/または結晶が限定された回折特質を示す場合には、分子置換 (MR) のみから位相情報を導き出すことが成功するかは疑わしい。多重同形置換 (MIR) とMR位相合わせを組み合わせるとタンパク質複合体では首尾よくいくことが判明しているが (たとえば、Ostermeierら、1995 ; Liら、1997 ; Huntら、2000)、良好な重原子誘導体を作製する必要があることがほとんどの場合に問題となる。この10年にわたり、古典的MIRアプローチは一般には、主にセレノメチオニン (SeMet) 取り込みを使用する異常分散データの使用 (MADまたはSAD) に取って代わられた (Hendrickson 1991)。実際、Seエッジエネルギーを使用する異常実験データは一般

40

50

に、M I RまたはモデルベースのM R位相合わせデータと比べて優れたバイアスの少ない位相情報を提供する。したがって、一特定の実施形態は、M RまたはM A DによるG P C R：G 複合体の位相合わせのための本発明に従った結合ドメインの使用に関する。特に、ナノボディを含む免疫グロブリン単一可変ドメインは一般に、強固に発現し、S e M e t 取り込みに適している。これをさらに説明すると、制限されることなく、すべてのS e M e t 部位をナノボディ単独に導入することによりG P C R、G タンパク質およびナノボディを含む複合体の位相合わせにより、S e M e t 部位をG P C RまたはG タンパク質に組み込ませる必要性は回避される。

【0141】

多くの場合に、回折特質結晶を得ることは、この原子分解能構造を解明することに対する主要な障害となっている。したがって、特定の実施形態に従って、本明細書に記載されている結合ドメインを使用すれば、標的複合体の結晶構造を解明することができるように結晶の回折特質を改善することが可能である。

【0142】

さらに、たとえば、G P C R創薬を導く一助とするためにG P C R標的の構造情報を得ることが極めて望ましい。より多くのG P C Rの結晶化以外に、とりわけアゴニスト、アンタゴニスト、アロステリック調節因子および／またはG タンパク質を含む異なる種類のリガンドに結合している受容体の構造を得るための方法が必要とされている。本発明は、G P C R：G タンパク質複合体の結晶を得るための一般的ツールを特に提供する。特に、アゴニスト結合G P C R：G タンパク質複合体結晶はG P C Rの活性状態の三次元表示を提供し得る。これらの構造は、リガンド結合とG タンパク質相互作用部位を連結する立体構造変化を明らかにし、より正確な機構的仮説および最終的には新しい治療学をもたらすのに役立つ。リガンド活性化されたG P C Rに固有の立体構造的柔軟性およびアゴニスト結合受容体により示されるより大きな不均一性を考慮すると、そのような状態を安定化させるのは容易ではない。したがって、そのような努力は、そのような複合体に特異的な結合ドメインを付加することによりそのヘテロ三量体G タンパク質に結合しているアゴニスト結合受容体立体構造の複合体の安定化から利益を得ることが可能である。そのような複合体の一部を形成するG タンパク質に結合する結合ドメインは特に適している。なぜならば、これらの結合ドメインは同じG タンパク質を通じてシグナル伝達するすべてのG P C Rを安定化するための一般的ツールとして使用することができるからである（たとえば、G s 共役受容体、G i 共役受容体、等）。

【0143】

別の実施形態によると、本発明は、G P C RとG タンパク質を含む複合体の結晶構造を決定する方法であって、

- a) 本発明に従った結合ドメインを用意する段階、
 - b) 前記結合ドメインをG P C RおよびG タンパク質を含む複合体に結合させる段階、ならびに
 - c) 段階b) で形成される複合体を結晶化する段階
- を含む方法を包含している。

【0144】

結晶構造を決定する上記方法の特定の実施形態では、G P C RとG タンパク質を含む標的複合体は、前記G P C Rに結合している受容体リガンド、さらに具体的にはアゴニストをさらに含む。

【0145】

結晶構造の前記決定はX線結晶学等の生物物理学的方法により行うことができる。前記方法は、結晶の原子座標（上文に定義されている）を得る段階をさらに含むことができる。

【0146】

G P C R：G タンパク質複合体を標的にする化合物の同定

化合物スクリーニング、創薬およびリード最適化の過程において、様々な化合物特徴

よび様々な細胞経路に対するそれらの効果（すなわち、有効性、特異性、毒性および薬剤代謝）に関する同時情報を提供するより迅速でより効果的で経費が少なく特に情報が豊富なスクリーニングアッセイの必要性が存在する。したがって、潜在的な新しい薬剤候補であり得る対象のGPCRの新しい特異的リガンド、好ましくは立体構造特異的リガンドを同定するために多数の化合物を迅速に安価にスクリーニングする必要性が存在する。本発明は、その後種々の状況においてスクリーニングするための免疫原または選択試薬として使用することができる、機能的立体構造状態のGPCR：Gタンパク質複合体を安定化する結合ドメインを提供することにより、この問題を解決する。本発明による結合ドメインの大きな利点は、GPCR：Gタンパク質複合体に含まれるGPCRを安定化された機能的立体構造、特に活性状態の立体構造に保つことができる点である。たとえば、受容体のこの活性立体構造に選択的に結合するライブラリー化合物は、GPCRの活性立体構造のオルソステリックまたはアロステリック安定化が生物学的応答を誘発するために、アゴニストとして振る舞うより高い傾向を有する。別の利点は、結合ドメインが複合体に含まれるGPCRの活性立体構造の熱安定性を増大させ、したがって、安定性が増大する変異GPCRに頼る必要なしで、化合物スクリーニングおよび創薬に使用される非自然条件により誘導される不可逆的または熱変性に対してGPCRを保護する点である。本発明による立体構造選択性結合ドメインの別の大きな利点は、前記ドメインが受容体アゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニストおよび／またはモジュレーターならびにGPCRおよびGPCR依存性経路の阻害剤について迅速に確実にスクリーニングし区別することを可能にし、したがって望ましい薬理特性のあるリガンドを同定する尤度を増加する点である。

10

20

【0147】

このことをさらに説明すると、大半のGPCRがGタンパク質と複合体化されると、さらに高いアゴニスト結合親和性を示すことは確立した概念である。これは、アゴニスト占有受容体とGタンパク質間の協調的相互作用に起因すると考えられる。したがって、GPCRとGタンパク質の複合体の解離を阻害する本発明の結合ドメインは、R：Gタンパク質複合体の活性立体構造状態を安定化し、このようにしてアゴニストに対するGPCRの親和性を増加させインバースアゴニストに対する親和性を減少することになる。R：G複合体の活性機能的立体構造を認識する結合ドメインは、たとえば、インバースアゴニストと比べてアゴニストに対する受容体の親和性を増加するので、アゴニストについてスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイにおいて使用することが可能であるということになる。G：R複合体の活性機能的立体構造を認識する結合ドメインも、サブセットの受容体シグナル伝達活性、たとえば、 β アレスチン機能と比べてGタンパク質の選択的活性化を選択的に刺激する能力のあるバイアスアゴニストについてスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイにおいて使用することが可能である。特定の実施形態によると、GPCRと複合体を形成しているGタンパク質に特異的に結合する結合ドメイン（たとえば、表2-3）は、複数のGPCRを標的にするスクリーニングプログラムのための普遍的ツールとして使用することができる。なぜならば、特定のGタンパク質（たとえば、Gs）は複数のGPCRと複合体（たとえば、5-HT受容体型5-HT₄および5-HT₇を含むGs共役受容体、ACTH受容体、アデノシン受容体型A_{2a}およびA_{2b}、アルギニンバソプレシン受容体2、 β アドレナリン受容体型 β_1 、 β_2 および β_3 、カルシトニン受容体、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体、ドーパミン受容体D₁様ファミリー（D₁およびD₅）、FSH受容体、胃抑制ポリペプチド受容体、グルカゴン受容体、ヒスタミンH₂受容体、黄体形成ホルモン／絨毛性ゴナドトロピン受容体、メラノコルチン受容体、副甲状腺ホルモン受容体1、プロスタグランジン受容体型D₂およびI₂、セクレチン受容体、甲状腺刺激ホルモン受容体、等；表1も参照）を形成することになるからである。

30

40

【0148】

したがって、本発明の別の態様は、最終的には潜在的な新薬候補をもたらす可能性のあ

50

る、GPCR：Gタンパク質複合体の立体構造特異的結合パートナーについてのスクリーニングおよび／または同定プログラムにおける、上文においてすべて記載されている結合ドメインの使用、または結合ドメインを含む複合体、細胞、膜調製物の使用を包含している。

【0149】

一実施形態に従って、本発明は、GPCR：Gタンパク質複合体と選択的に結合することができる化合物を同定する方法であって、

(i) GPCRおよびGタンパク質を含む複合体を用意する段階、

(ii) 前記複合体を前記複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインに接触させ、前記結合ドメインを前記複合体に結合させる段階、

(iii) 試験化合物を用意する段階、

(iv) 試験化合物が複合体と結合するかどうかを評価する段階ならびに

(v) 複合体と選択的に結合する化合物を選択する段階

を含む方法を想定している。

【0150】

上記方法のいずれかにおいて使用される結合ドメインは、GPCR：Gタンパク質複合体の機能的立体構造状態を安定化することができ、複合体の解離を防ぐことは明らかになる。好ましくは、GPCR：Gタンパク質複合体は活性立体構造状態（上文で定義されている）である。上記スクリーニング法の特に好ましい実施形態によると、GPCR：Gタンパク質複合体は受容体リガンドをさらに含む。

【0151】

結合ドメインの特に好ましい実施形態は、本発明の前の態様に関して上文に記載されている通りであることは注目すべきである。

【0152】

したがって、本発明の結合ドメインはスクリーニングアッセイにおいて有用になることができる。創薬のためのスクリーニングアッセイは固相または液相アッセイ、たとえば、放射性リガンド結合アッセイなどの結合アッセイであることが可能である。いくつかの例において、試験化合物のハイスループットスクリーニングが好まれ、上記の方法は当業者には周知である用語「ライブラリースクリーニング」法として使用し得ることが認識される。したがって、試験化合物は試験化合物のライブラリーでもよい。特に、アゴニスト、アンタゴニストもしくはインバースアゴニストおよび／またはモジュレーター等の治療化合物についてのハイスループットスクリーニングアッセイは本発明の一部を形成する。ハイスループット目的で、アロステリック化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー、抗体ライブラリー、断片ベースのライブラリー、合成化合物ライブラリー、天然化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー等の化合物ライブラリーを使用し得る。そのようなライブラリーを調製しスクリーニングするための方法論は当技術分野において公知である。好ましい一実施形態において、ハイスループットスクリーニング法は、多数の潜在的治療リガンドを含有するコンビナトリアル化学的またはペプチドライブラリーを提供することを含む。次に、そのような「コンビナトリアルライブラリー」または「化合物ライブラリー」は、本明細書に記載されるように1つまたは複数のアッセイにおいてスクリーニングされて、所望の特徴的活性を示すライブラリーメンバー（特定の化学種またはサブクラス）を同定する。「化合物ライブラリー」は、通常は最終的にハイスループットスクリーニングにおいて使用される保存された化学物質のコレクションである。「コンビナトリアルライブラリー」は、試薬等のいくつかの化学的「構成要素」を組み合わせることによって、化学的合成または生物学的合成により生み出される多様な化学化合物のコレクションである。コンビナトリアルライブラリーの調製およびスクリーニングは当業者には周知である。このようにして同定された化合物は従来の「リード化合物」としての役割を果たすことができる、またはそれ自体が潜在的なもしくは実際の治療薬として使用することができる。したがって、一追加の実施形態において、本明細書に上で記載されるスクリーニング法は、立体構造的に活性なGPCR：Gタンパク質複合体に結合することが明

らかにされている試験化合物を改変し、前記改変された試験化合物が特定の立体構造に属するときにGPCRに結合するかどうかを決定することをさらに含む。

【0153】

立体構造特異的結合パートナーについての標的GPCR：Gタンパク質複合体のハイスループットスクリーニングが好まれる場合、これは本発明に従った結合ドメイン、または結合ドメインにより安定化されたGPCR：Gタンパク質複合体を、整列させるまたは他の方法で多重化することができる適切な固体支持体上に固定化することにより促進される。適切な固体支持体の非限定的例には、ビーズ、カラム、スライド、チップまたはプレートが含まれる。さらに具体的には、固体支持体は、粒状（たとえば、一般に抽出カラムで使用されるビーズまたは顆粒）または平坦、ひだ状、もしくは中空繊維もしくはチューブであることが可能なシート形態（たとえば、膜またはフィルター、ガラスまたはプラスチックスライド、マイクロタイターアッセイプレート、ディップスティック、キャピラリーフィルデバイス、等）でもよい。以下のマトリックスが例として与えられており、網羅的ではなく、そのような例には、シリカ（多孔質アモルファスシリカ）、すなわち、Bio tag e (Dy ax Co r p . の一部門)により供給される60Å不定形シリカ(32-63 μmまたは35-70 μm)を含有するFLASHシリーズのカートリッジ、アガロースまたはポリアクリルアミド支持体、たとえば、Amersham Pharmacia Biotechにより供給されるSephareseレンジの製品またはBio-Radにより供給されるAffi-Gel支持体が含まれ得る。さらに、Bio-Radにより供給される圧力安定性Affi-Prep支持体などのマクロ多孔質ポリマーがある。利用できる他の支持体には、デキストラン、コラーゲン、ポリスチレン、メタクリレート、アルギン酸カルシウム、コントロールドボアガラス、アルミニウム、チタニウムおよび多孔質セラミックスが含まれる。代わりに、固体表面は質量依存センサー、たとえば、表面プラズモン共鳴検出器の一部を備えていてもよい。市販されている支持体の追加の例は、たとえば、Protein immobilisation、R. F. Taylor編、Marcel Dekker、Inc.、New York、(1991年)で考察されている。

【0154】

固定化は非共有結合的でも共有結合的でもよい。特に、固体表面上への本発明に従った結合ドメインまたは結合ドメインにより安定化されたGPCR：Gタンパク質複合体の非共有結合固定化または吸着は、当業者には公知の標準技法（たとえば、ビオチンタグ、ヒスチジンタグ、等）に従って、結合ドメインまたはGPCRに結合している分子タグを認識する、抗体、またはストレプトアビジンもしくはアビジンまたは金属イオンのいずれかを介した表面被覆を介して起こり得る。代わりに、本発明に従った結合ドメインまたは結合ドメインにより安定化されたGPCR：Gタンパク質複合体は、従来のカップリング化学を使用する共有架橋結合により固体表面に結合されてもよい。固体表面は、共有結合に適した架橋結合可能な残基を天然に含んでいてもよいし、または当技術分野で周知の方法に従って適切な架橋結合可能な基を導入するよう被覆されているもしくは誘導体化されてもよい。一特定の実施形態では、固定化されたタンパク質の十分な機能性は、化学的スパーサーアームを含有しない反応性部分を介して所望のマトリックスに直接共有結合するの

に続いて保持される。固体支持体上への抗体（断片）の固定化法に関するさらなる例および詳細な情報はJungら（2008年）で考察されており、同様に、膜受容体固定化法はCooper（2004年）で概説されている。前記両文献は参照により本明細書に組み込む。特に、特定のアミノ酸（既知のまたは推測される構造を有するタンパク質中の）がリジンまたはシステイン（または他の所望のアミノ酸）に変異すれば、たとえば、共有結合のための特定の部位を提供することができる。特定のタンパク質を再設計して、化学結合に関与する表面で利用可能なアミノ酸の分布を変え（Kallwasら、1993年）、事実上、結合したタンパク質の配向を制御することも可能である。類似するアプローチを、本発明に従った結合ドメインに、ならびに立体構造的に安定したGPCR：Gタンパク質複合体に適用することができ、したがって天然のまたは非天然のアミノ酸のどち

らかを含有する他のペプチドテールまたはドメインを付加することなく指向性固定化の手段を提供する。ナノボディなどの抗体または抗体断片の場合、抗体（断片）の抗原結合活性の破壊を最小限に抑えるフレームワーク領域への変異の導入が好ましい。

【0155】

都合がよいことに、固定化されたタンパク質は、免疫アッセイ、たとえば、ELISAなどの免疫吸着プロセス、または当技術分野では従来の標準法に従って本発明に従った固定化されたタンパク質を試験試料（すなわち、とりわけ試験化合物を含む）に接触させることによる免疫親和性精製プロセスにおいて使用し得る。代わりに特にハイスループット目的で、固定化されたタンパク質は整列させるまたは他の方法で多重化させることが可能である。好ましくは、本発明に従った固定化されたタンパク質は、特にGPCRが活性立

10

【0156】

結合ドメイン、または（立体構造的に安定化された）GPCR：Gタンパク質複合体、またはその構成タンパク質のいずれかを、適用の種類または実行する必要があるスクリーニングの種類に応じて固定化してもよいことは認識される。その上、GPCR：Gタンパク質安定化結合ドメイン（GPCR：Gタンパク質複合体の特定の立体構造エピトープを標的にする）の選択はタンパク質の配向、したがって、化合物同定の所望の結果、たとえば、前記立体構造的に安定化されたGPCRの細胞外部分、膜内部分もしくは細胞内部分に特異的に結合する化合物または前記立体構造的に安定化されたGタンパク質に特異的に

20

【0157】

代わりに、試験化合物（または試験化合物のライブラリー）は、チップ表面などの固体表面に固定化してもよく、結合ドメインおよびGPCR：Gタンパク質複合体は、たとえば、界面活性剤溶液でまたは膜様調製物で提供される（下参照）。

【0158】

もっとも好ましくは、たとえば、溶液でのファージディスプレイ選択プロトコールまたは放射性リガンド結合アッセイの場合のように、結合ドメインもGPCR：Gタンパク質複合体も、またはその構成タンパク質も試験化合物も固定化されない。好ましい実施形態では、上記スクリーニング法のいずれかで使用される結合ドメイン、GPCR：Gタンパク質複合体（または別に、構成タンパク質）は、それぞれのタンパク質の十分な機能性が保持されるように、細胞全体もしくは膜抽出物もしくはそれらの部分などの細胞（細胞小器官）抽出物として提供される、または脂質層もしくはベシクル（天然および／または合成脂質を含む）、高密度リボ粒子もしくはナノディスクなどの任意のナノ粒子に組み込んでもよく、またはVLPとして提供される。膜断片または膜－界面活性剤抽出物から形成されるGPCRの調製物はCooper（2004年）に詳細に概説されており、前記文献は参照により本明細書に組み込む。代わりに、結合ドメイン、GPCR：Gタンパク質複合体または構成タンパク質は、界面活性剤中に可溶化してもよい。可溶化された受容体調製物の非限定的例は実施例のセクションにおいてさらに提供されている。

30

【0159】

たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、表面プラズモン共鳴アッセイ、チップベースのアッセイ、免疫細胞蛍光法、酵母ツーハイブリッド技術およびファージディスプレイを含む様々な方法を使用して安定化されたGPCR：Gタンパク質複合体と試験化合物間の結合を決定し得、これらの方法は、たとえば、Sambrookら．（2001年）、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにおいて当技術分野では一般的方法となっている。試験化合物とGPCR間の結合を検出する他の方法には、イオンスプレー質量分析／HPLC法を用いる限外濾過または他の（生物）物理学

40

50

移 (FRET) 法も使用し得る。本明細書においてさらに記載されているように、結合した試験化合物は、ペプチド標識、核酸標識、化学標識、蛍光標識または高周波タグなどの化合物と会合している独自の標識またはタグを使用して検出することが可能であることは認識される。

【0160】

化合物および／またはそれを含む組成物の有効性は、関連する特定の疾患または障害に応じて、任意の適切なインビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、インビボアッセイおよび／またはそれ自体が公知の動物モデルまたはそれらの任意の組合せを使用して試験することが可能である。

【0161】

一特定の実施形態において、前記化合物が受容体リガンド (上で定義される) への GPCR の結合を変化させるかどうかが決まる。GPCR のこのリガンドへの結合は、本明細書に記載される当技術分野で公知の標準リガンド結合法を使用してアッセイすることが可能である。たとえば、リガンドは放射標識されても蛍光的に標識されてもよい。前記アッセイは、ホールセルでまたは細胞もしくは界面活性剤を用いて水性の可溶化された受容体から得られた膜で実施し得る。前記化合物は、標識されたリガンドの結合を変化させるその能力により特徴付けられる (実施例の節も参照)。前記化合物は、たとえば、少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、100 倍の因数で、GPCR とそのリガンド間の結合を減少させ得るし、または GPCR とそのリガンド間の結合を増加させ得る。したがって、さらに具体的な実施形態によると、上記スクリーニング法のいずれでも使用される複合体は、受容体リガンドをさらに含む。好ましくは、受容体リガンドは、小分子、ポリペプチド、抗体またはこれらに由来する任意の断片、天然物等を含む群から選択される。さらに好ましくは、受容体リガンドは、上文に記載されるように、完全アゴニストまたは部分アゴニストまたはインバースアゴニストまたはアンタゴニストである。

【0162】

機能的立体構造状態の標的 GPCR : G タンパク質複合体に結合することを確立することに加えて、GPCR : G タンパク質複合体に対する、特に GPCR および下流相互作用パートナーの生物活性に対する化合物の機能的効果を決定することも望ましい。特に、本発明に従った結合ドメインを使用して、GPCR : G タンパク質複合体またはその構成成分である GPCR もしくは G タンパク質の生物活性を調節する (増加するまたは減少する) 化合物についてスクリーニングすることができる。生物活性の所望の調節は一般に好まれる GPCR に依存することになる。化合物は、標的 GPCR : G タンパク質複合体に、特にその構成成分のうちの 1 つまたは両方に結合して、下流受容体シグナル伝達を調節し得る (活性化するまたは阻害する)。GPCR シグナル伝達のこの調節はオルソステリックス的にまたはアロステリックス的に起こることが可能である。化合物は、G タンパク質に結合している GPCR を含む標的複合体もしくはその構成成分に結合して、受容体シグナル伝達を活性化するもしくは増加する、または代わりに受容体シグナル伝達を減少するもしくは阻害し得る。化合物は、GPCR の構成的活性を遮断するように標的複合体に結合することもある。化合物は、アロステリック調節を媒介する (たとえば、GPCR または G タンパク質にアロステリック部位で結合する) ように標的複合体に結合することもある。このように、化合物は、GPCR : G タンパク質複合体中の異なる領域に (たとえば、アロステリック部位に) 結合することにより受容体機能を調節し得る。たとえば、George ら、(2002 年)、Kenakin (2002 年) および Rios ら、(2001 年) を参照されたい。本発明の化合物は、GPCR 媒介シグナル伝達の持続時間を延長する、または受容体リガンド親和性を増加することにより受容体シグナル伝達を増強するように標的複合体に結合することもある。さらに、化合物は、GPCR 機能的ホモマーまたはヘテロマーの組立てを阻害するまたは増強するように標的複合体に結合することもある。

【0163】

細胞ベースのアッセイは、新しい生物学的標的の作用機構および化学化合物の生物学的活性を評価するためにも極めて重要である。GPCRのための現在の細胞ベースのアッセイには、経路活性化の基準（ Ca^{2+} 放出、cAMP生成または転写活性）；GPCRおよび下流エレメントにGFPのタグを付けることによるタンパク質輸送の測定；ならびにフォルスター共鳴エネルギー転移（FRET）、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）または酵母ツーハイブリッドアプローチを使用するタンパク質間の相互作用の直接基準が含まれる。当技術分野で周知であり一般的に使用されている任意の手段により、本発明の結合ドメインを細胞内部の関連する細胞の区画に（細胞内にまたは細胞外に）導入すれば、新しいまたは改良された細胞ベースのアッセイがもたらされ得る。

【0164】

特に、天然の活性化リガンドが同定されていないGPCRを「脱オーファン化する」必要性が存在する。本発明による結合ドメインを使用して機能的立体構造状態のGPCRを安定化すれば、天然のリガンドが未知である「オーファン」GPCRのリガンドを同定するのに使用し得るスクリーニングアプローチが可能になる。たとえば、既知のリガンドのファミリーに対するアレイスクリーニングを含む、「脱オーファン化」への種々のアプローチが採用されてきた。オーファンGPCRのリガンドは生体試料から同定し得る。したがって、特定の実施形態では、試験化合物は生体試料として提供される。特に、試料は個人から採取される任意の適切な試料であることが可能である。たとえば、試料は、血液、血清、血漿、髄液などの体液試料でもよい。代わりに、試料は組織または細胞抽出物である。

【0165】

上記スクリーニング法のいずれかで使用される試験化合物は、上文で定義される、ポリペプチド、ペプチド、小分子、天然物、ペプチド模倣物、核酸、脂質、リポペプチド、炭水化物、抗体またはそれに由来する任意の断片（Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv（dsFv）およびVLまたはVHドメインのいずれかを含む断片、重鎖抗体（hcAb）、単一ドメイン抗体（sdAb）、ミニボディ、ラクダ科動物重鎖抗体に由来する可変ドメイン（VHHまたはナノボディ）、サメ抗体に由来する新規抗原受容体の可変ドメイン（VNAR）、アルファボディを包含するタンパク質スキュフォールド、プロテインA、プロテインG、設計アンキリンリピートドメイン（DARPin）、フィブロネクチンIII型リピート、アンチカリン、ノッチン、操作されたCH2ドメイン（ナノ抗体）等）を含む群から選択されうる。

【0166】

前記試験化合物は、場合によって、検出可能な標識に共有結合的にまたは非共有結合的に連結してもよい。適切な検出可能標識およびこれを付着させる、使用する、検出するための技法は当業者には明白であり、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能ないかなる組成物も含むが、これらに限定されない。有用な標識には、磁気ビーズ（たとえば、ダイナビーズ）、蛍光色素（たとえば、すべてのAlexa Fluor色素、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質等）、放射性標識（たとえば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³²P）、酵素（たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、およびコロイド金または色ガラスまたはプラスチック（たとえば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等）ビーズ等の比色標識が含まれる。そのような標識を検出する手段は当業者には周知である。したがって、たとえば、放射性標識は写真フィルムまたはシンチレーション計数器を使用して検出することができ、蛍光マーカは放射されたイルミネーションを検出する光検知器を使用して検出し得る。酵素標識は典型的には、酵素に基質を与え酵素の基質に対する作用により生じる反応生成物を検出することにより検出され、比色標識は着色標識を視覚化するだけで検出される。他の適切な検出可能標識は、結合ドメインに関する本発明の第1の態様の文脈内で前に記載された。

10

20

30

40

50

【0167】

具体的に好ましい実施形態に従って、試験化合物は、抗体またはナノボディを含む上記のそれに由来する任意の断片である。たとえば、限定する目的ではなく、試験化合物は、本発明による結合ドメインによって安定化されたGPCR：Gタンパク質複合体に対して産生された抗体（本明細書ではそのもっとも広い意味で定義されている）でもよい。抗体をインビボで産生するための方法は当技術分野において公知である。好ましくは、動物の免疫化は、本明細書において前に記載される類似する方法で行われる。本発明は、細菌、酵母、繊維状ファージ、リボソームもしくはリボソームサブユニットまたは前記GPCR：Gタンパク質複合体上の他のディスプレイシステムで発現される、発現ライブラリーコード免疫グロブリン遺伝子またはこの部分のスクリーニングを含む、立体構造的に安定したGPCR：Gタンパク質複合体に特異的に結合する抗体を選択するための方法にも関する。

10

【0168】

本発明の特定の態様は、本発明に従った結合ドメインが固定化される固体支持体に関する。したがって、そのような固体支持体（上文に記載されている）は、上記のスクリーニング法のうちのいずれにおいても使用し得る。

【0169】

GPCR受容体シグナル伝達を調節する

本発明の結合ドメインを使用して、GPCRシグナル伝達、特にGタンパク質媒介GPCRシグナル伝達を無効にすることを含むGタンパク質媒介GPCRシグナル伝達を調節することもできる。用語「調節する（modulating）」、「調節（modulation）」、「調節された（modulated）」は、タンパク質またはタンパク質複合体、特にGPCR：Gタンパク質複合体の活性の増加または減少を意味する。特に、本発明の結合ドメインはアロステリックモジュレーターまたはアロステリック阻害剤であることが可能である。本発明との関連での用語「アロステリックモジュレーター」または「アロステリック阻害剤」とは非競合的モジュレーターまたは阻害剤のことであり、これらは受容体の活性部位以外の部位に結合することによりその効果を発揮し、受容体の活性を調節するまたは受容体をシグナル伝達の点で無効にする。「ポジティブアロステリックモジュレーター（PAM）」はシグナル伝達を増加させ、「ネガティブアロステリックモジュレーター（NAM）」はシグナル伝達を減少する。特に、アロステリック阻害剤はシグナル伝達を無効にすることもある。本発明の結合ドメインによるGPCRシグナル伝達における調節を評価するためのアッセイは上文に記載されている通りである。

20

30

【0170】

それに関して、特定の実施形態によると、本発明の結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインは、ペプチド模倣物のリード同定および設計にも有用であることが可能である。リード同定のための出発点として生物学的に関連するペプチドまたはタンパク質構造を使用することは、現代的創薬におけるもっとも強力なアプローチの1つを表す。ペプチド模倣物は、その必須要素（ファルマコフォア）が天然のペプチドまたはタンパク質を3D空間で模倣し、生物学的標的と相互作用して同じ生物学的効果を生じる能力を保持する化合物である。ペプチド模倣物は、天然のペプチドに伴う問題のいくつか、たとえば、タンパク質分解に対する安定性（活性の持続）および乏しい生物学的利用能を回避するように設計される。受容体選択性または効力などのある種の他の特性はかなり改善することができることが多い。

40

【0171】

治療的および診断的適用

上記の結合ドメインのうちのいくらかは、治療的有用性を有し得、病状を有する対象に、対象の前記病状を治療するために投与することができる。結合ドメインの治療的有用性は、そのGPCRを介したシグナル伝達が前記病状と連鎖している点で、結合ドメインが結合する標的GPCR：Gタンパク質複合体により決定される。ある種の場合、GPCRはリガンドに結合することによりその病状において活性化され得る。他の実施形態では、

50

GPCRは変異を受けて、たとえば、構成的に活性になることもある。本結合ドメインは、総合失調症、片頭痛、逆流、喘息、気管支痙攣、前立腺肥大、潰瘍、癲癇、狭心症、アレルギー、鼻炎、癌、たとえば、前立腺癌、緑内障および脳卒中などのGPCR媒介病状の治療のために用い得る。On-line Mendelian Inheritance in Man databaseでの追加の例となるGPCR関連状態は、NCBIのワールドワイドウェブサイトに見出される。したがって、本発明の特定の実施形態は、GPCR関連疾患または障害の治療において使用するための本発明の結合ドメインまたは前記結合ドメインを含む医薬組成物も想定している。治療的有用性は、結合ドメインがそれに対して作製されているGPCR：Gタンパク質複合体の特定の立体構造エピトープにも依存することは理解される。

10

【0172】

本結合ドメインは、所定の医薬組成物中で別の原薬と混合してもよいし、残りの原薬の前に、と同時にまたは後で別々に投与してもよい。一般論として、これらのプロトコールは、GPCR関連疾患または障害に罹っている個体に、宿主におけるGPCRのシグナル伝達活性を調節し個体の障害を治療する有効量の結合ドメインを投与することを含む。

【0173】

いくつかの実施形態では、ある種のGPCRの活性の減少が望まれる場合には、GPCRの活性を減少する1つ以上の化合物が投与されてもよく、ある種のGPCRの活性の増加が望まれる場合には、GPCR活動の活性を増加する1つ以上の化合物が投与されてもよい。

20

【0174】

本方法に従って種々の個体が治療可能である。一般に、そのような個体は哺乳動物または哺乳類であり、これらの用語は、肉食動物目（たとえば、イヌおよびネコ）、齧歯目（たとえば、マウス、モルモットおよびラット）および霊長目（たとえば、ヒト、チンパンジーおよびサル）を含む哺乳動物綱内の生物を記述するのに広く使用されている。多くの実施形態では、個体はヒトである。本治療法は典型的には、そのような障害を有する個人またはそのような障害を避けたいと考えている個人に実施される。

【0175】

別の態様では、本発明は、治療的有効量の本発明の結合ドメインおよび少なくとも1つの医薬として許容される担体、アジュバントまたは希釈剤を含む医薬組成物に関する。

30

【0176】

「担体」または「アジュバント」、特に「医薬として許容される担体」または「医薬として許容されるアジュバント」は、それ自体が組成物を受ける個人に有害な抗体の産生を誘導しないし防御を誘発しない任意の適切な賦形剤、希釈剤、担体および／またはアジュバントのことである。したがって、医薬として許容される担体は本質的に無毒性および非治療的であり、当業者には公知である。適切な担体またはアジュバントは典型的には、以下の非網羅的リスト：タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子などの大きなゆっくり代謝される巨大分子に含まれる化合物のうちの1つ以上を含む。担体またはアジュバントは、非限定的例として、リンゲル液、ブドウ糖溶液またはハンス液でもよい。不揮発性油およびオレイン酸エチルなどの非水溶液も使用し得る。好ましい賦形剤は生理食塩水中5%ブドウ糖である。賦形剤は、バッファーおよび保存剤を含む、等張性および化学的安定性を増強する物質などの少量の添加剤を含有してもよい。

40

【0177】

本明細書に記載される結合ドメインまたは医薬として許容されるその塩の投与は、経口、吸入または非経口投与によってもよい。特定の実施形態では、ナノボディは、くも膜下腔内または脳室内投与を通じて送達される。活性化合物は単独で投与してもよいし、または好ましくは医薬組成物として処方される。結合ドメインにより認識される抗原を発現しているある種の疾患または障害を治療するのに有効な量は、治療を受けている障害の性質および重症度ならびに哺乳動物の体重などの通常の要因に依存する。しかし、単位用量は

50

通例、結合ドメインまたはその医薬として許容される塩の0.01から50mg、たとえば、0.01から10mg、または0.05から2mgの範囲になる。単位用量は1日の全用量が通例0.0001から1mg/kg；したがって70kg成人では適切な1日全用量は0.01から50mg、たとえば0.01から10mgまたはさらに通常では0.05から10mgになるように、通例1日に1回または1回よりも多く、たとえば1日に2、3もしくは4回、さらに通常では、1日に1から3回、投与される。化合物またはその医薬として許容される塩が、単位用量経口、非経口または吸入組成物などの単位用量組成物の形態で投与されるのが極めて好ましい。そのような組成物は混合により調製され、経口、吸入または非経口投与のために適切に適合され、したがって、錠剤、カプセル、経口液体調製物、粉末、顆粒、トローチ、再構成可能粉末、注射可能なおよび注入可能な溶液または懸濁液または坐薬またはエアロゾルの形態でもよい。経口投与のための錠剤およびカプセルは通常、単位用量で提示され、結合剤、充填剤、希釈剤、成形剤、潤滑剤、崩壊剤、着色剤、香味料および湿潤剤などの従来の賦形剤を含有する。錠剤は当技術分野で周知の方法に従って被覆されてもよい。使用するのに適した充填剤には、セルロース、マンニトール、ラクトースおよび他の類似の薬剤が含まれる。適切な崩壊剤には、デンプン、ポリビニルピロリドンおよびデンプングリコール酸ナトリウムなどのデンプン誘導体が含まれる。適切な潤滑剤には、たとえば、ステアリン酸マグネシウムが含まれる。適切な医薬として許容される湿潤剤には、ラウリル硫酸ナトリウムが含まれる。これらの固形経口組成物は、調合、充填、成形などの従来の方法により調製し得る。繰り返し調合作業を使用して、活性薬剤を大量の充填剤を用いてこれらの組成物全体に分配してもよい。そのような作業は、当然のことながら、当技術分野では慣習的である。経口液体調製物は、たとえば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳濁液、シロップもしくはエリキシル剤の形態でもよく、または使用前に水もしくは他の適切な溶媒を用いて再構成するための乾燥製品として提示されてもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、たとえば、ソルビトール、シロップ、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲルもしくは水素化食用脂肪、乳濁剤、たとえば、レシチン、ソルビタンモノオレエートまたはアカシア；非水溶媒（食用油を含み得る）、たとえば、アーモンド油、ヤシ油、グリセリン、プロピレングリコールもしくはエチルアルコールのエステルなどの油性エステル；保存剤、たとえば、メチルもしくはプロピルp-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸などの従来の添加剤、および必要に応じて従来の香味剤または着色剤を含有していてもよい。経口製剤には、腸溶コーティングを有する錠剤または顆粒などの従来の徐放製剤も含まれる。好ましくは、吸入のための組成物は、スナッフまたはネブライザー用のエアロゾルもしくは溶液としてまたは吹送のための超微粒粉末として、単独でまたはラクトースなどの不活性担体と組み合わせて気道に投与するために提示される。そのような場合、活性化化合物の粒子は、50ミクロン未満、好ましくは10ミクロン未満、たとえば、2から5ミクロンなどの1から5ミクロンの直径を有するのが適切である。好適吸入用量は、0.05から2mg、たとえば、0.05から0.5mg、0.1から1mgまたは0.5から2mgの範囲になる。非経口投与では、本発明の化合物および無菌溶媒を含有する液体単位剤形が調製される。活性化化合物は、溶媒および濃度に応じて、懸濁させるまたは溶解することが可能である。非経口溶液は通例、化合物を溶媒に溶解させ濾過殺菌してから、適切なバイアルまたはアンプルに充填して密封することにより調製される。有利なことに、局所麻酔薬、保存剤および緩衝剤などのアジュバントも溶媒に溶解させる。安定性を増強するために、組成物は、バイアルに充填し真空下で水を除去した後に凍結させることが可能である。非経口懸濁液は、溶解させる代わりに化合物を溶媒に懸濁させ、無菌溶媒に懸濁させる前にエチレンオキシドに曝露して殺菌すること以外は、実質的に同じ方法で調製される。有利なことに、界面活性剤または湿潤剤が組成物に含まれて、活性化化合物の均一分布を促進する。必要に応じて、少量の気管支拡張剤、たとえば、イソプレナリン、イソエタリン、サルブタモール、フェニレフリンおよびエフェドリンなどの交感神経刺激アミン；テオフィリンおよびアミノフィリンなどのキサンチン誘導体ならびにプレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイドならびに

10

20

30

40

50

ACTHなどの副腎刺激剤を含んでいてもよい。一般的方法であるように、組成物は通常、関連する医学的処置において使用するための文書または印刷された説明書を伴う。

【0178】

結合ドメイン、特に免疫グロブリン単一可変ドメインの細胞内への送達は、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質について記載された通りに実施してもよい。抗原が細胞外であるまたは細胞外ドメインである場合、結合ドメインは、細胞内に送達する必要なしで、このドメインに結合することによりその機能を発揮し得る。本明細書に記載される本発明の結合ドメインは、対象のGPCR：Gタンパク質の細胞内立体構造エピトープを標的にしてもよい。これらの結合ドメインを細胞内部で効果的で安全な治療薬として使用するために、細胞内送達は当技術分野で公知のタンパク質形質導入または送達システムにより増強し得る。タンパク質形質導入ドメイン（PTD）は、生体膜を通過して移動するその能力のために薬物送達分野ではかなりの関心を集めてきた。PTDはこのはっきりした移動活性を、それがコンジュゲートしている、複合体化しているまたは融合しているタンパク質および他の巨大分子カーゴに与える比較的短い（11-35アミノ酸）配列である（SawantおよびTorchilin、2010年）。たとえば、HIV由来TATペプチド（YGRKKRRQRRR）は、小分子からタンパク質、ペプチド、医薬ナノ担体および造影剤の範囲までに及ぶ様々な薬剤の細胞内送達に広く使用されてきた。代わりに、受容体媒介エンドサイトーシス機構も細胞内薬物送達に使用することも可能である。たとえば、トランスフェリン受容体媒介内部移行経路は、薬物およびタンパク質の部位特異的送達のために開発されてきた効率的細胞取り込み経路である（Qianら 2002年）。これは、化学的にはトランスフェリンと治療薬もしくはタンパク質とのコンジュゲーションにより、または一般的には治療ペプチドもしくはタンパク質のトランスフェリンの構造内への注入により達成される。天然に存在するタンパク質（たとえば、鉄結合タンパク質トランスフェリン）は、これらのタンパク質が生分解性、無毒性および非免疫原性であるので薬物ターゲティングのこの分野では非常に有用である。さらに、前記タンパク質は、その受容体が細胞表面に大量に存在するために部位特異的ターゲティングを達成することが可能である。さらに他の送達システムには、限定するという目的なしに、ポリマーベースのおよびリポソームベースの送達システムが含まれる。

【0179】

本発明の結合ドメインのおよびそれを含む組成物の効力は、関係する特定の疾患または障害に応じて、任意の適切なインビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、インビボアッセイおよび／もしくはそれ自体公知の動物モデルまたはそれらの任意の組合せを使用して試験することが可能である。

【0180】

結合ドメインのスクリーニング、選択、産生

さらに別の態様では、本発明は、GPCRとGタンパク質を含む複合体に対して作製されたおよび／または特異的に結合する結合ドメインについてのスクリーニングの方法であって、

- a) 複数の結合ドメインを用意する段階、ならびに
 - b) GPCRおよびGタンパク質を含む複合体に結合する結合ドメインについて前記複数の結合ドメインをスクリーニングする段階、ならびに
 - c) 前記複合体に結合する結合ドメインを単離する段階
- を含む方法も包含している。

【0181】

本発明のこの態様の好ましい実施形態では、結合ドメインが産生され、GPCRとGタンパク質および場合によって受容体リガンドを含む複合体へのその特異的結合についてスクリーニングされる。結合ドメインは産生されて、Gタンパク質へのその特異的結合についてスクリーニングされてもよい。本明細書に記載されるように、結合ドメインは多くの方法で産生することが可能である。ナノボディなどの免疫グロブリン単一可変ドメインの場合には、典型的には、動物の免疫化は、上文に記載されているように（たとえば、非限

定的例としてV_HH配列について）およびさらに本明細書で例示されるように、Gタンパク質に結合しているGPCRおよび受容体リガンドを含む標的複合体を用いて実行されることになる。

【0182】

標的複合体を用いた動物の免疫化では、標的複合体のタンパク質（すなわち、GPCRおよびGタンパク質）は、組換え型の前記タンパク質を宿主細胞において発現し、前記タンパク質を親和性クロマトグラフィーおよび／または抗体ベースの方法を使用して精製することをい得る従来法を使用して産生し精製し得る。特定の実施形態では、バキュロウイルス／Sf-9系を発現のためにい得るが、他の発現系（たとえば、細菌、酵母または哺乳類細胞系）も使用し得る。GPCRを発現し精製するための例となる方法は、数ある中でも、たとえば、Kobilka（1995年）、Erogluら（2002年）、Chelikaniら（2006年）および書籍「Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors」（Kevin R. Lynch（編）、1998年）に記載されている。機能的GPCR：Gタンパク質複合体は、β2-AR：GsについてWhortonら（2009年）にまたはMOR：GiについてKuszakら（2009年）に記載されているように、化学量論的に過剰なGタンパク質（GsまたはGi）を用いて組換えHDL粒子に再構成された精製された受容体（たとえば、β2-ARまたはMOR）を使用することにより再構成してもよい。GPCRは、リン脂質ベシクル中で化学量論的に過剰なGタンパク質を負荷させて再構成してもよい。同様に、リン脂質ベシクル中で活性GPCRを再構成するための方法は公知であり、とりわけ、Lucara（2003年）、Mansoorら（2006年）、Niuら（2005年）、Shimadaら（2002年）およびErogluら（2003年）に記載されている。ある種の場合には、GPCRとリポ脂質は高密度で再構成されることがある（たとえば、1mgのリン脂質あたり1mgの受容体）。多くの場合、GPCRはリポ脂質ベシクル内に両方の配向で存在することがある（正常な配向で、および細胞内ループがベシクルの外側にある「逆さまの」配向で）。GPCRを用いた他の免疫化法には、制限なく、GPCRおよび／もしくはGタンパク質を発現する完全な細胞またはそれに由来する膜の使用が含まれる。

【0183】

特定の実施形態では、動物は二機能性クロスリンカーで架橋されている標的複合体を用いて免疫される（実施例のセクションも参照）。化学的架橋結合は、当業者には周知である標準技法を使用して実行することが可能である（たとえば、Hermanson、G. T.（2008年）Bioconjugate Techniques、2nd ed.、Elsevier Inc.、1202頁参照）。

【0184】

任意の適切な動物、たとえば、温血動物、特にウサギ、マウス、ラット、ラクダ、ヒツジ、ウシもしくはブタなどの哺乳動物、またはニワトリもしくはシチメンチョウなどのトリは、免疫応答を生じるのに適した当技術分野で周知の技法のいずれかを使用して免疫し得る。

【0185】

標的複合体の立体構造エピトープに特異的に結合する結合ドメインについてのスクリーニングは、たとえば、その表面上で結合ドメインを発現する細胞（たとえば、適切に免疫されたラクダ科動物から得られるB細胞）のセット、コレクションもしくはライブラリーをスクリーニングすることにより、結合ドメインの（ナイーブまたは免疫）ライブラリーのスクリーニングにより、または結合ドメインのアミノ酸配列をコードする核酸配列の（ナイーブまたは免疫）ライブラリーのスクリーニングにより実施してもよく、これらのスクリーニングはすべてそれ自体公知の方法で実施することができ、その方法は場合によって、たとえばおよび制限なく、親和性成熟の段階、所望のアミノ酸配列を発現する段階、所望の抗原への結合および／もしくは所望の抗原に対する活性についてスクリーニングする段階、所望のアミノ酸配列もしくはヌクレオチド配列を決定する段階、1つ以上のヒト

化置換を導入する段階、適切な多価および／もしくは多重特異性フォーマットでフォーマットする段階、所望の生物学および／もしくは生理的特性についてスクリーニングする段階（すなわち、当技術分野で公知の適切なアッセイを使用して）、ならびに／またはそのような段階のうちの1つ以上の、任意の適切な順番での任意の組合せなどの1つ以上の他の適切な段階をさらに含んでもよい。

【0186】

本発明のさらに別の態様は、本発明に従った結合ドメインを含むキットに関する。キットは、バッファー、分子タグ、ベクター構築物、基準試料物質等の試薬の組合せならびに適切な固体支持体、細胞、核酸等をさらに含み得る。そのようなキットは、本明細書に記載される本発明の適用のいずれにおいても有用であり得る。たとえば、前記キットは、化合物スクリーニング適用に有用な試験化合物（のライブラリー）を含んでもよい。

10

【0187】

最後に、本発明の最後の態様は、GPCR：Gタンパク質複合体の立体構造エピトープへの特異的結合に関与するアミノ酸配列を単離し、前記アミノ酸配列に基づいて人為的な結合ドメインを構築するための本発明による任意の結合ドメインの使用である。本発明による結合ドメインにおいて、フレームワーク領域および相補性決定領域は公知であり、GPCR：Gタンパク質複合体の同じ立体構造エピトープに結合する、結合ドメインの誘導体の研究により、前記立体構造エピトープへの結合に関与する不可欠なアミノ酸を推定することが可能であることが認識される。この知識を使用して最小結合ドメインを構築し、この誘導体を作製することができ、これは当業者に公知の技法により日常的に行うことが可能である。

20

【0188】

以下の実施例は本発明のさらなる理解を促進することが意図されている。本発明は説明される実施形態を参照して本明細書に記載されているが、本発明は本文書に限定されないことは理解されるべきである。当業者および本明細書の教示を利用することができる者は、その範囲内で追加の修正および実施形態を認識する。したがって、本発明は本明細書に添付される特許請求の範囲のみに限定される。

【実施例】

【0189】

〔実施例1〕：安定なアゴニスト- β_2 AR-Gs三元複合体の形成および精製

30

安定な複合体の形成（図2を参照）は、2mlバッファー（10mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、0.1%のDDM、1mMのEDTA、3mMのMgCl₂、10 μ MのBl-167107）中でGsヘテロ三量体をおよそ100 μ Mの濃度で、モル過剰（およそ130 μ M）のBl-167107結合T4L- β_2 AR（または β_2 AR-365）と混合し、室温で3時間インキュベートすることにより実現された。Bl-167107は、およそ50の異なる β_2 ARアゴニストをスクリーニングし特徴付けることから同定されたが、およそ30時間の解離半減期を有しており、イソプロテレノールなどの他の完全アゴニストよりも高度な安定性を活性Gタンパク質結合受容体を与える（Rasmussenら、2011年）。複合体の高親和性無ヌクレオチド状態を維持するため、アピラーゼ（25mU/ml、NEB）は90分後に添加されて、受容体に結合するとG α sから放出される残留GDPを加水分解した。アピラーゼによるGDPの加水分解から生じるGMPは複合体中のGタンパク質に対し非常に乏しい親和性を有する。GDPの再結合はR：G複合体の解離を引き起こすことができる（図3a）。

40

【0190】

DDM中のR：G複合体は、4℃で48時間後、著しい解離を示す（図4a）。50を超える両親媒性物質をスクリーニングし特徴付け（データは示されていない）、複合体を実質的に安定化する界面活性剤としてMNG-3（NG-310、Affymetrix-Anatrace；Chaeら、2011年）およびそれに密接に関連するアナログを同定した（図4a、b）。複合体は、R：G混合物（2ml）を1%のMNG-3を含有する8mlのバッファー（20mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、

50

10 μM のB1-167107)に室温で1時間添加することによりMNG-3に交換された。

【0191】

この段階では、前記混合物は、R:G複合体、非機能的Gsおよび過剰な $\beta_2\text{AR}$ を含有している。機能的R:G複合体を非機能的Gsから分離するため、および界面活性剤交換を完了するため、R:G複合体はM1フラッグ樹脂上に固定化され、0.2%のMNG-3を含有するバッファー(20mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、10 μM のB1-167107および3mMの CaCl_2)中で洗浄された。R:G複合体のシステイン架橋媒介凝集を防ぐために、50kDaのMWCO Millipore濃縮器を用いて濃縮することに先立って、100 μM のTCEPが溶出タンパク質に添加された。過剰な遊離の受容体をR:G複合体から分離するための最終のサイズ排除クロマトグラフィー手順(図5b)は、0.02%のMNG-3、10mMのHEPES pH7.5、100mMのNaCl、10 μM のB1-167107および100 μM のTCEPを含有するバッファーで平衡化されたSuperdex 200 10/300GLカラム(GE Healthcare)上で実施された。ピーク画分はプールされ(図5b)、100kDaのMWCO Viva-spin濃縮器を用いておよそ90mg ml^{-1} まで濃縮され、SDS-PAGE/クーマシーブリーリアントブルー染色(図5a)およびゲル濾過(図5c)により解析された。純粋で均質で脱リン酸化された調製物を確認するため、R:G複合体はイオン交換クロマトグラフィーにより日常的に解析された(図5d)。

【0192】

[実施例2]:アゴニスト: $\beta_2\text{AR}$:Gs三元複合体に結合しているナノボディの作製
ネガティブ染色EM撮像(データは示されていない)から、Gasのアルファヘリックスドメインが柔軟であるであることが観察された。このドメインの標的安定化は、アゴニスト: $\beta_2\text{AR}$:Gs三元複合体に結合するナノボディを作製することにより行われた。ナノボディは単ドメイン抗体であり、ラマ由来の重鎖のみ抗体由来である(Muyldermans、2001年)。(アゴニスト負荷)受容体共役Gsタンパク質に結合するナノボディを同定するために、2頭のラマ(ラマ・グラマ(Llama glama))をビス(スルホスクシンイミジル)グルタン酸(BS2G、Pierce)架橋 $\beta_2\text{AR}$:Gs:B1-167107三元複合体を用いて免疫した。両方の動物とも50から100 μg の隔週で4回の注射で免疫された。免疫化終了後、末梢血リンパ球は免疫化動物から単離され全RNAを抽出してcDNAを調製した。全RNAは、ChomczynskiおよびSacchi(1987年)により記載された通りに約107のリンパ球から単離された。第一鎖cDNA合成が、製造業者(Invitrogen)の使用説明書に従ってdN6プライマーおよびスーパースクリプトRTを使用して調製された。VHH遺伝子をコードする断片は、以前記載された通りに(Conradら、2001年)特異的プライマーを使用してPCRによりこのcDNAから増幅された。ネステッドPCRを使用して、Pst1およびBstEIIはそれぞれVHHオープンリーディングフレームの出発点および終点で操作された。VHHはPst1-BstEII断片としてファージディスプレイベクターpMESy4にクローニングされた。ラマごとに、遺伝子III融合物としてそれぞれナノボディレパートリーを抱える別々のファージディスプレイライブラリーが構築された(Domanskaら 2011年)。R:G複合体特異的ナノボディは、i) ApoLビオチン化高密度リポタンパク質粒子に包埋された $\beta_2\text{AR}$:Gs:B1-167107三元複合体上での(rHDL、Whortonら 2007年)、またはii) BS2G架橋 $\beta_2\text{AR}$:Gs:B1-167107三元複合体上での2ラウンドのバイオパニングにより濃縮された。第一のバイオパニング戦略では、 $\beta_2\text{AR}$:Gs:B1-167107三元複合体を含有するビオチン化rHDL粒子は、20mMのHEPES (pH8.0)、100mMのNaCl、1mMのEDTA、100 μM のTCEPおよび100nMのB1-167107中1 μg /ウェルでニュートラアビジン被覆Maxisorpプレート(Nunc)上に固定化された。第二のバイオパニング戦略では

、BS2G架橋β2AR:Gs:Bl-167107三元複合体は、1 μg/ウェルでMaxisorbプレート上に固相被覆された。バイオパニングのラウンドごとに、10¹ファージは固定化された抗原に添加され、1から2時間インキュベートされた。次に、非結合ファージは抗原含有ウェルから取り除かれ、ウェルは20mMのHEPES、100mMのNaCl、pH8で14回洗浄され、最後に200 μLの20mM HEPES (pH8.0)、100mMのNaCl、1mMのEDTA、100 μMのTCEPおよび100nMのBl-167107と一緒に10分間インキュベートされ、非特定ファージを取り除いた。複雑な特定のファージを溶出するため、ウェルはトリプシンで処理され、ファージは回収され、これを使用して指数関数的に増殖するTG1細胞(OD600±0.5)に感染させた。それぞれの濃縮されたライブラリーから、48のコロニーが無作為に選ばれ、アンピシリンおよびグルコースを含有する1mlの2×TYにおいて増殖された。培養物はIPTGで誘導されてナノボディの発現を誘導し、部分的に精製されたナノボディを含有する周辺質抽出物が調製された。これらの周辺質抽出物に含有されるナノボディは、アゴニスト:β2AR:Gs三元複合体への結合についてELISAにより解析された。

10

【0193】

β2AR:Gs:Bl-167107三元複合体を含有するビオチン化rHDL粒子上で濃縮されたナノボディは、空のrHDL粒子と対比したニュートラアビジン被覆Maxisorbプレート上に固定化された同じ複合体での比較ELISAにより解析された。固相被覆BS2G架橋β2AR:Gs:Bl-167107三元複合体上で濃縮されたナノボディは、非被覆ウェルと対比した同じ固相被覆複合体での比較ELISAにより解析された。比較ELISAにおいてプラスのスコアを出したコロニーから、単一コロニーが調製され、DNAが抽出され、コードされたナノボディ遺伝子の配列が日常的方法を使用して解析された(表2-3に示されているアミノ酸配列)。Nb35、Nb36およびNb37では、β2AR:Gs:Bl-167107三元複合体への結合は、分析的ゲル濾過によりさらに確かめられた(図3d、3e、3f、3g)。

20

【0194】

[実施例3]:Nb35、Nb36およびNb37はGsに結合し、GTPγSによる複合体の解離を防ぐ

β2AR:Gs:Bl-167107三元複合体に対して産生されたナノボディ(表2)が受容体にまたはGsに結合するかどうかを判定するため、次に精製された受容体単独上でのELISAにおけるこれらナノボディの結合がモニターされた。表2のナノボディすべてが、高密度でリン脂質ベシクル内に再構成された固相被覆(Maxisorb、Nunc)アゴニスト結合β2AR-356においてマイナスのスコアを出した(Rasmussenら、2011年)。Nb80、β2AR特異的ナノボディ(Rasmussenら、2011年)はこのELISAにおいてプラスのスコアを出した。表2に記載されるβ2AR:Gs:Bl-167107結合剤はどれも再構成受容体単独には結合せず、これらの結合剤はGs上のエピトープに結合することを示している。サイズ排除クロマトグラフィーによれば、Nb35およびNb37はGsヘテロ三量体上の別々のエピトープに結合してR:G:Nb35:Nb37複合体を形成することが示される(図3d)。同様に、Nb36およびNb37はGsヘテロ三量体上の別々のエピトープに結合してR:G:Nb36:Nb37複合体を形成する(図3e)。

30

40

【0195】

GDP、GTPおよび非加水分解性GTPアナログはβ2AR:Gs複合体を破壊し(図3a)、GPCR:Gタンパク質複合体をインビトロでもインビボでも解離させる。アゴニスト:β2AR:Gs三元複合体の完全性に対するNbおよび非加水分解性GTPアナログであるGTPγSの相互効果は、GTPγSの存在下および非存在下で分析的サイズ排除クロマトグラフィーにより解析された。ナノボディの35、36および37はβ2AR:Gs:Bl-167107複合体をGTPγSによる解離から保護することが見出された(図3d、3eおよび3g)。

50

【0196】

【実施例4】： β_2 AR-Gs複合体のナノボディ支援結晶化

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は、ホルモンおよび神経伝達物質ならびに視覚、嗅覚および味覚の感覚に対する大多数の細胞応答の原因となる。GPCRシグナル伝達のパラダイムは、アゴニストが占める受容体によるヘテロ三量体GTP結合タンパク質（Gタンパク質）の活性化である。GPCRシグナル伝達の構造的基礎を理解する目的で、我々は、X線結晶学によりその構造を解明するために β_2 AR：Gs複合体を結晶化した。

【0197】

結晶生成のための1つの難問は、界面活性剤溶液中で安定な β_2 AR：Gs複合体を調製することであった。 β_2 ARとGsは脂質二重層中では効率的に共役するが、これらのタンパク質を可溶化し精製するのに使用される界面活性剤中では結合しない（実施例1）。相対的に安定な β_2 AR：Gs複合体は、ドデシルマルトシド溶液中で精製されたGDP-Gs（およそ100 μ Mの最終濃度）を高親和性アゴニスト（B1-167107；Rasmussenら 2011年）に結合しているモル過剰な精製された β_2 ARと混合することにより調製することができると見出されていた。非選択性プリンピロホスファターゼであるアピラーゼが添加されて、 β_2 ARとの複合体を形成するとGsから放出されたGDPを加水分解した。それに続いて、複合体は連続的抗体親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製された。複合体の安定性はドデシルマルトシドを最近開発されたマルトースネオペンチルグリコール界面活性剤（NG-310、Anatrace）に交換することにより増強された（Chaeら 2010年）。この複合体は目立った分解もなく室温で24時間インキュベートすることができたが、界面活性剤ミセル、バイセルおよび脂質立方相（LCP）中でのスパースマトリックススクリーンを使用して複合体を結晶化する最初の試みは失敗した。

【0198】

複合体の性質をさらに評価するために、タンパク質は単粒子電子顕微鏡（EM）により解析された。その結果により、複合体が単分散であることが確かめられた（データは示されていない）が、上質の結晶の回折を得ることに対する他の考えられる障壁が明らかにされた。第一に、複合体を安定化するのに使用される界面活性剤が大きなミセルを形成し、結晶格子接触の形成のための β_2 AR：Gs複合体の細胞外側にほとんど極性表面を残さない。したがって、 β_2 ARの構造不定のアミノ末端をT4リゾチーム（T4L）で置き換えた。我々は以前T4Lを使用して、膜貫通セグメント（TM）5と6の細胞質末端の間にT4Lを挿入することにより不活性 β_2 ARの結晶生成を促進していた（Rosenbaumら 2007年）。この融合タンパク質（T4L- β_2 AR）は正常なリガンド結合およびGs共役特性を示した。結晶化の試みは、T4L- β_2 AR：Gs複合体の大きな親水性成分を収容するように設計された改変されたモノレイン（monolein）（7.7MAG、Martin Caffreyにより提供された）を使用してLCPにおいて実施された（Mistuttaら 2004）。我々は、7 Åまで回折する小さな結晶を得ることができたが、添加物および他の改変物の使用を通じてその品質を改良することはできなかった。

【0199】

単粒子EM解析により明らかにされた結晶生成についての別の考えられる問題は、Gasサブユニットの α ヘリックス成分の位置決めの変わりやすさが増大することであった。Gasは2つのドメイン、すなわち、 β_2 ARおよびG β サブユニットと相互作用をするras様GTPアーゼドメイン（GasRas）ならびに α ヘリックスドメイン（GasAH）からなる（Sprangら 1997年）。2つのGasサブドメインの界面はヌクレオチド結合ポケットを形成し（図1）、EM 2Dアベレージおよび3D再構成から、グアニンヌクレオチドの非存在下では、GasAHはT4L- β_2 AR-GasRas-G β の複合体と比べて変わりやすい位置を有することが示唆される（図1b）。

【0200】

複合体の結晶生成をさらに促進する目的で、我々は複合体とナノボディ35の共結晶化

を試みた。Nb35は複合体をGTPγSによる解離から保護し、安定化に寄与するGs：Nb相互作用が示唆される（図3a）。Bl-167107結合T4L-β2AR：Gs複合体とNb35は1対1.2のモル比で混合された（図6および7を参照）。わずかにモル過剰なNb35は分析的ゲル濾過により確認された（図7b）。混合物は、以前報告された2シリンジ混合法（Caffrey 2009年）を使用して、1対1のタンパク質対脂質比（w/w）で10%のコレステロール（C8667、Sigma）を含有する7.7MAG（Martin Caffreyにより提供された）と混合するのに先立って、室温で1時間インキュベートされた。7.7MAG中のR：G：Nb複合体の濃度はおよそ25mg/mlであった。タンパク質：脂質混合物は、LCP分配ロボット（Gryphon、Art Robbins Instruments）を通して40nl液滴で24ウェルまたは96ウェルガラスサンドイッチプレートのどちらかに送達され、ひとまとめにして0.8μlの沈殿溶液で表面を覆われた。複数の結晶化リードは最初、Stock Options Saltキット（Hampton Research）由来の試薬を部分的にベースにした自社製スクリーンを使用して同定された。データ収集のための結晶は、18から22%のPEG400、100mMのMES pH6.5（図1c）、350から450mMの硝酸カリウム、10mMのホスカルネット（図3b）、1mMのTCCEPおよび10μMのBl-167107中で成長させた。結晶は20℃で3-4日以内にフルサイズに達し（図8）、スポンジ様中間相から選び取られ、液体窒素内での追加の凍結保護物質なしで瞬間冷凍された。

【0201】

【実施例5】：Nb35はR：G複合体の結晶形成を促進する

Bl-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複合体は、空間群p2₁において結晶化し、単一複合体はそれぞれの非対称性単位であった。図9aは、結晶学的パッキング相互作用を示している。図9bは、T4LおよびNb35を含む完全複合体の構造を示しており、図9cはβ₂AR：Gs複合体のみを示している。

【0202】

Bl-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複合体は、交互になった水層と脂質層中で整列され、格子接触はほぼ複合体の可溶性成分間のみで形成され、受容体分子はGタンパク質層間に浮遊し、膜の水平面で互いに広く分離したままであった。広範な格子接触がすべての可溶性タンパク質間で形成されており、おそらくGタンパク質につ

【0203】

Nb35およびT4LはBl-167107結合T4L-β2AR：Gs：Nb35複合体の結晶形成を促進した。Nb35はGs上の立体構造エピトープに結合し、GβとGαサブユニットの界面で詰め込まれ、相補性決定領域（CDR、IMTG付番法に従って定義される；Lefranc、2003年）1は主にGβと相互作用し（図10a）、長CDR3ループはGβとGαサブユニットの両方と相互作用する（図10b）。Nb35の一部のフレームワーク領域も同じ複合体由来のGαと相互作用する（図10c）。1つの複合体由来の他のフレームワーク領域は2つの隣接する複合体由来のGαサブユニットと相互作用して（図11）、結晶格子内の結晶接触にかなり寄与している。T4Lは受容体のアミノ末端との比較的希薄な相互作用を形成するが、1つの複合体のGβサブユニットのアミノ末端、別の複合体のGγサブユニットのカルボキシル末端およびさらに別の複合体のGαサブユニットに対して詰め込まれる。

【0204】

【実施例6】：活性状態β₂ARの構造

β₂AR：Gs構造は、GPCRによる細胞膜を横切るシグナル伝達の機構および三元複合体の機能特性の構造的基礎についての最初の高分解能の洞察を与える。図12aはβ₂AR：Gs複合体におけるアゴニスト結合受容体の構造と不活性カラゾロール結合β₂ARを比較する。不活性と活性構造間の最大の違いは、E268のCα炭素で測定した場合、TM6の14Å外側への移動である。TM5ヘリックスの細胞質末端は、7残基分も

っと小さく外側へ移動し伸長している。第三の細胞内ループ（ICL3）における26アミノ酸のストレッチは乱れている。不活性と活性構造間の別の顕著な違いは、第二の細胞内ループ（ICL2）であり、このループは不活性 β_2 AR構造では伸長したループを、 β_2 AR:Gs複合体では α ヘリックスを形成している。このヘリックスは β_2 AR-Nb80構造においても観察される（図12b）が、高度に類似するトリ β_2 ARの不活性構造においても観察される（Warneら、2008年）ために活性状態に特有の特徴ではない可能性がある。

【0205】

β_2 ARについての電子密度地図の質はこの β_2 AR-GasRas界面でもっとも高く、おそらく細胞外表面との結晶格子接触の欠如のせいで細胞外半分ではずっと弱い（図9a）。その結果、我々は自信を持ってリガンド結合ポケットにおける高親和性アゴニスト（B1-167107）のモデルを作ることができない。しかし、T4L- β_2 AR:Gs複合体における β_2 ARの全構造は、Gタンパク質模倣ナノボディ（Nb80）により安定化される β_2 ARの我々の最近の活性状態構造に極めて類似している。これらの構造は、おそらく β_2 AR-Nb80構造においてICL3に取って代わるT4Lの存在のせいで、主にTM5および6の細胞質末端で逸脱している（図12b）。にもかかわらず、 β_2 AR-Nb80複合体は、アゴニストのイソプロテレノールに対する β_2 AR:Gs複合体（Rasmussenら 2011年）と同じ高親和性を示しており、リガンド結合ポケット周辺の高い構造的類似性と一致している。 β_2 AR-Nb80結晶についての電子密度地図は、リガンド結合ポケット周辺およびリガンド結合ポケットとGs共役界面間のアミノ酸の立体構造再配置についてさらに信頼性の高い見方を提供する（Rasmussenら 2011年）。

【0206】

図12cは、 β_2 AR-Nb80複合体と比べた場合の、 β_2 AR:Gs複合体中のD/ERYおよびNPxxYを含む高度に保存された配列モチーフの位置を示している（図13も参照）。これらの保存された配列は、受容体を活性化するまたは不活性状態に維持するために重要であると提唱されてきた（Hofmannら、2009年）。これらのアミノ酸の位置は、これら2つの構造では基本的に同じであり、Nb80が極めて良好なGタンパク質代理であることを示している。これら2つの構造間では、Arg131のみが異なる。 β_2 AR-Nb80構造では、Arg131はNb80と相互作用をし、 β_2 AR:Gs構造ではArg131はGasのTyr391に対して詰め込まれる（図13）。

【0207】

β_2 ARの活性状態は（GasRas）との広範な相互作用により安定化される（図14）。G β またはG γ サブユニットとの直接の相互作用はない。 β_2 AR-GasRas界面の全埋没表面は2576 Å²（GasRasでは1300 Å²および β_2 ARでは1276 Å²）である。この界面は β_2 ARのICL2、TM5およびTM6により、およびGasRasの α 5ヘリックス、 α N- β 1接合部、 β 3鎖の先端および α 4ヘリックスにより形成されている（特定の相互作用については表6を参照）。この相互作用に関与している β_2 AR配列はGタンパク質共役である役割を果たしていることが明らかにされたが、これらのセグメントを他のGPCRと整列させた場合、Gs共役特異性に対するはっきりした共通配列は存在しない。 β_2 ARがGiにも共役することおよび多くのGPCRが1つよりも多いGタンパク質アイソフォームに共役することを考慮すると、おそらくこれは驚くに当たらない。したがって、Gタンパク質共役特異性の構造的基礎は、二次および三次構造のもっともらえがたい特徴を伴わなければならない。にもかかわらず、注目すべき相互作用はPhe139を伴い、これはICL2ヘリックスの開始部に位置しており、 β 1鎖の開始部のGas His41、 β 3鎖の出発点のVal213ならびに α 5ヘリックスのPhe376、Arg380およびIle383により形成される疎水性ポケットに位置している（図14c）。 β_2 AR変異体F139AはGsへの共役の激しい低下を示している（Morroら、1993年）。Phe139に対応する残基は、ほぼす

すべてのGs共役受容体上のPheまたはLeuであるが、他のGタンパク質に共役することが分かっているGPCRでは可変性が高い。興味深いことに、ICL2ヘリックスは、保存されたDRY配列のAsp130とICL2ヘリックスの中間のTyr141間の相互作用により安定化される(図14c)。Tyr141は、インスリン受容体チロシナーゼに対する基質であることが明らかにされている(Baltenspergerら、1996年)が、このリン酸化の機能的意義は現在分かっていない。

【0208】

[実施例7]：活性化されたGsの構造

β_2 AR:Gs複合体におけるもっとも驚くべき所見はGasRasと対比したGasAHの大きな転置である(ドメイン間の接合部回りのおよそ 180° の回転)(図15a)。Gasの結晶構造では、ヌクレオチド結合ポケットは、GasRasとGasAH間の界面により形成される。グアニンヌクレオチド結合は、これら2つのドメイン間の相互作用を安定化する。グアニンヌクレオチド結合のこの安定化効果の消失は、界面活性剤可溶化された複合体の単粒子EM解析においてGasAHについて観察される高い柔軟性と一致している(データは示されていない)。この安定化効果の消失は、複合体が形成されるとこれら2つのドメイン間の界面での重水素交換の増加とも一致している(データは示されていない)。最近、Hamm、Hubbellおよび同僚らは、電子電子二重共鳴(DEER)分光法を使用して、光活性化ロドプシンと複合体を形成するとGiのRasおよび(?)ヘリックスドメインに位置する窒素酸化物プローブ間に距離の大きな(最大 $20\text{ \AA}$)変化が生じることを記述した(Van Eps 2011年)。したがって、GasAHがGasRasに対比して転置していることは驚きに当たらないが、この結晶構造中のその位置は、生理的立体構造よりはむしろ結晶充填相互作用の影響をおそらく反映している。

【0209】

β_2 ARとヌクレオチド結合ポケット間の立体構造連結は、Gasのアミノおよびカルボキシル末端ヘリックスを主に含む(図14)。図15bは、Gs- β_2 AR複合体由来のGasRASの構造をGas-GTPγS複合体由来のGasRASの構造と比較した場合、最大の立体構造変化を受けるGasRASの領域に焦点を合わせている(Sunaharaら 1997年)。最大の違いはα5ヘリックスについて観察され、このヘリックスは受容体方向に $6\text{ \AA}$ 転置され、カルボキシル末端が β_2 ARの膜貫通コア内に突き出ているので回転している。この移動と関連して、β6-α5ループは、Gas-GTPγS構造内でグアニン環と相互作用しているが、ヌクレオチド結合ポケットから離れて外側に転置されている(図15b-d)。α5ヘリックスの移動は、このヘリックスとβ6シート、αN-β1ループおよびα1ヘリックス間の相互作用の変化にも関連している。β1鎖は、 β_2 ARとヌクレオチド結合ポケット間に別の連結を形成する。この鎖のC末端はGly47周囲の立体構造を変化させ、γリン酸をGTP結合型に配位させるβ1-α1ループ(Pループ)においてさらに変化している(図15b-d)。結晶構造における所見は重水素交換実験と一致しており、この実験では、無ヌクレオチド β_2 AR:Gs複合体が形成されると、β1シートおよびα5ヘリックスのアミノ末端における重水素交換が增強される(データは示されていない)。

【0210】

Gsヘテロ三量体の構造は決定されていないので、 β_2 AR:Gs複合体の形成前と後でGas-Gβγ界面を直接比較することはできない。GDP結合Giヘテロ三量体の構造に基づいて(Wallら 1995年)、我々は β_2 ARと複合体を形成するとGasRASとGβγ間の相互作用に大きな変化を観察していない。これは重水素交換研究とも一致している(データは示されていない)。Nb35がGasRasとGβ間の界面で結合することは注目すべきである(図2b)。したがって、我々は、Nb35が結晶構造内のGasRas-Gβγ界面の相対的配向に影響を与え得る可能性を排除することはできない。しかし、単粒子EM研究により、Nb35がGasAHとGasRas間の相互作用を破壊しない証拠が提供される(データは示されていない)。

【0211】

〔実施例8〕：Nb35およびNb37はGs上の異なるエピトープに結合しヌクレオチド結合を阻害する

Gsのみへのナノボディ（Nb35およびNb37）の効果を調べるため、最終容積200μLで20mMのTris-HCl、pH8.0、3mMのMgCl₂、1mMのDTTにおいて、ナノボディはボディパイ-GRPγS-FLおよび種々のGsタンパク質調製物と一緒に添加された。ヘテロ三量体Gsタンパク質を含有する試料は0.1%DDMも含んでいた。ボディパイ-GRPγS-FLは、安定な蛍光性GRPアナログである（λ_{ex} 470nm、λ_{em} 515nm）。その蛍光強度はGsタンパク質が結合すると増加し、したがってボディパイ-GRPγS-FLは、Gsタンパク質へのヌクレオチド結合のリアルタイム測定に使用することが可能である（McEwenら 2001年）。蛍光はM5蛍光プレートリーダー（Molecular Precision）上96ウェルマイクロタイタープレートフォーマットにおいて測定された。

10

【0212】

最初の実験では（図16）、漸増する量のNb37は1μMの精製Gαsおよび100nMのボディパイ-GRPγS-FLと一緒にインキュベートされ、蛍光増加は加水分解生成物であるボディパイリン酸の蓄積を最小限に抑えるために短時間スケール（300秒）で測定された（Jamesonら 2005年）。ヘテロ三量体Gsタンパク質のGαsサブユニットは以前記載された通りに精製された（Sunaharaら 1997年）。この実験から、Nb37はGαs単独へのGRPγSの結合を用量依存的に遮断すると思われる。これらに結果により、Nb37の結合エピトープはヘテロ三量体Gsタンパク質のGαsサブユニットに限定されていることも示されている。類似の実験では（図17）、漸増する量のNb35は1μMの精製Gαsおよび100nMのボディパイ-GRPγS-FLと一緒にインキュベートされた。Nb35はGαsRASおよびGβの要素で構成されたエピトープに結合するという所見と一致して（実施例7を参照）、Nb35はGαsサブユニット単独へのGRPγSの結合に何の効果もない。

20

【0213】

別の実験では（図18）、漸増する量のNb35は1μMの精製Gsαβγヘテロ三量体および100nMのボディパイ-GRPγS-FLと一緒にインキュベートされた。この実験により、Nb35は遊離のGsαβγヘテロ三量体へのGRPγSの結合を用量依存的に遮断することが示されている。

30

【0214】

〔実施例9〕：Nb35は他のアゴニスト-GPCR-Gs複合体を安定化する

Gsアルファサブユニット（またはGsタンパク質）は、アデニル酸シクラーゼを活性化することによりcAMP依存性経路を活性化するヘテロ三量体Gsタンパク質サブユニットである。Gsに共役するGsタンパク質共役受容体には、とりわけ、5-HT受容体型5-HT₄および5-HT₇、ACTH受容体、アデノシン受容体型A_{2a}およびA_{2b}、アルギニンバソプレシン受容体2、βアドレナリン受容体型β₁、β₂およびβ₃、カルシトニン受容体、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体、ドーパミン受容体D₁様ファミリー（D₁およびD₅）、FSH受容体、胃抑制ポリペプチド受容体、グルカゴン受容体、グルカゴン様ペプチド1受容体（GLP1-R）、ヒスタミンH₂受容体、黄体形成ホルモン／絨毛性コナドトロピン受容体、メラノコルチン受容体、副甲状腺ホルモン受容体1、プロスタグランジン受容体型D₂およびI₂、セクレチン受容体、甲状腺刺激ホルモン受容体が含まれる。

40

【0215】

β₂AR：Gs：B1-167107内のGsに結合するナノボディが他のGPCR：Gs：アゴニスト複合体も安定化するかどうかを判定するため、我々は、Gs、Nb35およびアルギニンバソプレシンと複合体を形成したアルギニンバソプレシン受容体2（受託番号P30518；V2R_HUMAN）の複合体（AVP：NT4LV2R：Gs）を調製し、SECにおけるこの複合体の安定性を実証した。アルギニンバソプレシン（A

50

VP) は、バソプレシン、アルギプレシンまたは抗利尿ホルモンとしても知られるが、アルギニンバソプレシン受容体2を活性化する天然リガンドである。

【0216】

安定な複合体の形成(図19a)は、0.1mlバッファー(10mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、0.1%のDDM、1mMのEDTA、3mMのMgCl₂、10μMのAVP)中で、およそ90μM濃度のHisタグ付きGsヘテロ三量体をAVP結合NT4LV2R(90μM)およびNb35(100μM)と混合することにより実現され、室温で2時間インキュベートした。次に、AVP:NT4LV2R:Gs複合体は2つの連続する親和性精製段階で精製された。精製はSDS-PAGEによりモニターされた(図19)。まず、複合体は、10mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaClバッファー中1%のMNGを300μlを反応混合物に添加した後Ni-NTAカラムに適用された。バッファーを用いた広範な洗浄に続いて、複合体は200mMのイミダゾールを用いて0.2%のMNG、10mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、AVP10μM中に溶出された。次に、複合体はFLAGタグ親和性カラムに適用され、0.01%のMNGを含有する同じバッファー中で広範に洗浄され、FLAGペプチドを用いて溶出された。この手順はSDS-PAGEによりモニターされ(図19b)、NT4LV2R、Gαs、Gβ、GγおよびNb35を含有する複合体をそれに従って精製することが可能であることを示している。この複合体は、10mMのHEPES、pH7.5、100mMのNaCl、0.01%のMNG、1mMのEDTA、3mMのMgCl₂、1μMのAVP中、superdex200カラム上でSECによりさらに精製された。この手順はSDS-PAGEによりモニターされ(図19c)、NT4LV2R、Gαs、Gβ、GγおよびNb35を含有する単分散複合体をそれに従って精製することが可能であることを示している。

【0217】

AVP:NT4LV2R:Gs複合体の安定性を確認するため、精製された試料を氷上で24時間インキュベートし、その単分散性およびそのMWを確認するために試料をSECに再適用した(図20)。予想通り、過剰量のアンタゴニストSR121463(10μM)はAVP:NT4LV2R:Gs複合体を破壊する。

【0218】

[実施例10]:GPCR:Gタンパク質複合体を安定化するナノボディを使用するアゴニストまたはポジティブアロステリックモジュレーターについての改良されたスクリーニング

GPCRの突き出していない配座異性体を選択的に安定化するナノボディは、この特定の低量配座異性体と選択的に相互作用するリガンドについてのさらに効率的なスクリーニングを可能にする。その上、配座異性体選択性ナノボディを使用して、薬物スクリーニングのためのアロステリックもしくは隠れた新薬の開発につながる部位を曝露するまたは望まれない結合ポケットを逆にマスクすることもできる。特定の配座異性体が活性状態である場合には、同定されたリガンドはアゴニストとして振る舞う高い可能性があり、CostanzioおよびVillar(2011年)により記載されているインシリコドッキング実験により支持されている。実際、その結果によれば、活性化された構造はアンタゴニストよりもアゴニストの同定のほうに有利であり、不活性構造はアゴニストよりも受容体遮断剤の同定に有利である。

【0219】

Nb35が、GαsおよびGβγサブユニットの界面に結合することにより活性化されたβ2ARとGタンパク質間の複合体を安定化するという証拠が提供される。β2ARの低量の活性状態配座異性体と選択的に相互作用するリガンドを同定するスクリーニングアッセイの例は、β2AR集合をその活性状態の方により移動させるNb35を使用する放射性リガンドアッセイであり得る。そのような放射性リガンドアッセイは、少し改変を加えてSeifertおよび共同研究者(1998年)により記載されているアッセイとほぼ同じように実行することが可能である。我々は、一般的に好まれる標的としてβ2AR

を含み、 $\beta 2$ ARの代わりに $G\alpha s$ と相互作用をする他の任意のGPCRを使用するアッセイをここに記載し、その特定のGPCRに対するアゴニストリガンドを同定する類似のスクリーニング法を実行する。小分子(MWが典型的には250から1000 Daの化合物)または断片ベース(MWが典型的には250 Da未満の化合物)ライブラリーでさえスクリーニングして候補アゴニストを同定することが可能である。とりわけ断片ベースの薬物スクリーニングにおける最初の的中は典型的には効力/親和性が低いために、突き出していない配座異性体の安定化は、断片ライブラリースクリーニングの性能をかなり増加させる。Nb35は、選択性の新薬の開発につながる配座異性体に特異的である化合物の親和性を選択的に増加させ、したがって新規の断片の同定に強い効果を及ぼす。

【0220】

膜固定されたGタンパク質サブユニットを含有するHEK293T細胞からのヒト $\beta 2$ ARホモジナイズされた膜抽出物の適切な量(典型的には10 μ g)は、インキュベーションバッファー(50 mMのHepes pH7.4、1 mMの $CaCl_2$ 、5 mMの $MgCl_2$ 、100 mMのNaClおよび0.5% w/v BSA)中、30℃で1時間、Nb35または非関連ナノボディ(活性GPCR立体構造を安定化しない)と並行してインキュベートされる。ナノボディはアドレナリン受容体と比べてモル大過剰に(たとえば、1 μ M以上)外因的に供給される。続いて、ナノボディ結合膜は、ライブラリー化合物および2 nMの3H-ジヒドロアルプレノロール(DHA)アンタゴニスト放射性リガンドを含有する96ウェルプレートに添加される。ウェルあたりの全容積はインキュベーションバッファーで100 μ lに調整され、反応混合物は30℃でもう1時間インキュベートされる。続いて、膜結合放射性リガンドは、0.3%ポリエチレニミン中に予浸されたGF/Cグラスファイバー96ウェルフィルタープレート(Perkin Elmer)を使用して収穫される。フィルタープレートは氷洗浄バッファー(50 mMのTris-HCl pH7.4)で洗浄され、50℃で30分間乾燥される。25 μ lのシンチレーション液(MicroScint (商標)-O, Perkin Elmer)を添加後、放射活性(cpm)はWallac MicroBeta TriLuxシンチレーションカウンターにおいて測定される。非関連ナノボディを使用せずにNb35の存在下でcpmを著しく減少するライブラリー化合物はアゴニストリガンドと見なされる。一次ライブラリースクリーニングを介して同定される候補アゴニストの中は用量応答的に再スクリーニングされる。Nb35および非関連ナノボディの存在下での候補アゴニストごとの%放射性リガンド置換曲線のIC50値は、Graphpad Prismソフトウェアを使用して計算される。同定された新規化合物の効果的受容体活性化作用を証明するため、細胞 $\beta 2$ ARシグナル伝達アッセイにおけるこれらの化合物の用量依存性効果が評価されることになる。そのようなアッセイの一例は、 $G\alpha s$ 媒介シグナル伝達後のcAMPなどの二次メッセンジャー分子の検出に頼っている(たとえば、HitHunter cAMPアッセイ技術、DiscoverX)。膜抽出物および外因的に適用されるNb35を使用する代わりに、 $\beta 2$ AR集団をその活性状態に移動させるために細胞内抗体(または由来膜)としてNb35で同時トランスフェクトされた $\beta 2$ AR発現細胞株で、放射性リガンドアッセイを実施することができた。代わりに、組換えGタンパク質および $\beta 2$ ARを使用して、Nb35を介して $\beta 2$ ARの活性状態を安定化することができる。

【0221】

実施例の材料および方法

$\beta 2$ AR、 Gs ヘテロ三量体およびナノボディ35の発現および精製

365位で切断されたN末端融合T4リゾチーム- $\beta 2$ AR構築物(T4L- $\beta 2$ AR、下に詳細に記載されている)は、以前記載された方法(Kobilkaら1995年)に従って、組換えバキュロウイルスで感染されたSf-9昆虫細胞培養物(BestBac、Expression systems)において発現され、n-ドデシル- β -D-マルトシド(DDM)中に可溶化された(精製全体像は図6を参照)。残基365の後で切断された $\beta 2$ AR構築物($\beta 2$ AR-365; 配列番号55)は、大多数の分析実験のためにおよび重水素交換実験のために使用された。M1 FLAG親和性クロマトグラ

フィー (Sigma) は最初の精製段階としての役割を果たし、機能的受容体の選択のためのアルプレノロールセファロスクロマトグラフィーが続いた。それに続くM1 FLAG親和性クロマトグラフィー段階を使用して、受容体結合アルプレノロールを高親和性アゴニストBl-167107と交換した。アゴニスト結合受容体は溶出され、バッファー (20mMのHEPES pH7.5、100mMのNaCl、0.1%DDMおよび10 μ MのBl-167107) に対して透析され、ラムダホスファターゼ (New England Biolabs) で処理され、50kDaの分画分子量 (MWCO) Millipore濃縮器を用いておよそ50mg ml⁻¹まで濃縮された。スピン濃縮に先立って、T4L- β 2ARではなく β 2AR-365構築物はPNGアーゼF (New England Biolabs) で処理されてアミノ末端N連結グリコシル化を取り除いた。精製された受容体は、SDS-PAGE/クーマシーブリリアントブルー染色により日常的に解析された (図5aを参照)。

【0222】

ウシGa₅ショート、His₆タグに融合したラットG β ₁およびラットG γ ₂ (表5を参照) は、Insect Xpress無血清培地 (Lonza) において増殖されたHigh5昆虫細胞 (Invitrogen) において発現された。培養物は、1mlあたり150万細胞の密度まで増殖され、次に3つの別々のオートグラファカリフォルニカ (Autographa californica) 核多角体病ウイルスであって、それぞれがGタンパク質サブユニットのうちの1つの遺伝子を含有するウイルスで1対1の感染多重度で感染された (ウイルスはDr. Alfred Gilmanより寄贈された)。40-48時間のインキュベーション後、感染細胞は遠心分離により収穫され、1リットルの培養物容積あたり75mlの溶解バッファー (50mMのHEPES pH8.0、65mMのNaCl、1.1mMのMgCl₂、1mMのEDTA、1 $\times$ PTT (35 μ g/mlのフッ化フェニルメタンスルホン、32 μ g/mlのトシルフェニルアラニルクロロメチルケトン、32 μ g/mlのトシルリシルクロロメチルケトン)、1 $\times$ LS (3.2 μ g/mlのロイペプチンおよび3.2 μ g/mlのダイズトリプシン阻害剤)、5mMの β -MEおよび10 μ MのGDP) 中に再懸濁された。懸濁液は窒素空洞化爆弾 (Parr Instrument Company) において40分間、600psig N₂で加圧された。減圧後、ライセートは遠心分離されて核および非溶解細胞を取り除き、次に180,000 $\times$ gで40分間、超遠心分離された。ペレット化された膜は、Dounceホモジナイザーを使用して1リットル培養物容積あたり30mlの洗浄バッファー (50mMのHEPES pH8.0、50mMのNaCl、100 μ MのMgCl₂、1 $\times$ PTT、1 $\times$ LS、5mMの β -ME、10 μ MのGDP) 中に再懸濁され、再び180,000 $\times$ gで40分間、遠心分離された。洗浄されたペレットは最小容積の洗浄バッファーに再懸濁され、液体窒素を用いて急速冷凍された。

【0223】

凍結した膜は解凍され、新鮮な洗浄バッファーで全タンパク質濃度5mg/mlまで希釈された。コール酸ナトリウム界面活性剤が最終濃度1.0%で懸濁液に添加され、MgCl₂は最終濃度5mMまで添加され、.05mgの精製されたタンパク質ホスファターゼ5 (自社製) は1リットルの培養物容積あたりで添加された。試料は氷上で40分間攪拌され、次に180,000 $\times$ gで40分間、遠心分離されて不溶性デブリを取り除いた。上澄みはNi-NTAロードバッファー (20mMのHEPES pH8.0、363mMのNaCl、1.25mMのMgCl₂、6.25mMのイミダゾール、0.2%のAnzergent 3-12、1 $\times$ PTT、1 $\times$ LS、5mMの β -ME、10 μ MのGDP) で5倍に希釈され、コール酸濃度をその臨界ミセル濃度よりも下にあまりにも急速に下げるのを避けるために注意してバッファーをゆっくり添加した。1リットルの培養物容積あたり、Ni-NTA洗浄バッファー1 (20mMのHEPES pH8.0、300mMのNaCl、2mMのMgCl₂、5mMのイミダゾール、0.2%のコール酸、0.15%のAnzergent 3-12、1 $\times$ PTT、1 $\times$ LS、5mMの β -ME、10 μ MのGDP) 中で予め平衡化された3mlのNi-NTA樹脂 (Qiagen) が

添加され、試料は氷上で20分間攪拌された。樹脂は重力カラムに収集され、Ni-NTA洗浄バッファー1、Ni-NTA洗浄バッファー2（20mMのHEPES pH8.0、50mMのNaCl、1mMのMgCl₂、10mMのイミダゾール、0.15%のAnzergent 3-12、0.1%のDDM、1×PTT、1×LS、5mMのβ-ME、10μMのGDP）およびNi-NTA洗浄バッファー3（20mMのHEPES pH8.0、50mMのNaCl、1mMのMgCl₂、5mMのイミダゾール、0.1%のDDM、1×PTT、1×LS、5mMのβ-ME、10μMのGDP）の4×カラム容積を用いて洗浄された。タンパク質は、Ni-NTA溶出バッファー（20mMのHEPES pH8.0、40mMのNaCl、1mMのMgCl₂、200mMのイミダゾール、0.1%のDDM、1×PTT、1×LS、5mMのβ-ME、10μMのGDP）を用いて溶出された。タンパク質含有画分はプールされ、MnCl₂は最終濃度100μMまで添加された。50μgの精製されたラムダタンパク質ホスファターゼ（自社製）は1リットルの培養物容積あたりで添加され、溶出液は氷上30分間攪拌しながらインキュベートされた。溶出液は0.22μmフィルターを通して、MonoQバッファーA（20mMのHEPES pH8.0、50mMのNaCl、100μMのMgCl₂、0.1%のDDM、5mMのβ-ME、1×PTT）中で平衡化されたMonoQ HR16/10カラム（GE Healthcare）上に直接負荷された。カラムは150mlのバッファーAを用いて5ml/分で洗浄され、結合しているタンパク質は、直線勾配最大28%のMonoQバッファーB（1MのNaCl以外バッファーAと同じ）で350ml超溶出された。画分は、最終濃度10μMにするのに十分なGDPをスポットされたチューブ内に収集された。Gs含有画分は、10kDa NMWL再生セルロース膜（Millipore）を用いた攪拌限外濾過細胞を使用して2mlまで濃縮された。濃縮された試料は、S200バッファー（20mMのHEPES pH8.0、100mMのNaCl、1.1mMのMgCl₂、1mMのEDTA、0.012%のDDM、100μMのTCEP、2μMのGDP）中で平衡化されたSuperdex 200 prepグレードXK 16/70カラム（GE Healthcare）上に流された。純粋なGsを含有する画分はプールされ、グリセロールは10%の最終濃度まで添加され、次にタンパク質は、30kDa MWCO再生セルロースAmicon遠心分離限外濾過装置を使用して少なくとも10mg/mlまで濃縮された。次に、濃縮された試料はアリコートされ、急速冷凍され、-80℃で保存された。8リットルの細胞培養物容積からの最終精製Gsヘテロ三量体の典型的収量は6mgであった。

【0224】

ナノボディ35（Nb35）（配列番号1）は、以前記載された方法（Rasmussenら 2011年）に従って、エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）株WK6の周辺質に発現され、抽出され、ニッケル親和性クロマトグラフィー、続いてMono S 10/100GLカラム（GE Healthcare）を使用するイオン交換クロマトグラフィー（図7a）により精製された。選択されたNb35画分はバッファー（10mMのHEPES pH7.5、100mMのNaCl）に対して透析され、10kDa MWCO Millipore濃縮器を用いておよそ65mg ml⁻¹まで濃縮された。

【0225】

タンパク質操作

R：G複合体の結晶を得る可能性を高めるために、我々は2つの戦略を使用して受容体細胞外表面の極性表面積を増加することを試みた。アプローチは、柔軟でおそらく構造不定のN末端を、カラゾロール結合受容体を結晶化し解明するために以前使用された球状タンパク質T4リゾチーム（T4L）（Rosenbaumら 2007年）で置き換えることであった。ここで使用される構築物（T4L-β2AR）は、切断可能なシグナル配列、続いてM1 Flagエピトープ（DYKDDDDA；配列番号70）、TEVプロテアーゼ認識配列（ENLYFQG；配列番号71）、C54TおよびC97A変異を含むN2からY161までのバクテリオファージT4リゾチーム、ならびにヒトβ₂AR配

列D29からG365までに融合している2つの残基アラニンリンカーを含有していた（配列番号69により定義されるT4L-β2AR融合構築物）。β₂ARのN187におけるPNGアーゼF隔絶されたグリコシル化部位はGluに変異していた。第一の細胞外ループ内のM96およびM98は、それぞれThrで置き換えられて、T4L-β2ARのそうでなければ低い発現レベルを増加した。スレオニン変異は³H-ジヒドロアルプレノロールに対するリガンド結合親和性に影響を与えなかったが、イソプロテレノールに対する親和性の小さなおよそ2倍の減少を引き起こした（データは示されていない）。ここで使用される野生型基準β2ARは配列番号72により定義されていることに留意されたい。

【0226】

マイクロ結晶学データ収集および処理

データ収集は先端放射光施設ビームライン23 ID-Bで実施された。何百もの結晶がスクリーニングされ、最終データセットは、20の強く回折している結晶から典型的には10度の回折ウェッジを使用してまとめられた。データ整理はHKL2000を使用して実施された（Otwinowskiら 1997年）。多くの場合に3 Åを超える回折が最初のフレームで見られたが、放射線障害および異方性回折のせいでより高い分解能シェルの完全性は低かった。UCLA回折異方性サーバーによる最終データセットの解析（Strongら 2006年）により、a*逆数軸に沿った回折は他の方向の回折よりも優れていることが示された。それぞれの逆格子空間軸に沿ったF/sig Fカットオフの3に基づいて、反射は、精密化して使用するのに先立って、a*、b*およびc*に沿った分解限界2.9、3.2および3.2オングストロームを用いた異方性切り捨てにかけられた。高分解能シェルの完全性の低さのせいで、我々はわずか3.3 Åの全分解能までのこの構造を報告するが、精密化および地図計算中に2.9 Åまでの一部の回折データが含まれていたことに留意すべきである。

【0227】

構造解明および精密化

構造はPhaserを使用する分子置換により解明された（McCoyら 2007a, b）。分子置換探索の順番は構造を解明するのに極めて重要であることが見出された。使用された順番に、探索モデルは、Giヘテロ三量体Gタンパク質の構造からのベータおよびガンマサブユニットの構造（PDB ID: 1GP2）、Gsアルファrasドメイン（PDB ID: 1AZT）、活性状態ベータ2アドレナリン受容体（PDB ID: 3POG）、ベータ2結合ナノボディ（PDB ID: 3POG）、T4リゾチーム（PDB ID: 2RH1）、Gsアルファヘリックスドメイン（PDB ID: 1AZT）であった。分子置換による初期構造の決定に続いて、剛体精密化およびシュミレートアニーリングが、Phenix（Afonineら 2005年）およびBUSTER（Blancら 2004年）において実施され、続いてCootにおいて拘束精密化（restrained refinement）および手動再構築が実施された（Emsleyら 2004年）。反復精密化および手動調整後、構造はDEN法を使用してCNSにおいて精密化された。この構造の分解能はDENが典型的にもっとも有用である分解能を超えてはいるが、いくつかの分解能の低い領域の存在により、精密化を先導する追加の情報を組み込むことによりもっとも良好な結果が得られることが示された。使用されたDEN基準モデルは分子置換探索モデルとして上で示されたモデルであり、例外はNB35で、これは秩序立っておりこれにはさらに高い分解能の構造は入手できない。図はPyMOLを使用して調製された（PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrodinger, LLC）。精密化統計は表7に与えられている。

【0228】

結合

β₂ARまたはβ₂AR-Gsペプチド融合物を発現する膜はバキュロウイルス感染 Sf9細胞から調製され、³H-ジヒドロアルプレノロール（³H-DHA）結合は以前記

10

20

30

40

50

載された (Swaminathら 2002 年) 通りに実施された。競合結合では、膜は ^3H -DHA (最終 1.1 nM) および漸増する濃度の (–) –イソプロテレノール (ISO) と一緒に 1 時間インキュベートされ、その後 GF/B フィルター上に収獲された。競合データは 2 部位結合モデルにフィットされ、ISO 高および低 K_i ならびに画分は GraphPad prism を使用して計算された。

【0229】

NT4LV2R の精製

N 末端融合 T4L V2R 構築物 (NT4L-V2R; 配列番号 73) はバキュロウイルス系 (Pfaster Bac) を使用して Sf9 細胞において発現された。細胞には 1 ml あたり 4×10^6 細胞の密度で感染させ、培養フラスコは 27°C で 48 時間振盪させた。10
収獲後、細胞は、 10 mM の Tris-HCl pH 7.5、 1 mM の EDTA、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のトルバプタン (Sigma) および反応性システインを遮断するための 2 mg ml^{-1} のヨードアセトアミドを含むバッファー中浸透圧ショックにより溶解させた。Sf9 膜からの NT4L-V2R の抽出は、 0.5% のドデシルマルトシド (DDM)、 0.3% のコール酸、 0.03% のコレステロールヘミコハク酸 (CHS)、 20 mM の HEPES pH 7.5、 0.5 M の NaCl、 30% v/v グリセロール、 2 mg ml^{-1} のヨードアセトアミドおよび $1\text{ }\mu\text{M}$ のトルバプタンを含む可溶化バッファー中で Dounce
ホモジナイザーを用いて実行された。遠心分離後、ニッケル-NTA アガロースが上澄みに添加され、2 時間攪拌され、次に 0.1% の DDM、 0.03% のコール酸、 0.01% の CHS、 20 mM の HEPES pH 7.5、 0.5 M NaCl の洗浄バッファーを用いて 100 g スピンでそれぞれ 5 分間、バッチ内で洗浄された。樹脂はガラスカラム
20 に注入され、結合している受容体は、 300 mM のイミダゾールを補充された洗浄バッファーに溶出された。我々は、抗 Flag M1 親和性樹脂を使用して NT4L-V2R をさらに精製し、リガンドをアゴニスト AVP と交換した。Ni-NTA 樹脂溶出液は抗 Flag M1 樹脂上に負荷され、 $10\text{ }\mu\text{M}$ の AVP の存在下で広範に洗浄された。次に、受容体は、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の AVP の存在下で、 0.2 mg ml^{-1} Flag ペプチドおよび 2 mM の EDTA を用いて抗 Flag M1 親和性樹脂から溶出させ、 100 kDa M WCO 濃縮器を使用して濃縮した。

【0230】

【表 2】

表2.ナノボディのリスト

ナノボディ照 合番号	ナノボディ略 語	配列番号	配列(C末端ヒスチジンタグおよびEPEAタグを含む)
CA4435	Nb35	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYKMN WVRQAPGKGLEWVSDISQSGASISYTGSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCARCPAPFTRD CFDVTSTTYAYRGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4433	Nb33	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMN WVRQAPGKGLEWVSDISNGGGTTSYASSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNGLKPADTAVYYCARCPAPFTN DCMDITSTTYAYRGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4436	Nb36	3	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTVSGTIFSVTVMG WYRQAPGKQRELVAGFTNTRNTNYVDSVKGRFTIS KDSAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCNVRRWG GTN WNDYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4437	Nb37	4	QVQLQESGGGFVQAGGSLRLSCAASGSIFSNTMA WFRQAPGKERELVAASPTGGSTAYKDSVKGRFTIS RDSAKNTVLLQMNVLKPEDTAVYYCHLRQNNRGSW FHYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4440	Nb40	5	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGTIFDITPMG WYRQTPGKQREVADLTSGRTTNYADSVKGRFTIS RDNACKMLYLQMNSLKSDDTGVYYCNVLRWG GIG WNDYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4441	Nb41	6	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCVASGFRFSNFP MWWVRQAPGKGLEWVSLISIGGSTTNYADSVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMNSLKPEDTAVYYCAKYLGRVPP TTEGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA

10

20

【 0 2 3 1 】

【表 3】

表3. ナノボディのFRとCDRの組合せ

ナノボディ照 合番号	ナノボディ略 語	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
CA4435	Nb35	QVQLQESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (配列番号7)	GFTFSNYK (配列番号13)	MNWVRQAPGK GLEWVSD (配列番号19)	ISQSGASI (配列番号25)	SYTGSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYC (配列番号31)	ARCPAPFTRDCFDV TSTTYAY (配列番号37)	RGQGTQVTVSS (配列番号43)
CA4433	Nb33	QVQLQESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (配列番号8)	GFTFSNYV (配列番号14)	MNWVRQAPGK GLEWVSD (配列番号20)	ISNGGGTT (配列番号26)	SYASSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMN GLKPADTAVYYC (配列番号32)	ARCPAPFTNDCMDI TSTTYAY (配列番号38)	RGQGTQVTVSS (配列番号44)
CA4436	Nb36	QVQLQESGG GSVQAGGSL RLSCTVS (配列番号9)	GTIFSVTV (配列番号15)	MGWYRQAPGK QRELVAG (配列番号21)	FTNTRNT (配列番号27)	NYVDSVKGRFTIS KDSAKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYC (配列番号33)	NVRRWGGTNWMDY (配列番号39)	WGQGTQVTVSS (配列番号45)
CA4437	Nb37	QVQLQESGG GFVQAGGSL RLSCAAS (配列番号10)	GSIFSKNIT (配列番号16)	MAWFRQAPGKE RELVA (配列番号22)	SPTGGST (配列番号28)	AYKDSVKGRFTIS RDSAKNTVLLQMN VLKPEDTAVYYC (配列番号34)	HLRQNNRGSWFHY (配列番号40)	WGQGTQVTVSS (配列番号46)
CA4440	Nb40	QVQLQESGG GLVQAGGSL RLSCAVS (配列番号11)	GTIFDITP (配列番号17)	MGWYRQTPGK QREWAD (配列番号23)	LTSRGTT (配列番号29)	NYADSVKGRFTIS RDNAKMILYLQM NSLKSDDTGVYYC (配列番号35)	NVKRWGGIGWMDY (配列番号41)	WGQGTQVTVSS (配 列番号47)
CA4441	Nb41	QVQLQESGG GLVQSGGSL RLSCVAS (配列番号12)	GFRFSNFP (配列番号18)	MMWVRQAPGK GLEWVSL (配列番号24)	ISIGGST (配列番号30)	NYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYC (配列番号36)	AKYLGRLVPPTT (配列番号42)	EGQGTQVTVSS (配列 番号48)

10

20

30

40

50

【表 4】

表4.ナノボディの核酸配列

ナノボディ 照合番号	ナノボディ略 語	配列番号	ナノボディのヌクレオチド配列(HisタグおよびEPEAタグの ヌクレオチド配列を含み、これには下線が施されている)
CA4435	Nb35	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCGGCC TCTGGATTACCTTCAGCAATTATAAAATGAACTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTCTC AGATATTTCTCAGAGTGGTGCTAGCATAAGTTACACA GGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACGCCAAGAACACGCTGTATCTACAAATGAACAGCC TGAAGCCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCCA GATGTCCGGCCCCATTACAGAGAGATTGTTTTGACGT GACTAGTACCACGTATGCCTACAGGGGGCCAGGGGAC CCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCAC GAACCTGAAGCCTAG
CA4433	Nb33	50	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGGGGCTTGGT GCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTTCAGTAAGTATGTCATGAACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTCT CAGATATTTCTAATGGCGGTGGTACCACAAGTTATGC AAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACGGC CTGAAGCCTGCGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAA GATGTCCGGCCCCATTACGAACGATTGTATGGACAT AACTAGTACCACGTATGCCTACAGGGGGCCAGGGGAC CCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCAC GAACCTGAAGCCTAG
CA4436	Nb36	51	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGT GCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGT CTCTGGAACCATCTTCAGTGTCACTGTCATGGGCTGG TACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTC GCAGGTTTTACTAATACTAGAAACACAACTATGTAGA CTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAAAGACAG CGCCAAGAACACGATGTATCTACAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAATGTAC GTCGGTGGGGCGGTACGAATTGGAATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACC ATCACCATCACGAACCTGAAGCCTAG
CA4437	Nb37	52	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGGGGCTTCGTG CAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGAAGCATCTTCAGTAAGAATACCATGGCCTGGT TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGAGAGTTGGTCG CAGCTAGTCTACGGGTGGTAGCACAGCGTATAAAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAG CGCCAAGAACACGGTGTGCTGCAATGAACGTCCTG AAACCTGAGGATACTGCCGTCTATTACTGTCATCTAC GTCAAAATAACCGTGGTTCTTGGTTCCACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCA TCACCATCACGAACCTGAAGCCTAG
CA4440	Nb40	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT GCAGGCTGGGGGGTCTGAGACTCTCTTGTGCAGT CTCTGGTACGATCTTCGATATCACTCCCATGGGCTGG TACCGCCAGACTCCAGGGAAGCAGCGCAAGTGGTC

10

20

30

40

			GCAGATCTTACTAGTCGCGGTACCACAAATTACGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAAAATGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAAATCTGACGACACAGGCGTGATTACTGTAACGTG AAACGGTGGGGAGGTATTGGCTGGAACGACTACTGG GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACACCAC CATCACCATCACGAACCTGAAGCCTAG
CA4441	Nb41	54	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTG CAGTCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCT CTGGATTCAGATTCAGTAACCTTCCTATGATGTGGGTC CGCCAGGCCCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTCTC GCTGATTAGCATTGGTGGTAGTACCACGAATTATGCG GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACGCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCC TGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAA ATATCTTGGTCGGCTGGTCCCACCGACTACTGAGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCA TCACCATCACGAACCTGAAGCCTAG

10

【 0 2 3 3 】

【 表 5 】

表5.Gタンパク質サブユニットのアイソフォームの例

タンパク質/サブ ユニット	受託番号 (配列番号)	アイソフォーム	AA配列
ヒトG _{oxS} ショート	P63092 (56)	GNAS2_HUMAN	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHR LLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGDSEKATKVQDIKNNLK EAIETIVAAMSNLVPVELANPENQFRVDYILSVMNVPDFDFPP EFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYFLDKIDVIKQA DYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVNFMFMDVGGQORDER RKWIQCFNDVTAIIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSI WNNRWLRTISVILFNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTP EDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGDGRHYCYPHFTCA VDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL
ヒトG _{oxi}	P63096 (57)	GNAI1_HUMAN	MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLGAGE SGKSTIVKQMKIIEAGYSEEECKQYKAVVYSNTIQSIIAIRAMG RLKIDFGDSARADDARQLFVLGAAEEGFMTAELAGVIKRLWK DSGVQACFNRSREYQLNDSAAYYLNDLDRIAQPNIPTQQDVL RTRVKTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHCFEVGT AIIFCVALS DYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTS IILFLNKKDLFEKIKKSPLTICYPEYAGSNTYEEAAAYIQCFEDLN KRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVDAVTDVVIKNNLKDCGLF
ヒトG _{oxT}	P11488 (58)	GNAT1_HUMAN	MGAGASAEKHSRELEKKLKEDAEDARTVKLLLLGAGESGKSTI VKQMKIHHQDGYSLCEFIAYGNTLQSILAIVRAMTTLNIIQYG DSARQDDARKLMHMADTIEEGTMPKEMSDIIQRLWKDSGIQ ACFERASEYQLNDSAGYYLSDLERLVTPGVVPTEQDVLRSRVKTT GIETQFSFKDLNFRMFDVGGQRSEKRWIHCFEVGTCTIIFIAALS AYDMVLVEDDEVNRMHESLHLFNSICNHRFYATTSIVLFLNKKD VFFEKIKKAHLSICFPDYDGPNTYEDAGNYIKVQFLELNMRRDVK EIYSHMTCATDTQNVKFVDAVTDIIKENLKDCLF

20

30

40

タンパク質/サブユニット	受託番号 (配列番号)	アイソフォーム	AA配列
ウシ <i>Gαs</i> ショート	P04896 (59)	GNAS2_BOVIN	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHR LLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNNGEGGEEDPQAARSNSD GEKATKVQDIKNNLKEAETIVAAMSNLVPVELANPENQFRVD YILSVMNVPDFDFPPEFYEHAALWEDEGVRACYERSNEYQLID CAQYFLDKIDVIKQDDYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVN FHMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVAVSSSYNMVIREDN QTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFNKQDLAEKVLGKS KIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASG DGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIQRMHLRQYELL
ラット <i>Gαs</i> ショート	P63095 (60)	GNAS2_RAT	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHR LLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNNGEGGEEDPQAARSNSD GEKATKVQDIKNNLKEAETIVAAMSNLVPVELANPENQFRVD YILSVMNVPNDFDFPPEFYEHAALWEDEGVRACYERSNEYQLID CAQYFLDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVN FHMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVAVSSSYNMVIREDN QTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFNKQDLAEKVLGKS KIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASG DGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIQRMHLRQYELL
マウス <i>Gαs</i> ショート	P63094 (61)	GNAS2_MOUSE	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHR LLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNNGEGGEEDPQAARSNSD GEKATKVQDIKNNLKEAETIVAAMSNLVPVELANPENQFRVD YILSVMNVPNDFDFPPEFYEHAALWEDEGVRACYERSNEYQLID CAQYFLDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVN FHMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVAVSSSYNMVIREDN QTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFNKQDLAEKVLGKS KIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASG DGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIQRMHLRQYELL
ウシ <i>Gβ</i>	P62871 (62)	GBB1_BOVIN	MSELDQLRQAEQLKNQIRDARKACADATLSQITNNIDPVGRI QMRTRRTLGRHLAKIYAMHWGTDSRLLSASQDGKLIWDSYT TNKVHAIPLRSSWV/MTCAYAPSGNYVACGGLDNICSIYNLKTRE GNVRVSRELAGHTGYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETG QQTTTFTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVREG MCRQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATCRLFDLRADQ ELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFN CNVWDALKAD RAGVLAGHDNRVSLGVTDDGMAVATGSWDSFLKIWN
ヒト <i>Gβ</i>	P62873 (63)	GBB1_HUMAN	MSELDQLRQAEQLKNQIRDARKACADATLSQITNNIDPVGRI QMRTRRTLGRHLAKIYAMHWGTDSRLLSASQDGKLIWDSYT TNKVHAIPLRSSWV/MTCAYAPSGNYVACGGLDNICSIYNLKTRE GNVRVSRELAGHTGYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETG QQTTTFTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVREG MCRQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATCRLFDLRADQ ELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFN CNVWDALKAD RAGVLAGHDNRVSLGVTDDGMAVATGSWDSFLKIWN
ラット <i>Gβ</i>	P54311 (64)	GBB1_RAT	MSELDQLRQAEQLKNQIRDARKACADATLSQITNNIDPVGRI QMRTRRTLGRHLAKIYAMHWGTDSRLLSASQDGKLIWDSYT TNKVHAIPLRSSWV/MTCAYAPSGNYVACGGLDNICSIYNLKTRE GNVRVSRELAGHTGYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETG QQTTTFTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVREG

10

20

30

40

タンパク質/サブユニット	受託番号 (配列番号)	アイソフォーム	AA配列
			MCRQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATCRLFDLRADQ ELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFNCNVWDALKAD RAGVLAGHDNRVSLGVTDDGMAVATGSWDSFLKIWN
マウスGβ	P62874 (65)	GBB1_MOUSE	MSELDQLRQEAQQLKNQIRDARKACADATLSQITNNIDPVGRI QMRTRRTLRLGHLAKIYAMHWGTDSRLLVSASQDGKLIWDSYT TNKVHAIPLRSSWVMTCAYAPSGNYVACGGLDNICSINYNLKTRE GNVRVSRELAGHTGYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETG QQTTTFTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVREG MCRQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATCRLFDLRADQ ELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFNCNVWDALKAD RAGVLAGHDNRVSLGVTDDGMAVATGSWDSFLKIWN
ウシGγ	P63212 (66)	GBG2_BOVIN	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAADLMAYCEA HAKEDPLLPVPASENPFREKKFFCAIL
マウスGγ	P63213 (67)	GBG2_MOUSE	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAADLMAYCEA HAKEDPLLPVPASENPFREKKFFCAIL
ヒトGγ	P59768 (68)	GBG2_HUMAN	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAADLMAYCEA HAKEDPLLPVPASENP FREKKFFCAIL

10

20

【 0 2 3 4 】

【表 6】

表6.R:G界面内の潜在的分子間相互作用

	原子 in β_2AR	原子 in $G\alpha$	距離 (Å)	
TM3	[ARG 131 CG]	[TYR 391 CE2]	3.6	$\alpha 5$
	[ALA 134 O]	[HIS 387 ND1]	3.1	
	[ALA 134 CB]	[HIS 387 ND1]	3.8	
	[ALA 134 CB]	[HIS 387 CG]	3.8	
	[ILE 135 O]	[GLN 384 NE2]	2.9	
	[ILE 135 CD1]	[LEU 388 CD1]	3.5	
	[ILE 135 CD1]	[LEU 393 CD1]	3.5	
	[THR 136 O]	[ARG 380 NH2]	3.0	
IL2	[PRO 138 O]	[ILE 383 CD1]	3.4	$\beta 1$ $\alpha 4$ $\alpha 5$ αN
	[PRO 138 CG]	[GLN 384 CG]	3.3	
	[PHE 139 CD2]	[HIS 41 NE2]	3.6	
	[PHE 139 CB]	[VAL 217 CG2]	3.7	
	[PHE 139 CE1]	[PHE 376 CZ]	3.3	
	[PHE 139 CZ]	[CYS 379 C]	3.9	
	[PHE 139 CZ]	[ARG 380 N]	3.2	
	[TYR 141 CD2]	[HIS 387 NE2]	3.9	
	[GLN 142 OE1]	[HIS 387 NE2]	3.5	
	[SER 143 OG]	[ALA 39 CB]	3.6	
TM5	[VAL 222 CG1]	[LEU 393 CD1]	3.7	$\alpha 5$ $\beta 6$ $\alpha 5$ $\alpha 4$
	[GLU 225 OE2]	[GLN 384 NE2]	3.0	
	[ALA 226 CA]	[LEU 388 CD2]	3.6	
	[ALA 226 CB]	[LEU 393 O]	3.8	
	[GLN 229 NE2]	[ASP 381 OD1]	3.6	
	[GLN 229 NE2]	[GLN 384 OE1]	2.8	
	[GLN 229 OE1]	[ARG 385 NE]	3.4	
	[GLN 229 CG]	[LEU 388 CD2]	3.9	
	[LEU 230 CG]	[LEU 394 CD1]	3.5	
	[LYS 232 NZ]	[ASP 381 OD1]	3.1	
	[ILE 233 CD1]	[TYR 358 OH]	3.4	
	[ILE 233 CG1]	[ARG 385 NH1]	3.5	
	[ARG 239 NE]	[THR 350 OG1]	3.5	
TM6	[ALA 271 CB]	[LEU 393 O]	3.0	$\alpha 5$
	[THR 274 CG2]	[GLU 392 O]	3.4	
	[THR 274 OG1]	[LEU 393 CD2]	3.3	
	[LEU 275 CD2]	[LEU 393 CD2]	3.6	

【 0 2 3 5 】

【表 7】

表7.データ収集および精密化統計

データ収集*	
結晶の数	20
空間群	P 2 ₁
セル寸法	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	119.3, 64.6, 131.2
α , β , γ (°)	90.0, 91.7, 90.0
分解能 (Å)	41 – 3.2 (3.26 – 3.20)
<i>R</i> _{merge} (%)	15.6 (55.3)
$\langle I \rangle / \langle \sigma I \rangle$	10.8 (1.8)
完全性 (%)	91.2 (53.9)
重複性	6.5 (5.0)
精密化	
分解能 (Å)	41 – 3.2
反射数	31075 (1557 in test set)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	22.5 / 27.7
原子数	10277
タンパク質残基数	1318
異方性 β テンソル	<i>B</i> ₁₁ = -7.0 / <i>B</i> ₂₂ = 4.7 / <i>B</i> ₃₃ = 2.3 / <i>B</i> ₁₃ = 2.1
非モデル配列 ^a	
β_2 アドレナリン受容体	29 ^b , 176-178, 240-264, 342-365
G _s α_1 rasドメイン	1-8, 60-88, 203-204, 256-262
G _s γ	1-4, 63-68
T4 リゾチーム	161 ^c
平均 β ファクター (Å ²)	
β_2 アドレナリン受容体	133.5
G _s α_1 rasドメイン	82.8
G _s α_1 ヘリックスドメイン	123.0
G _s β	64.2
G _s γ	85.2
ナノボディ 35	60.7
T4 リゾチーム	113.7
理想からの r.m.s 偏差	
結合長 (Å)	0.007
結合角 (°)	0.72
ラマチャンドラン統計 ^d	
好ましい領域 (%)	95.8
許容領域 (%)	4.2
異常値 (%)	0

*最も高いシエル統計は丸括弧に入っている。aこれらの領域は、電子密度の分解が十分でないせいでモデルからは省かれた。非モデル精製タグはこれらの残基範囲には含まれていない。b β 2ARの残基1-28は構築物から省かれ、T4Lは、結晶化を促進するために膜貫通ヘリックス1のアミノ末端に融合された。cT4Lの残基は構築物から省かれた。dMolProbityにより定義された通り。

【表 8】

参考文献

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., & Adams, P. D. (2005). A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61, 850-5..
- Baltensperger, K. et al. The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271, 1061-1064 (1996). 10
- Binz et al, *Nature Biotech.*, 22: 575-582 (2004)
- Blanc, E., Roversi, P., Vornrhein, C., Flensburg, C., Lea, S. M., Bricogne, G., et al. (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 60, 2210-21.
- Caffrey (2003). Membrane protein crystallization. *J Struct. Biol.* 2003 142:108-32.
- Caffrey, M. & Cherezov, V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat Protoc* 4, 706-731, (2009).
- Chae, P. S. et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 7, 1003-1008 (2010). 20
- Chelikani et al *Protein Sci.* 2006 15:1433-40
- Chini, B., & Parenti, M. (2009). G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *Journal of molecular endocrinology*, 42(5), 371-9.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, p. 156.
- Conrath K, Pereira AS, Martins CE, Timóteo CG, Tavares P, Spinelli S, Kinne J, Flaudrops C, Cambillau C, Muyldermans S, Moura I, Moura JJ, Tegoni M, Desmyter A. Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase. *Protein Sci.* 2009 Mar;18(3):619-28. 30
- Conrath K. E., M. Lauwereys, M. Galleni et al., *Antimicrob Agents Chemother* 45 (10), 2807 (2001).
- Costanzi S, Vilar S (2011). In Silico screening for agonists and blockers of the beta(2) adrenergic receptor: Implications of inactive and activated state structures. *Journal of computational chemistry* 33:561-572. 40
- Day P.W., Rasmussen S.G., Parrot C., Fung J.J., Masood A., Kobilka T.S., Yao X.J., Choi H.J., Weis W.I. and Rohrer D.K. et al., A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography, *Nat Methods* 4 (2007), pp. 927–929.

- Delean, A., J. M. Stadel, et al. (1980). "A TERNARY COMPLEX MODEL EXPLAINS THE AGONIST-SPECIFIC BINDING-PROPERTIES OF THE ADENYLATE CYCLASE-COUPLED BETA-ADRENERGIC-RECEPTOR." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 255(15): 7108-7117.
- Derewenda Z. S. Rational protein crystallization by mutational surface engineering, Structure (Camb) **12** (2004), pp. 529–535.
- Domanska, K. et al. Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 1314-1319, (2011). 10
- Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 2126-2132, (2004).
- Eroglu et al EMBO 2002 3: 491^96
- Eroglu et al Proc. Natl. Acad. Sci. 2003 100: 10219-10224
- Faham et al Crystallization of bacteriorhodopsin from bicelle formulations at room temperature. Protein Sci. 2005 14:836-40. 2005
- Faham et al, Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. J Mol Biol. 2002 Feb 8;316(1): 1-6. 20
- Foord, S. M., T. I. Bonner, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacological reviews 57(2): 279-288.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Molecular Pharmacology 63(6): 1256-1272.
- Gebauer & Skerra (2009) Current opinion in chemical biology 13, 245-255
- George et al, Nat Rev Drug Discov 1:808-820 (2002) 30
- Gouaux, It's not just a phase: crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. Structure. 1998 6:5-10;
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363, 446-448, doi:10.1038/363446a0 (1993).
- Hendrickson WA. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. Science. 1991 Oct 4;254(5028):51-8.
- Hofmann K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand et al., Trends Biochem Sci 34 (11), 540 (2009). 40
- Hunte C. and Michel H., Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, Curr Opin Struct Biol 12 (2002), pp. 503–508.
- Jameson, E. E. et al. (2005). Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. J Biol Chem 280, 7712-7719.
- Kenakin, Trends Pharmacol Sci 25:186-192 (2002)

- Kobilka et al. (2007) *Trends in pharmacological sciences* **28**, 397-406.
- Kobilka, B. K. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. *Anal Biochem* 231, 269-271 (1995).
- Koide et al, *J. Mol Biol*, 284: 1141-1151 (1998))
- Kolakowski, L. F. (1994). "GCRDB - A G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR DATABASE." *Receptors & Channels* 2(1): 1-7.
- Kolb, P., D. M. Rosenbaum, et al. (2009). "Structure-based discovery of beta(2)-adrenergic receptor ligands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16): 6843-6848. 10
- Kuszak, A. J., S. Pitchiaya, et al. (2009). "Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2." *The Journal of biological chemistry* 284: 26732-26741.
- Lagerström, M. C. and H. B. Schiöth (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." *Nature reviews. Drug discovery* 7: 339-357.
- Landau et al, *Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 93:14532-5 20
- Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1666(1-2), 62-87.
- Lee GM, Craik CS (2009). Trapping moving targets with small molecules. *Science*. Apr 10;324(5924):213-5.
- Lefranc, M. P., C. Pommie, et al. (2003). "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." *Developmental and Comparative Immunology* 27(1): 55-77. 30
- Li H., Dunn J.J., Luft B.J. and Lawson C.L., Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), pp. 3584–3589
- Luca et al *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100 :10706-I 1
- Lynch Kevin R. (Ed) *Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors* published by John Wiley & Sons (March 1998)
- Mansoor et al *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006 103: 3060-3065
- Marchese et al *Genomics* 23: 609-618, 1994
- McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 32-41 (2007). 40
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J., et al. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, 40(Pt 4), 658-674.

- McEwen, D. P., Gee, K. R., Kang, H. C. & Neubig, R. R. (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal Biochem* **291**, 109-117 .
- Misquitta, L. V. et al. Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure* 12, 2113-2124, (2004).
- Moro, O., Lameh, J., Hogger, P. & Sadee, W. Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 268, 22273-22276 (1993).
- Niu et al, *Biophys J.* 2005 89: 1833-1840
- Nollert et al Lipidic cubic phases as matrices for membrane protein crystallization *Methods*. 2004 34:348-53
- Ostermeier C., Iwata S., Ludwig B. and Michel H., Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase, *Nat Struct Biol* 2 (1995), pp. 842–846.
- Otwinowski, Z., & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology*, 276, 307–325.
- Palczewski, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 289, 739-745 (2000).
- Probst et al. 1992, *DNA Cell Biol.* 1992 11 : 1 -20;
- Qian ZM, Li H, Sun H and Ho K (2002). Targeted drug delivery via the transferring receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54, 561-587.
- Rasmussen et al. (2011) *Nature* **469**, 175-180.
- Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R. and Fischetti R.F. et al., Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* 450 (2007), pp. 383–387.
- Riechmann and Muyldermans J. *Immunol. Methods* 2000; 240: 185-195.
- Rios et al., *Pharmacol Ther* 92:71-87 (2001).
- Ritter, S. L., & Hall, R. a. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), 819-30. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrm2803.)
- Rosenbaum D. M., S. G. Rasmussen, and B. K. Kobilka, *Nature* 459 (7245), 356 (2009).
- Rosenbaum, D. M. et al. Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236-240 (2011).
- Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, et al. (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." *Science* 318: 1266-1273.
- Rummel et al, Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins. *J. Struct. Biol.* 1998 121 :82-91;

10

20

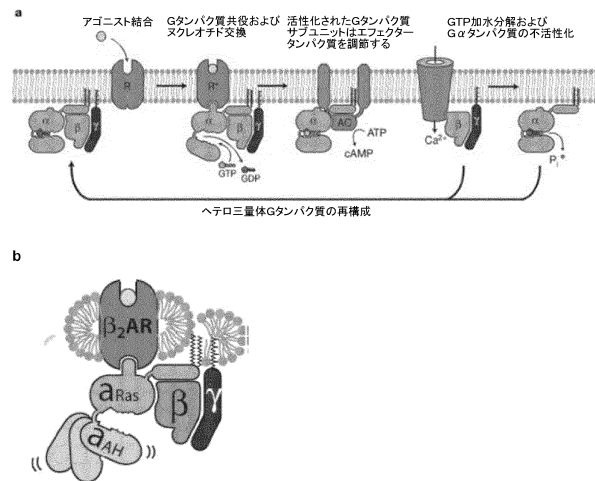
30

40

- Sawant R, Torchilin V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol Biosyst.* 2010 Apr;6(4):628-40. Epub 2009 Dec 21.
- Seifert et al. (1998). Reconstitution of beta2-adrenoceptor-GTP-binding-protein interaction in Sf9 cells--high coupling efficiency in a beta2-adrenoceptor-G(s alpha) fusion protein. *Eur. J. Biochem.* 255:369-382.
- Shimada et al *J. Biol. Chem.* 2002 277:31774-80
- Skerra, J. *Molecular Recognition*, 13:167-187 (2000) 10
- Sprang, S. R. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66, 639-678 (1997).
- Starovasnik et al , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10080- 10085 (1997)
- Steyaert J, Kobilka BK (2011). Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr Opin Struct Biol.* Aug;21(4):567-72.
- Strong, M. et al. Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8060-8065, (2006). 20
- Sunahara, R. K., Tesmer, J. J., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. Crystal structure of the adenylyl cyclase activator Gsalpha [see comments]. *Science* 278, 1943-1947 (1997).
- Swaminath, G., Steenhuis, J., Kobilka, B. & Lee, T. W. Allosteric modulation of beta2-adrenergic receptor by Zn(2+). *Mol Pharmacol* 61, 65-72. (2002).
- Tatsuya Haga (Ed), *G Protein-Coupled Receptors*, published by CRC Press (September 24, 1999)
- Van Eps, N. et al. Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011). 30
- Wall, M. A. et al. The structure of the G protein heterotrimer Gia1 b1 g 2. *Cell* 83, 1047-1058 (1995).
- Warne, T. et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491, (2008).
- Watson, S. (Ed) *G-Protein Linked Receptor Factsbook*, published by Academic Press (1st edition; 1994).
- Wess Jurgen (Ed) *Structure-Function Analysis of G Protein- Coupled Receptors* published by 40
Wiley-Liss (1 st edition; October 15, 1999)
- Whorton, M. R. et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7682-7687 (2007).
- Whorton, M. R., S. G. F. Rasmussen, et al. (2009). "The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex." *PNAS* 106: 1-6.

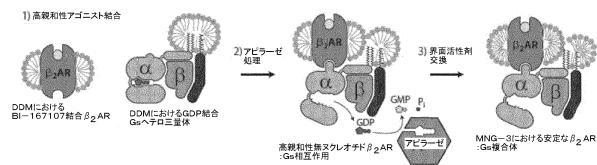
【図 1】

Figure 1

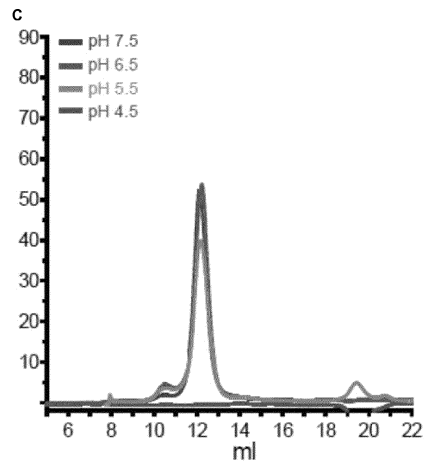


【図 2】

Figure 2

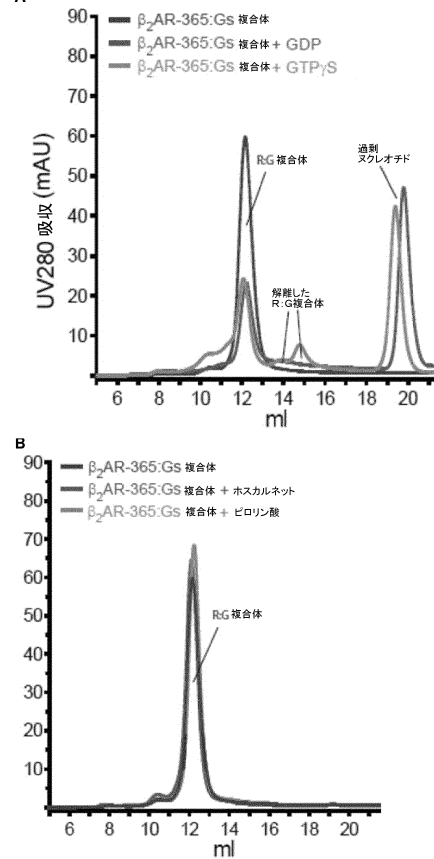


【図 3 - 2】

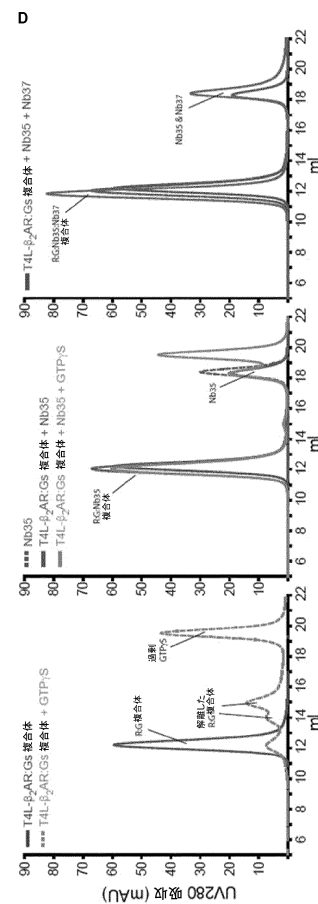


【図 3 - 1】

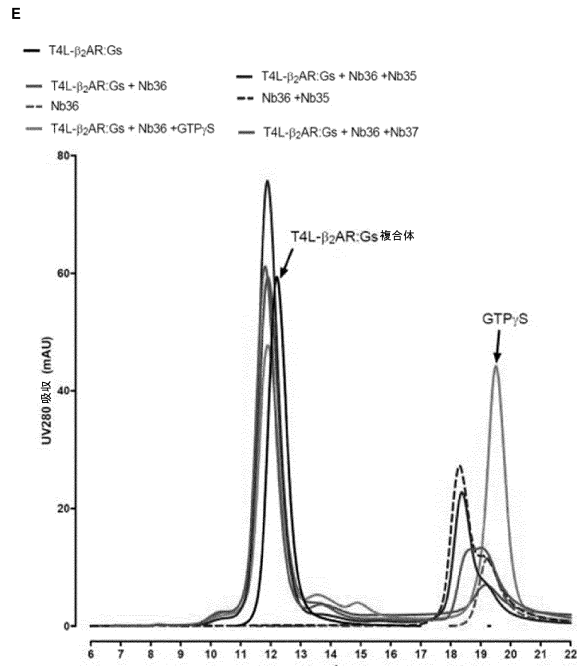
Figure 3



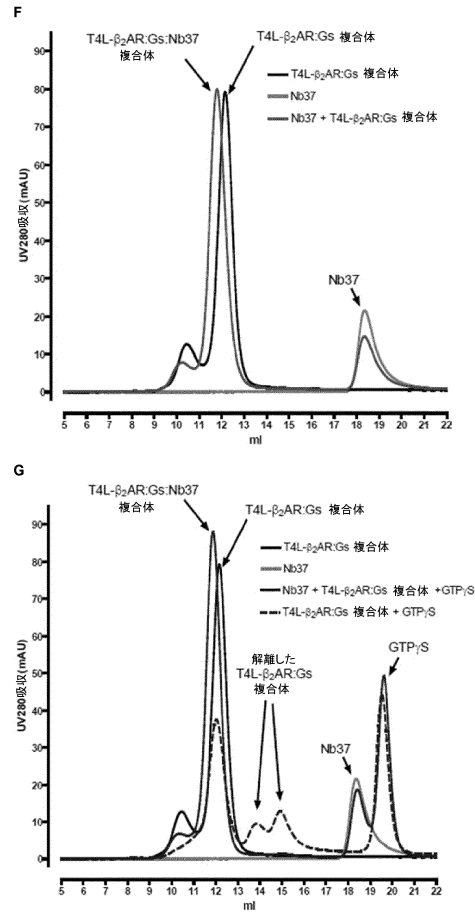
【図 3 - 3】



【図 3 - 4】

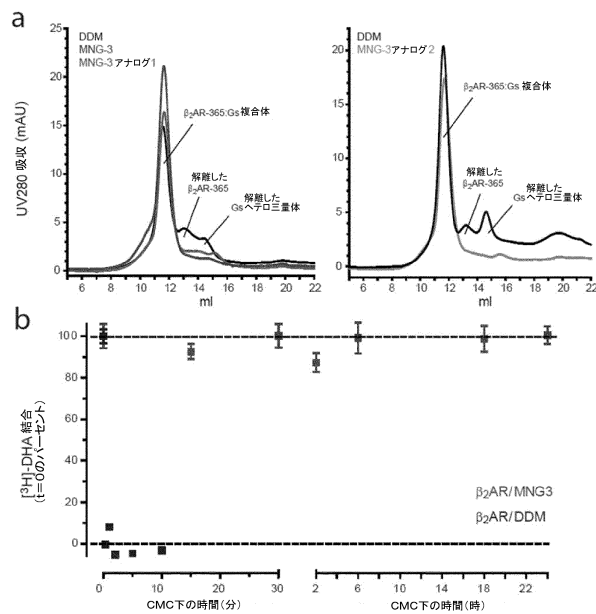


【図 3 - 5】



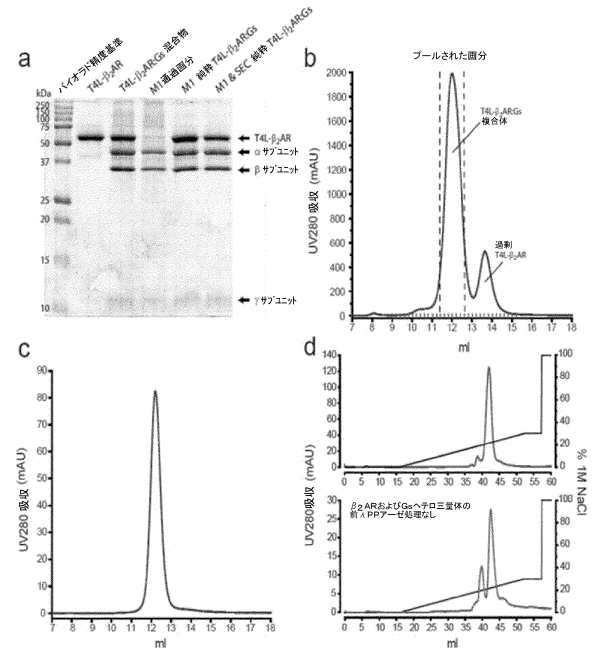
【図 4】

Figure 4



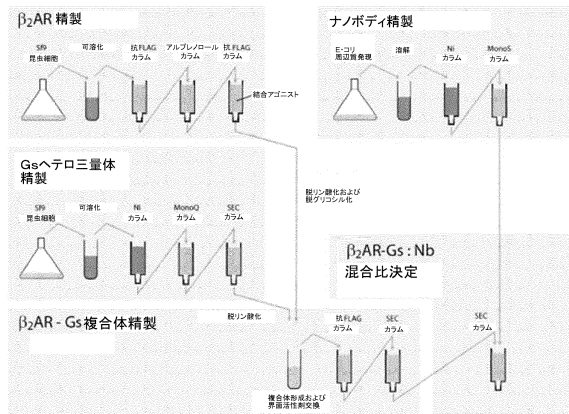
【図 5】

Figure 5



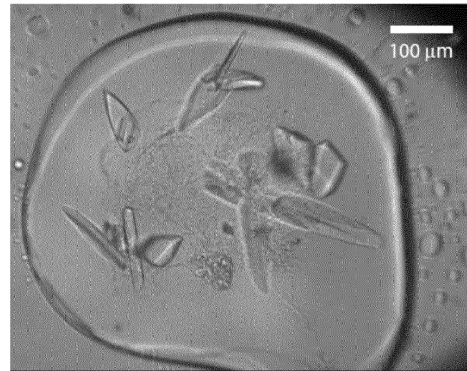
【図 6】

Figure 6



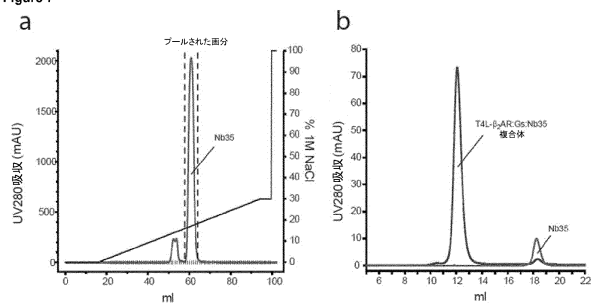
【図 8】

Figure 8



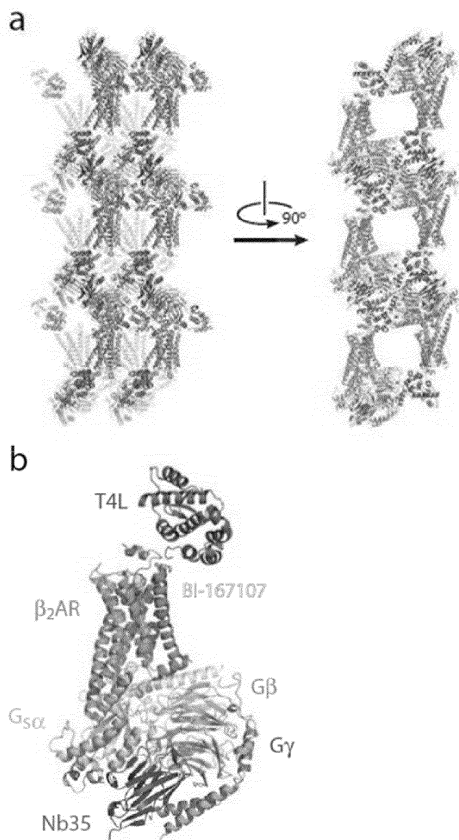
【図 7】

Figure 7



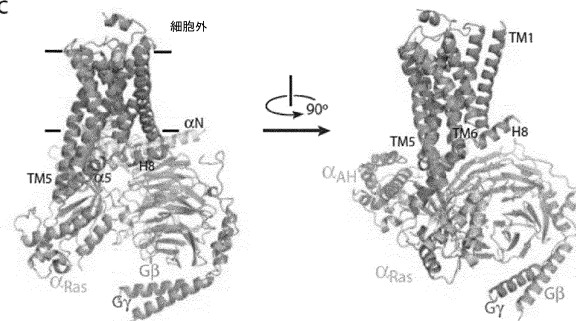
【図 9 - 1】

Figure 9



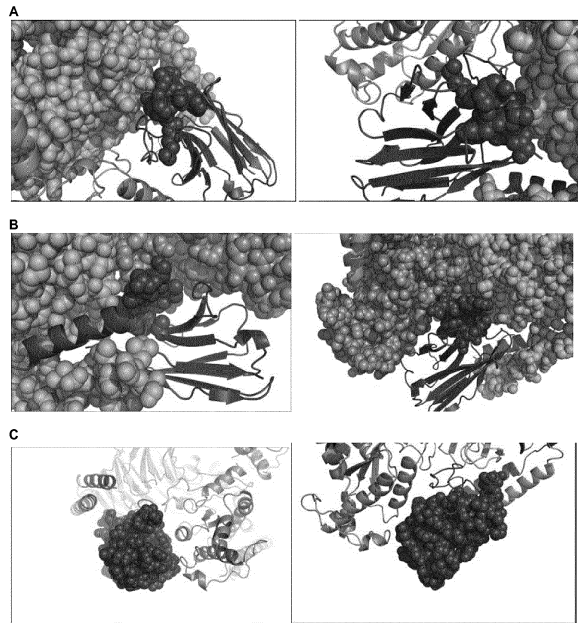
【図 9 - 2】

C



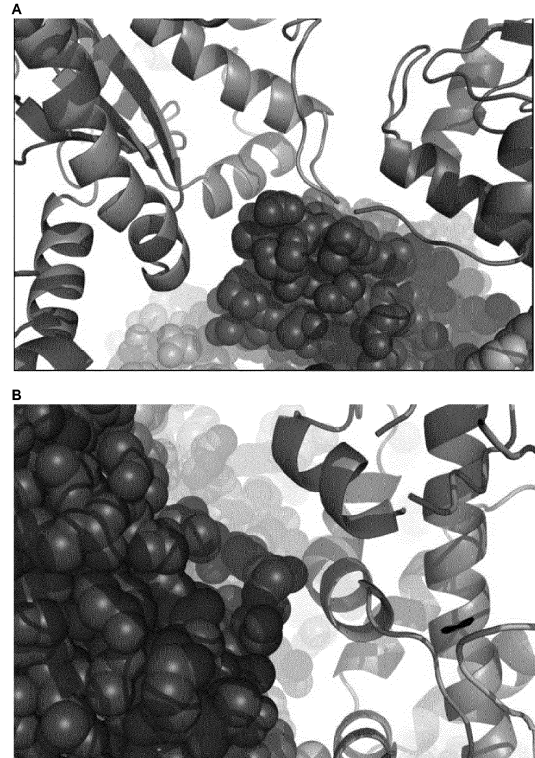
【図 10】

Figure 10



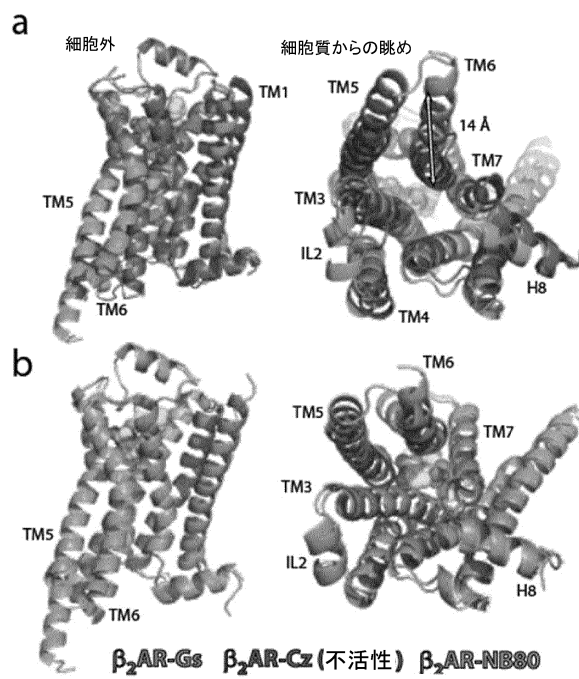
【図 11】

Figure 11



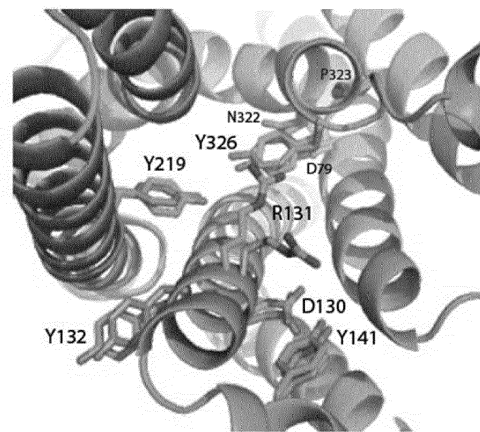
【図 12-1】

Figure 12



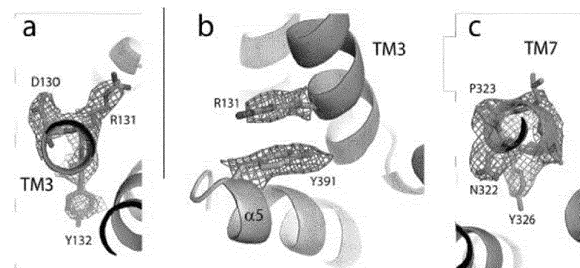
【図 12-2】

C

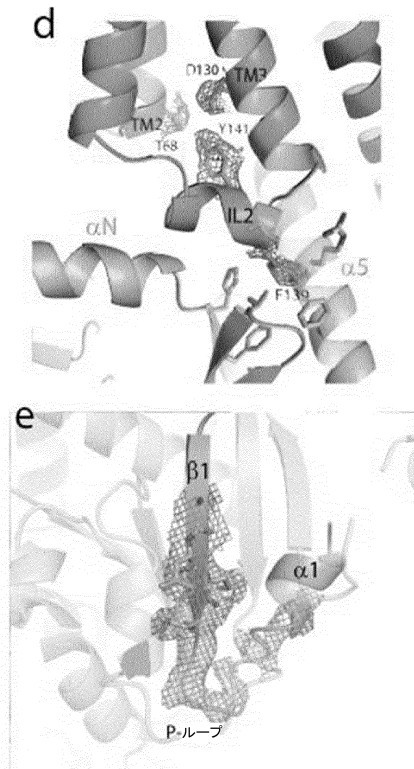


【図 13-1】

Figure 13

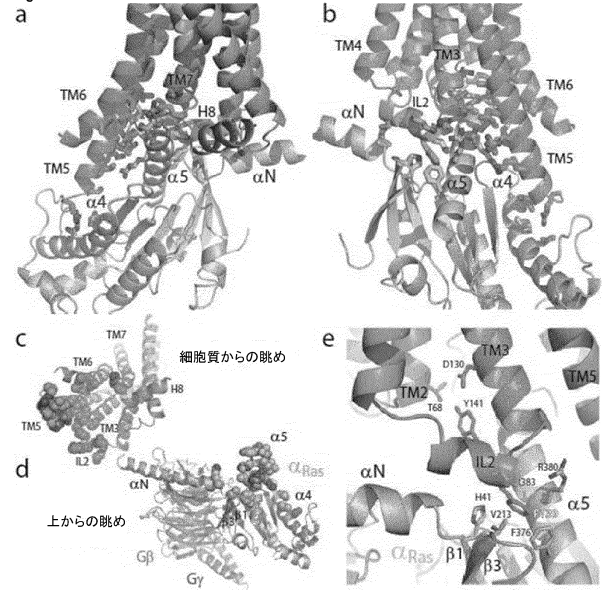


【図 13-2】



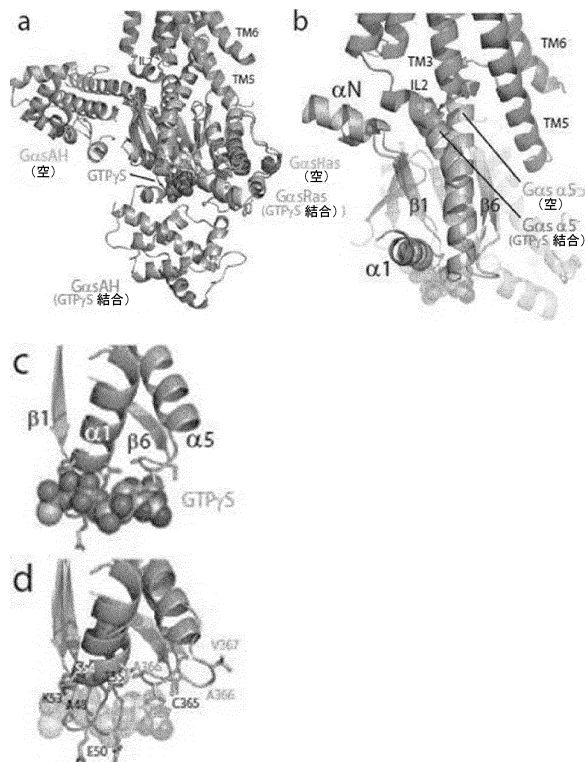
【図 14】

Figure 14



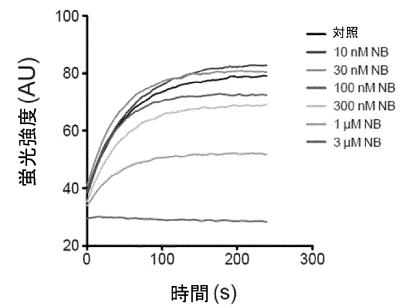
【図 15】

Figure 15



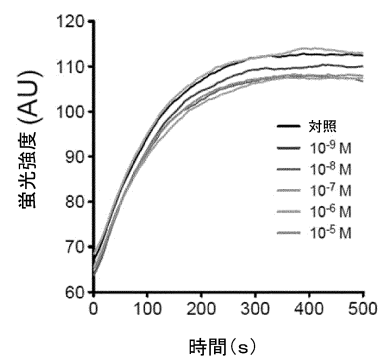
【図 16】

Figure 16



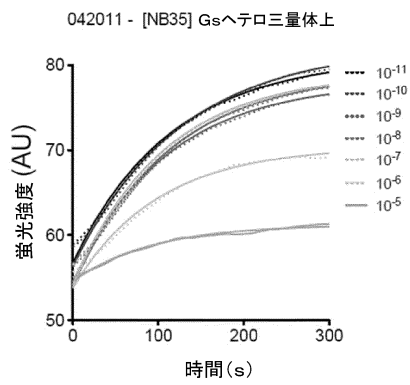
【図 17】

Figure 17



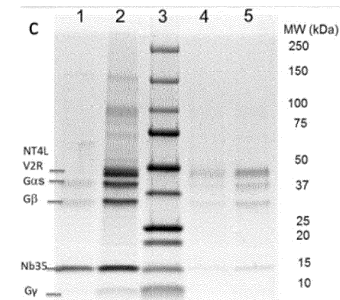
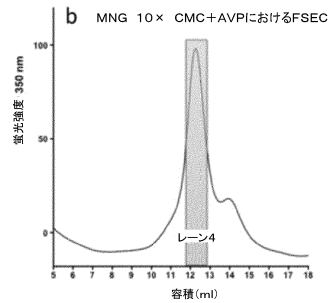
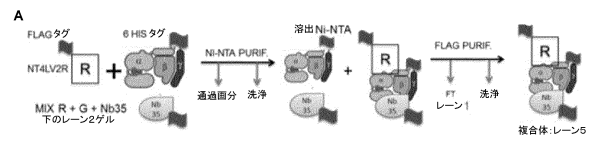
【図 18】

Figure 18



【図 19】

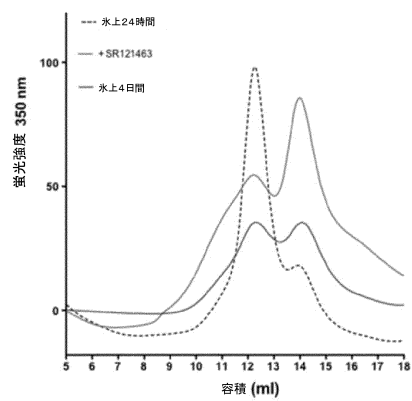
Figure 19



【図 20】

Figure 20

V2R-Gs-Nb35複合体: アンタゴニストSR121463効果および安定性オーバータイム



【配列表】

0006164535000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
 G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 N

(73)特許権者 513012026

ザ・ボード・オブ・トラステイズ・オブ・ザ・リーランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシテイ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94305-2038、スタンフォード、ピー・オー・ボックス・20386、メイン・クアド、ビルディング・170、サード・フロア

(73)特許権者 511000957

ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ミシガン
 THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
 アメリカ合衆国、48109-2590 ミシガン州、アナーバー、ヒューロン・パークウェイ、1600、オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー、セカンド・フロア

(74)代理人 110001173

特許業務法人川口国際特許事務所

(72)発明者 ステヤエルト, ヤン

ベルギー国、ベールセル、ブーケンボスストラート・108

(72)発明者 パルドン, エルス

ベルギー国、ベールセル、ルブベーク、スターツバーン・85

(72)発明者 レーレマンス, トーン

ベルギー国、ベールセル、ドゥオルプ、クラウエンベルグ・35

(72)発明者 コビルカ, ブライアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94306、パロ・アルト、チマルス・ドライブ・840

(72)発明者 ラスムセン, セーレン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94306、パロ・アルト、カートナー・アベニュー・330
 ・ナンバー・2

(72)発明者 グラニエ, セバスチアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロー・パーク、クレイン・ストリート・945、ユニット・エイ

(72)発明者 スナハラ, ロジヤー・ケイ

アメリカ合衆国、ミシガン・48104、アナーバー、オリビア・アベニュー・1130

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2010/043650 (WO, A1)

国際公開第2009/051633 (WO, A1)

国際公開第2012/007593 (WO, A1)

国際公開第2004/035614 (WO, A1)

Mol. Pharmacol., 2014, Vol. 85, pp. 472-481

Curr. Opin. Struc. Biol., 2011, Vol. 21, pp. 567-572

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90

C 0 7 K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS

(STN)
PubMed

专利名称(译)	针对GPCR产生的结合结构域：G蛋白复合物及其衍生的用途		
公开(公告)号	JP6164535B2	公开(公告)日	2017-07-19
申请号	JP2014516358	申请日	2012-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	色调过基础的电子色相超过Zetsu牵引器 穿插海胆贝尔DF要鱒Yutsu细胞 斯坦福大学 密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	FUE怡裴FUE-Zetsuto - 百汇 穿插-Uniberushiteito-Buriyutsuseru 易于受托人的利兰·斯坦福董事会，Jiyunia宇宙指定 密歇根大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	FUE怡裴FUE-Zetsuto - 百汇 穿插-Uniberushiteito-Buriyutsuseru 易于受托人的利兰·斯坦福董事会，Jiyunia宇宙指定 密歇根大学董事会		
[标]发明人	ステヤエルトヤン パルドンエルス レーレマンストーン コビルカブライアン ラスムセンセーレン グラニエセバスチャン スナハラロジャーケイ		
发明人	ステヤエルト,ヤン パルドン,エルス レーレマン,ストーン コビルカ,ブライアン ラスムセン,セーレン グラニエ,セバスチャン スナハラ,ロジャー・ケイ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4722 C07K14/70571 C07K16/28 C07K2317/22 C07K2317/569 C12N2799/026 G01N33/74 G01N2333/726 G01N2500/02 C07K14/435 C07K14/705		
FI分类号	C07K16/28 C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C G01N33/53.N		
优先权	61/571159 2011-06-21 US 2011181357 2011-09-15 EP		
其他公开文献	JP2014525735A5 JP2014525735A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及G蛋白偶联受体 (GPCR) 结构生物学和信号传导领域。特别地，本发明涉及针对和/或特异性结合GPCR：G蛋白复合物的结合结构域。还提供了编码此类结合结构域的核酸序列和表达或能够表达此类结合结构域的细胞。本发明的结合结构域可用作与下游异源三聚体G蛋白复合并与各种天然或合成配体结合的G蛋白偶联受体的结构和功能表征的通用工具，用于研究G蛋白活化的动态特征。，以及利用GPCR：G蛋白复合物的筛选和药物发现工作。

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int. Cl.			F 1		
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 27 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-516358 (P2014-516358)	(73) 特許権者	509333933
(86) (22) 出願日	平成24年6月21日 (2012.6.21)		フエー・イー・ペー・フエー・ゼット・ウ
(65) 公表番号	特表2014-525735 (P2014-525735A)		エー
(43) 公表日	平成26年10月2日 (2014.10.2)		ベルギー国、ペー－9 0 5 2 ・ヘント、レ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/062036		イフイセストラート・1 2 0
(87) 国際公開番号	W02012/175643	(73) 特許権者	509333922
(87) 国際公開日	平成24年12月27日 (2012.12.27)		フリエ・ユニベルシテイ・ブリュッセル
審査請求日	平成27年6月22日 (2015.6.22)		ベルギー国、ペー－1 0 5 0 ・ブリュッセル、
(31) 優先権主張番号	61/571,159		ブレインラ－ン・2
(32) 優先日	平成23年6月21日 (2011.6.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11181357.2		
(32) 優先日	平成23年9月15日 (2011.9.15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
前置審査		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 G P C R：Gタンパク質複合体に対して作製された結合ドメインおよびそれに由来する使用