

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-508875

(P2011-508875A)

(43) 公表日 平成23年3月17日(2011.3.17)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>G01N 33/50</b> (2006.01)	G01N 33/50	Z N A Z	2 G O 4 5
<b>G01N 33/53</b> (2006.01)	G01N 33/53	U	4 B O 6 4
<b>G01N 33/15</b> (2006.01)	G01N 33/15	Z	4 H O 4 5
<b>C40B 20/04</b> (2006.01)	C40B 20/04		
<b>G01N 33/543</b> (2006.01)	G01N 33/543	5 9 5	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 114 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-538902 (P2010-538902)	(71) 出願人	510172871 ヘプテアズ セラピューティクス リミテッド HEPTARES THE RAPÉUTIQUE LTD イギリス国 ハーフォードシャー エイエルフ 3エイエックス, ウェリンガーデンシティー, ブロードウォーターロード, バイオパーク (番地なし) BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX United Kingdom
(86) (22) 出願日	平成20年12月19日 (2008.12.19)		
(85) 翻訳文提出日	平成22年8月20日 (2010.8.20)		
(86) 國際出願番号	PCT/GB2008/004223		
(87) 國際公開番号	W02009/081136		
(87) 國際公開日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		
(31) 優先権主張番号	0724860.2		
(32) 優先日	平成19年12月20日 (2007.12.20)		
(33) 優先権主張國	英國 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】スクリーニング

## (57) 【要約】

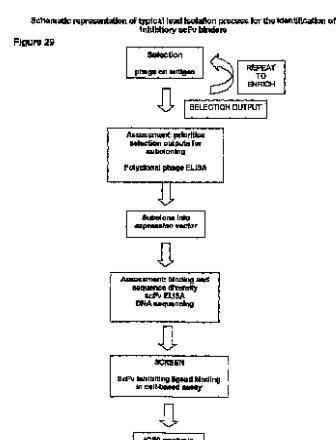
G P C R の立体構造特異的結合パートナーを生産する方法であって、

a ) 親G P C R と比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、該親G P C R のG P C R 変異体を提供する工程、

b ) 試験化合物を提供する工程、

c ) 前記試験化合物が、特定の立体構造を備える場合の前記G P C R 変異体に結合するか否かを測定する工程、及び

d ) 前記特定の立体構造を備える場合の前記G P C R 変異体に結合する試験化合物を単離する工程を含む方法。親G P C R と比較して増大した安定性を有するG P C R を生産する方法も開示される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

G P C R の結合パートナーを生産する方法であって、  
a ) 親 G P C R と比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、該親 G P C R の  
G P C R 変異体を提供する工程、  
b ) 1つ又は複数の試験化合物を提供する工程、  
c ) 前記試験化合物又はその各々が、特定の立体構造を備える場合の前記 G P C R 変異  
体に結合するか否かを測定する工程、及び  
d ) 前記特定の立体構造を備える場合の前記 G P C R 変異体に結合する1つ又は複数の  
試験化合物を単離する工程  
を含む方法。

**【請求項 2】**

e ) 前記試験化合物又はその各々が、前記特定の立体構造を備える場合の前記親 G P C  
R に結合するか否かを測定する工程、及び  
f ) 前記特定の立体構造にある場合の前記親 G P C R にも結合する前記試験化合物又は  
その各々を単離する工程  
をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 G P C R 変異体が固体支持体に固定化されている、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記支持体がビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートのいずれかである  
、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 G P C R 変異体が共有結合相互作用を介して支持体に固定化されている、請求項 3  
又は 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記支持体がポリマー支持体で被覆されている、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ポリマー支持体がカルボキシル化デキストランである、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 G P C R 変異体が非共有結合相互作用を介して支持体に固定化されている、請求項  
3 又は 4 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記支持体が、アビジン、ストレプトアビジン、金属イオン、親 G P C R に対する抗体  
、又は前記 G P C R 変異体に結合した分子タグに対する抗体のいずれかで被覆されている  
、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 G P C R 変異体が、C 末端又は細胞外ドメインが外側を向くように細胞内ドメイン  
を介して固定化されている、請求項 3 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 G P C R 変異体が、N 末端又は細胞内ドメインが外側を向くように細胞外ドメイン  
を介して固定化されている、請求項 3 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 G P C R 変異体が C 末端又は N 末端に分子タグを含む、請求項 1 から 11 のいずれ  
か一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記タグが、F L A G タグ、H i s タグ、c - M y c タグ、D D D D K タグ、H S V タ  
グ、H a l o タグ、又はビオチンタグのいずれかである、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記 G P C R 変異体が、全細胞製剤中又は細胞膜断片中に存在するか、界面活性剤に可

10

20

30

40

50

溶化されているか、脂質単層中、脂質二重層中、ビーズ結合脂質粒子中、固体支持脂質層中、又はプロテオリポソーム中に存在する、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記試験化合物が固体支持体に固定化されている、請求項1、2、12から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記固体支持体がビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートのいずれかである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記G P C R変異体及び前記試験化合物が固体支持体に固定化されていない、請求項1、2、12から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記試験化合物が、ポリペプチド；アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アブタマー；ダルピン；F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、s c F v若しくはd A b抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラトリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質(D A R P i n)を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質；又はリポカリン若しくはフィプロネクチンドメイン又はヒトクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質のいずれかである、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記試験化合物が生物学的試料として提供される、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記試料が血液、血清、血漿、脊髄液、組織抽出物又は細胞抽出物のいずれかである、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記試験化合物が、試験化合物のライブラリーである、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記ライブラリーが、ペプチドライブラリー、タンパク質ライブラリー、抗体ライブラリー、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、又はs c F v若しくはF a bファージディスプレイライブラリーのいずれかである、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記試験化合物が、ペプチドタグ、核酸タグ、化学物質タグ、蛍光タグ又はR Fタグのいずれかで標識されている、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記抗体が、親G P C RのG P C R変異体に対する抗体であり、前記G P C R変異体が前記親G P C Rと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、請求項18に記載の方法。

【請求項25】

前記抗体が、リンパ球を前記G P C R変異体の免疫原で免疫することによって作製される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記リンパ球がインビボで免疫される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記リンパ球がインビトロで免疫される、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

10

20

30

40

50

前記 G P C R 変異体の免疫原が、前記 G P C R 変異体の全部、その断片又はその融合タンパク質である、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

G P C R 変異体の免疫原が、全細胞製剤中若しくは細胞膜断片中で提供されるか、界面活性剤に可溶化されているか、脂質単層中、脂質二重層中、ビーズ結合脂質粒子中、固体支持脂質層中、又はプロテオリポソーム中で提供される、請求項 24 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記免疫原がアジュバントと共に提供される、請求項 24 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記アジュバントが T i t r e m a x 又は R i b i アジュバント乳剤である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

特定の立体構造を備える場合の G P C R 変異体に結合する前記単離試験化合物を修飾する工程、及び前記修飾した試験化合物が特定の立体構造を備える場合の前記 G P C R 変異体に結合するか否かを測定する工程をさらに含む、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記修飾試験化合物が、前記特定の立体構造を備える場合の前記親 G P C R に結合するか否かを測定する工程をさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 34】

複数の G P C R 変異体が工程 (a) で提供され、前記試験化合物が特定の立体構造を備える場合の各々の G P C R 変異体に結合するか否かを測定し、前記特定の立体構造を備える場合の各々の G P C R 変異体に結合する試験化合物を単離する、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 35】

第一の親 G P C R の G P C R 変異体及び第二の親 G P C R の G P C R 変異体が工程 (a) で提供され、前記試験化合物が特定の立体構造を備える場合の各々の G P C R 変異体に結合するか否かを測定し、前記特定の立体構造を備える場合の各々の G P C R 変異体に結合する試験化合物を単離する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

複数の G P C R 変異体が工程 (a) で提供され、第一の G P C R 変異体に結合するが、少なくとも 1 つの他の G P C R 変異体には結合しない又は前記第一の G P C R 変異体に対するよりも弱く結合する試験化合物を選択する、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 37】

請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載の方法であって、

(i) 前記単離試験化合物が、それが結合する前記 G P C R の機能に影響を及ぼすか否かを測定する工程、及び (ii) それが結合する前記 G P C R の機能に影響を及ぼす試験化合物を単離する工程、をさらに含む方法。

【請求項 38】

工程 (i) において、前記単離試験化合物が、その天然リガンド又はその類似体への前記 G P C R の結合に影響を及ぼすか否かを測定する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

工程 (ii) において、前記 G P C R とその天然リガンド又はその類似体の間の結合を低下させる試験化合物を単離する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

工程 (ii) において、前記 G P C R とその天然リガンド又はその類似体の間の結合を上昇させる試験化合物を単離する、請求項 38 に記載の方法。

50

**【請求項 4 1】**

工程 ( i ) において、前記単離試験化合物が、それが結合する前記 G P C R の活性化を調節するか否かを測定する、請求項 3 7 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

工程 ( i i ) において、カルシウム可動化、cAMP レベル、キナーゼ経路の活性、試験化合物が結合する G P C R の制御下でのレポーター遺伝子からの遺伝子転写、-アレスチンのリクルートメント、G タンパク質の活性化、GTP アーゼ活性又は [ 35S ] GTP-S 結合のいずれかを調節する試験化合物を選択する、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

工程 ( i i ) において、それが結合する前記 G P C R の活性化を上昇させるアゴニスト試験化合物を単離する、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の方法。 10

**【請求項 4 4】**

工程 ( i i ) において、それが結合する前記 G P C R の活性化を低下させるアンタゴニスト試験化合物を単離する、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 5】**

請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、G P C R 変異体が、  
( a ) 親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程、  
( b ) 前記 G P C R が特定の立体構造を備える場合に前記親 G P C R に結合するリガンドを選択する工程、  
( c ) 前記 G P C R 変異体又はその各々が、前記選択したリガンドへの結合に関して、そのリガンドへの結合に関する前記親 G P C R の安定性と比較して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び 20  
( d ) 前記選択したリガンドへの結合に関して前記親 G P C R と比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程

によって提供される方法。

**【請求項 4 6】**

工程 ( c ) の前に、前記 1 つ又は複数の変異体を前記選択したリガンドと接触させる、請求項 4 5 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記 1 つ又は複数の変異体が可溶化形態で提供される、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の方法。 30

**【請求項 4 8】**

請求項 4 5 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法であって、工程 ( c ) において前記 G P C R が備える前記特定の立体構造が、工程 ( b ) で選択したリガンドのクラスに対応する方法。

**【請求項 4 9】**

前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択したリガンドがアンタゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアンタゴニスト立体構造である、請求項 4 8 に記載の方法。 40

**【請求項 5 0】**

前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ、工程 ( c ) において前記 G P C R が備える前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造である、請求項 4 9 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記選択したリガンドに対する前記変異体の結合親和性が、前記選択したリガンドに対する前記親の結合親和性と実質的に同一であるか又はそれよりも大きい、請求項 4 5 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記方法が 1 回又は複数回反復され、工程 ( a ) において増大した安定性を有する前記 50

選択した変異体が前記方法のその後の回における前記親 GPCR となる、請求項 4 5 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

熱、界面活性剤、カオトロピック剤、及び極端な pH のいずれか 1 つ又は複数に対して増大した安定性を有する GPCR 変異体を選択する、請求項 4 5 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

増大した熱安定性を有する GPCR 変異体を選択する、請求項 5 3 に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記リガンドが、完全アゴニスト、部分的アゴニスト、逆アゴニスト、アンタゴニストのいずれか 1 つである、請求項 4 5 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。 10

**【請求項 5 6】**

前記リガンドが前記 GPCR に結合するポリペプチドである、請求項 4 5 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 7】**

前記ポリペプチドが、抗体、アンキリン、Gタンパク質、RGSタンパク質、アレスチン、GPCR キナーゼ、受容体チロシンキナーゼ、RAMP、NSF、GPCR、NMDA 受容体サブユニット N R 1 若しくは N R 2 a、又はカルシオン、フィブロネクチンドメインフレームワーク、又は前記 GPCR に結合するその断片若しくは誘導体のいずれかである、請求項 5 6 に記載の方法。 20

**【請求項 5 8】**

工程 (b) において 2 又はそれ以上のリガンドが選択され、各々の存在が前記 GPCR に同じ特定の立体構造を備えさせる、請求項 4 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 9】**

親と比較して、工程 (b) で選択した前記リガンドとは異なるクラスのリガンドに結合する低下した能力を有する GPCR 変異体を選択する、請求項 4 5 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 0】**

前記 GPCR が、 - アドレナリン受容体、アデノシン受容体及びニューロテンシン受容体のいずれか 1 つである、請求項 4 5 から 5 9 のいずれか一項に記載の方法。 30

**【請求項 6 1】**

請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、前記 GPCR 変異体が、  
 (a) 請求項 4 5 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法を実施する工程、  
 (b) 増大した安定性に関して選択した前記 1 つ又は複数の GPCR 変異体における 1  
 つ又は複数の変異したアミノ酸残基の位置を同定する工程、及び  
 (c) 前記同定した位置の 1 つ又は複数におけるアミノ酸の置き換えを含む GPCR 変  
 異体を合成する工程  
 によって提供される方法。

**【請求項 6 2】**

前記 GPCR 変異体が親 GPCR と比較して複数の変異を含む、請求項 6 1 に記載の方  
 法。 40

**【請求項 6 3】**

請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、前記 GPCR 変異体が、  
 (i) 第一の親 GPCR と比較して増大した安定性を有する第一の親 GPCR の 1 つ又  
 は複数の変異体のアミノ酸配列において、1 つ又は複数の変異体が前記第一の親 GPCR  
 と比較して少なくとも 1 つの異なるアミノ酸残基を有する 1 つ又は複数の位置を同定する  
 工程、及び  
 (ii) 対応する 1 つ又は複数の位置で、第二の GPCR を規定するアミノ酸配列内に  
 1 つ又は複数の変異を作製して、第二の親 GPCR と比較して増大した安定性を有する第  
 二の親 GPCR の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程 50

によって提供される方法。

【請求項 6 4】

第一の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体が、請求項 4 5 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法にしたがって提供される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記第二の G P C R が、前記第一の親 G P C R と同じ G P C R クラス又はファミリーのものである、請求項 6 3 又は 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第二の G P C R が、前記第一の親 G P C R と少なくとも 20 % の配列同一性を有する G P C R である、請求項 6 3 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 7】

親 G P C R と比較して増大した安定性を有する G P C R 変異体を生産する、請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

( i ) 第一の親 G P C R と比較して増大した安定性を有する第一の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程、

( i i ) 膜タンパク質構造モデルにおいて、1 つ又は複数の変異体が前記第一の親 G P C R と比較して少なくとも 1 つの異なるアミノ酸残基を有する 1 つ又は複数の構造モチーフを同定する工程、及び

( i i i ) 第二の親 G P C R において対応する 1 つ又は複数の構造モチーフを規定するアミノ酸配列内に 1 つ又は複数の変異を作製して、前記第二の親 G P C R と比較して増大した安定性を有する第二の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程を含む方法。

20

【請求項 6 8】

前記膜タンパク質構造モデルが内在性膜タンパク質のモデルである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記内在性膜タンパク質が、工程 ( i ) の前記第一の親 G P C R の変異体が前記第一の親 G P C R と比較して少なくとも 1 つの異なる前記変異体中のアミノ酸を有するタンパク質ドメインにわたって、前記第一の親 G P C R の変異体と少なくとも 20 % の配列同一性を有する、請求項 6 7 又は 6 8 に記載の方法。

30

【請求項 7 0】

前記内在性膜タンパク質が G P C R である、請求項 6 8 又は 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 G P C R が、前記第一の親 G P C R と同じ G P C R クラス又はファミリーのものである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記膜タンパク質構造モデルが、ヒト <sub>2</sub> アドレナリン受容体又はウシロドプシンのモデルである、請求項 6 7 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記構造モチーフが、ヘリックス界面、ヘリックスの折れ曲がり（キンク）、ヘリックスの折れ曲がり（キンク）の反対側のヘリックス、脂質二重層に向いたヘリックス表面、疎水性 - 親水性境界層の脂質二重層に向いたヘリックス表面、ループ領域、又はタンパク質結合ポケットのいずれかである、請求項 6 7 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

前記第二の親 G P C R が前記第一の親 G P C R である、請求項 6 7 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記第二の親 G P C R が前記第一の親 G P C R ではない、請求項 6 7 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

50

前記第二の親 G P C R が、前記第一の親 G P C R と少なくとも 20 % の配列同一性を有する G P C R である、請求項 74 又は 75 に記載の方法。

**【請求項 77】**

前記第二の G P C R が、前記第一の親 G P C R と同じ G P C R クラス又はファミリーのものである、請求項 74 から 76 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 78】**

請求項 63 から 77 のいずれか一項に記載の方法であって、

(I) 前記第二の親 G P C R が特定の立体構造を備える場合に前記第二の親 G P C R に結合するリガンドを選択する工程、

(II) 特定の立体構造を備える場合の前記第二の親 G P C R の前記変異体又はその各々が、前記選択したリガンドへの結合に関して同じ特定の立体構造を備える場合の前記第二の親 G P C R の安定性と比較して、そのリガンドへの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び

(III) 前記選択したリガンドへの結合に関して、前記第二の親 G P C R と比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程  
をさらに含む方法。

**【請求項 79】**

工程 (II) において前記 G P C R が備える前記特定の立体構造が、工程 (I) で選択したリガンドのクラスに対応する、請求項 78 に記載の方法。

**【請求項 80】**

前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択したリガンドがアンタゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアンタゴニスト立体構造である、請求項 79 に記載の方法。

**【請求項 81】**

前記リガンドが請求項 55 から 57 のいずれか一項で規定されるものである、請求項 78 から 80 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 82】**

前記第二の G P C R の 1 つ又は複数の変異体の結合親和性が、前記選択したリガンドについての前記第二の親 G P C R の結合親和性と実質的に同一であるか又はそれ以上である、請求項 78 から 81 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 83】**

工程 (a) で提供される G P C R 変異体が、 - アドレナリン受容体、アデノシン受容体、ニューロテンシン受容体又はムスカリン受容体のいずれか 1 つである、請求項 1 から 82 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 84】**

工程 (a) で提供される前記 G P C R 変異体が、その親受容体と比較して、以下の位置 : (i) 図 9 に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けによる : Ile 55 , Gly 67 , Arg 68 , Val 89 , Met 90 , Gly 98 , Ile 129 , Ser 151 , Val 160 , Gln 194 , Gly 197 , Leu 221 , Tyr 227 , Arg 229 , Val 230 , Ala 234 , Ala 282 , Asp 322 , Phe 327 , Ala 334 , Phe 338 、(ii) 図 10 に記載のヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体の番号付けによる : Gly 114 , Gly 118 , Leu 167 , Ala 184 , Arg 199 , Ala 203 , Leu 208 , Gln 210 , Ser 213 , Glu 219 , Arg 220 , Ser 223 , Thr 224 , Gln 226 , Lys 227 , His 230 , Leu 241 , Pro 260 , Ser 263 , Leu 267 , Leu 272 , Thr 279 , Asn 284 , Gln 311 , Pro 313 , Lys 315 、(iii) 図 11 に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる : Ala 69 , Leu 72 , Ala 73 , Ala 86 , Ala 90 , Ser 100 , His 40

50

s 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile  
e 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Val  
l 165, Glu 166, Lys 176, Ala 177, Thr 179, Met  
t 181, Ser 182, Arg 183, Phe 189, Leu 205, Th  
r 207, Gly 209, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile  
e 253, Leu 256, Ile 260, Asn 262, Val 268, As  
n 270, Thr 279, Met 293, Thr 294, Gly 306, Le  
u 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, As  
p 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Val  
l 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Al  
a 385, Cys 386, Pro 389, Gly 390, Trp 391, Ar  
g 392, His 393, Arg 395, Lys 397, Pro 399、及び  
(iv) 図17に記載のムスカリン受容体の番号付けによる: Leu 65、Met 1  
45、Leu 399、Ile 383及びMet 384の任意の1つ又は複数に対応する位置に少なくとも1つの異なるアミノ酸を有する、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項85】

工程(a)で提供されるGPCR変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図9に記載のシチメンチョウ-アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338. の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する-アドレナリン受容体変異体である、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項86】

前記-アドレナリン受容体変異体が、図9に記載のシチメンチョウ-アドレナリン受容体の配列と少なくとも20%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項86に記載の方法。

30

## 【請求項87】

工程(a)で提供される前記GPCR変異体が-アドレナリン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図9に記載のシチメンチョウ-アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338. のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項88】

工程(a)で提供される前記GPCR変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体の番号付けによる以下の位置: Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315. の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するアデノシン受容体変異体である、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項89】

前記アデノシン受容体変異体が、図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体の配列と少なくとも20%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項88に記載の方法。

#### 【請求項90】

工程(a)で提供される前記GPCR変異体がアデノシン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体の番号付けによる以下の位置：Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Glu 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Glu 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Glu 311, Pro 313, Lys 315.のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。  
10

#### 【請求項91】

工程(a)で提供される前記GPCR変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置：Ala 69, Leu 72, Ala 73, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Val 165, Glu 166, Lys 176, Ala 177, Thr 179, Met 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Leu 256, Ile 260, Asn 262, Val 268, Asn 270, Thr 279, Met 293, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Asp 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Val 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Cys 386, Pro 389, Gly 390, Trp 391, Arg 392, His 393, Arg 395, Lys 397, Pro 399.の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するニューロテンシン受容体変異体である、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。  
30

#### 【請求項92】

前記ニューロテンシン受容体変異体が、図11に記載のラットニューロテンシン受容体の配列と少なくとも20%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項91に記載の方法。

#### 【請求項93】

工程(a)で提供される前記GPCR変異体がニューロテンシン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置：Ala 69, Leu 72, Ala 73, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Val 165, Glu 166, Lys 176, Ala 177, Thr 179, Met 181, Ser 182, Arg 183, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Leu 256, Ile 260, Asn 262, Val 268, Asn 270, Thr 279, Met 293, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Asp 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Val 360, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Cys 386, Pro 389, Gly 390, Trp 391, Arg 392, His 393, Arg 395, Lys 397, Pro 399.の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するニューロテンシン受容体変異体である、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。  
40

#### 【請求項94】

395, Lys 397, Pro 399. のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項1から82のいずれか一項に記載のGPCR変異体。

**【請求項94】**

工程(a)で提供される前記GPCR変異体が、対応する野生型ムスカリン受容体と比較した場合、図17に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置：Leu 65, Met 145, Leu 399, Ile 383及びMet 384の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するムスカリン受容体変異体である、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項95】**

前記ムスカリン受容体変異体が、図17に記載のラットニューロテンシン受容体の配列と少なくとも20%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項94に記載の方法。

**【請求項96】**

工程(a)で提供される前記GPCR変異体がムスカリン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図17に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置：Leu 65, Met 145, Leu 399, Ile 383及びMet 384のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項1から82のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項97】**

GPCRの結合パートナーを生産する方法であって、請求項1から96のいずれか一項に記載の方法を実施することによって同定可能な結合パートナーを合成する工程を含む方法。

**【請求項98】**

請求項1から97に記載の方法のいずれかによって得られる結合パートナー。

**【請求項99】**

前記結合パートナーが立体構造特異的である、請求項98に記載の結合パートナー。

**【請求項100】**

前記結合パートナーが、ポリペプチド；アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アプタマー；ダルピン；Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv若しくはdAb抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質(DARPin)を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質；又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質のいずれかである、請求項98又は99に記載の結合パートナー。

**【請求項101】**

前記結合パートナーが抗体である、請求項100に記載の結合パートナー。

**【請求項102】**

前記結合パートナーに対する前記GPCR変異体の結合親和性が、前記結合パートナーに対する前記親GPCRの結合親和性と実質的に同一であるか又はそれよりも大きい、請求項98から101のいずれか一項に記載の結合パートナー。

**【請求項103】**

親GPCRのGPCR変異体を含むバイオセンサーであって、前記GPCR変異体が親GPCRと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有し、且つ、標的物質が前記GPCR変異体に結合した際に検出可能なシグナルが生成される、バイオセンサー。

**【請求項104】**

前記GPCR変異体が、請求項45から82のいずれか一項で規定されるように提供される、請求項103に記載のバイオセンサー。

10

20

30

40

50

**【請求項 105】**

前記 GPCR 変異体が、請求項 83 から 96 のいずれか一項で規定されるものである、請求項 103 又は 104 に記載のバイオセンサー。

**【請求項 106】**

前記検出可能なシグナルが、色の変化；蛍光；エバネッセンス；表面プラズモン共鳴；電気伝導度若しくは電荷分離；紫外、可視若しくは赤外吸収；発光；化学発光；電気化学発光；蛍光異方性；蛍光強度；蛍光寿命；蛍光偏光；蛍光エネルギー移動；分子量；電子スピン共鳴；核磁気共鳴；流体力学的容積若しくは半径；比重；シンチレーション；電界効果抵抗；電気インピーダンス；音響インピーダンス；量子消失；共鳴散乱；蛍光クエンチング；蛍光相關分光法；音響負荷；音響せん断波速度；結合力；又は界面応力のいずれかである、請求項 103 から 105 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。10

**【請求項 107】**

前記バイオセンサーが、水晶膜厚計バイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、プレーナー導波路バイオセンサー、表面ラマンセンサー、又は表面プラズモン共鳴バイオセンサーなどのフローベースのバイオセンサーである、請求項 103 から 106 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

**【請求項 108】**

前記標的物質が、分子、生体分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、GPCR リガンド、合成分子、薬剤、薬剤代謝産物又は疾患バイオマーカーのいずれかである、請求項 103 から 107 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。20

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の結合パートナーのスクリーニング、特に GPCR の立体構造特異的な結合パートナーに関する。

**【背景技術】****【0002】**

本明細書に記載の明らかに過去に公開された文献の記載又は議論は、必ずしも、その文献が従来技術の一部であるか又は一般的な技術常識であると認めるものと解されるべきではない。30

**【0003】**

GPCR は、多数の生理プロセスを調節する非常に大きなタンパク質ファミリーを構成し、多数の効果的な薬剤の標的である。かくして、それらは、非常に薬理学的に重要なものである。GPCR の一覧は、参照によって本明細書に取り込む Foord et al (2005) Pharmacol Rev. 57, 279-288 に挙げられている。GPCR は一般的には単離した際に不安定であり、多大の努力が為されたにもかかわらず、例外的に天然に安定であるウシロドブシン、及び融合タンパク質として又は抗体断片との複合体として結晶化された 2 アドレナリン受容体だけが結晶化可能であった。

**【0004】**

GPCR は新薬の開発につながるような標的であり、現在の薬剤の四分の一超が GPCR を標的とすることを示す Overington et al (2006) Nature Rev. Drug Discovery 5, 993-996 が特に参考される。40

**【0005】**

GPCR は、アゴニスト及びアンタゴニストなどの各種の薬理学的な種類のリガンドと結合する多数の異なる立体構造で存在し、機能するためにこれらの立体構造の間で循環すると解されている (Kenakin T. (1997) Ann N Y Acad Sci 812, 116-125)。立体構造の間での切り替えが受容体の結晶構造を得ることの困難さに寄与する。

**【0006】**

GPCR に対する立体構造特異的結合パートナーの作製はいくつかの因子によって妨げられる。例えば、GPCR は一般的にそれらの天然の膜環境から切り離した際に乏しい安50

定性を有し、それらが即時に変性又は沈殿せずに試験することが可能な条件の範囲を厳しく制限する。精製 G P C R をそれらの天然立体構造で生産できないことは、精製受容体の使用に依存する広い範囲のスクリーニングパラダイムにおけるそれらの使用を妨げる。故に、G P C R スクリーニングは伝統的に、受容体が細胞膜又は全細胞中に存在するアッセイに依存してきた。

#### 【0007】

多くの G P C R は、抗体などのバイオセラピューティックによって利用され得る重要な治療標的である。G P C R に対する治療用抗体の作製は、一部には適切な免疫原の欠如の故に極めて困難であった。通常の経路は、受容体の小さなペプチド断片を免疫のために採取することであるが、これらはその天然の立体構造を保持せず、多くの場合に、受容体に結合して受容体を標識することは可能であるが、機能的なアゴニスト又はアンタゴニスト活性を有さない、結合パートナーを生じさせる。G P C R の特有の物理的立体構造の故に、抗体などのバイオセラピューティックは、ペプチド断片が単離において使用された際に失われる特徴である、ポリペプチド「ループ」の組み合わせを認識することも知られている。G P C R の局所的な膜環境がタンパク質の三次構造を維持し、いずれのエピトープが細胞外表面に存在するかを支配することはよく知られている。これらのエピトープは、理論的にはバイオセラピューティックによって認識されることが可能であるが、標的 G P C R を含む膜又は膜断片に対する抗体などのバイオセラピューティックを産生することは簡単ではなく、というのはこれらの製剤は不可避的に、他の非標的 G P C R 及び膜結合タンパク質、並びにバイオセラピューティックの選択及び生産工程において望ましくない抗原として作用し得るリボタンパク質、アポリボタンパク質、脂質、ホスホインソシトール脂質及びリボ多糖類などの他の膜成分を含むからである。

10

20

30

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明者らは、特に生物学的に有意義な形態で G P C R を安定化するための方法を開発した。その様な受容体は、免疫原として及び / 又は結合パートナーの作製のための選択及びスクリーニング試薬として多くの利点を有する。特に、それらは、多くの場合機能的特性を有し、これまで作製が非常に困難であることが証明されてきた立体構造特異的な結合パートナーの作製のために有用である。

#### 【0009】

例えば、発現、可溶化及び精製工程を通じて天然の正しく折りたたまれた受容体の安定性は、精製 G P C R の高い収率（実験室規模の細胞培養からのミリグラム量）を促進する。さらに、機能の変化を伴わない、一連の界面活性剤及び可溶化緩衝剤及び添加剤中の折りたたまれたタンパク質の安定性は、免疫のため、変性を伴わない固体表面への固定化（例えば、プラスチックプレート、樹脂、ビーズ若しくはスライドガラスに直接若しくはポリヒスチジンタグなどの親和性タグを介して）のため、抗体の作製及びスクリーニングのため、又はライブラリーのスクリーニングのため（アフィボディ、抗体、ファージ若しくは低分子ライブラリーなど）の条件の最適化を可能にする。ライブラリーのスクリーニングに関しては、膜性物質及び細胞表面の「付着性抗原（*s t i c k y a n t i g e n s*）」の除去によって非特異的結合を低減することにより、シグナル / ノイズ比の大きな改善が得られる。高度に極性の又は荷電した頭部基を有する短鎖の界面活性剤（ラウリルジメチルアミン - オキシド、オクチルド - ゲルコシド又はオクチルド - マルトシドなど）を使用することも可能になり、それにより、n - ドデシル - D - マルトシドなどのより長鎖の界面活性剤によって隠されている G P C R のより大きな割合の抗原性表面が明らかにされる（Bamber et al. PNAS 103 (2006) 16224 - 16229）。受容体の特定の機能的立体構造を捕捉することも、立体構造特異的な機能的結合パートナーを作製する可能性を高める。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

50

したがって、本発明の第一の態様は、G P C R の結合パートナーを生産する方法であつて、

- a ) 親 G P C R と比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する、該親 G P C R の G P C R 変異体を提供する工程、
  - b ) 1 つ又は複数の試験化合物を提供する工程、
  - c ) 前記 1 つ又は複数の試験化合物の各々が、特定の立体構造を備えた前記 G P C R 変異体に結合するか否かを測定する工程、及び
  - d ) 前記特定の立体構造を備えた前記 G P C R 変異体に結合する試験化合物を単離する工程
- を含む方法を提供する。

10

#### 【 0 0 1 1 】

「結合パートナー」によって、本願では、特定 G P C R に結合する分子が意味される。好ましくは、前記分子は G P C R に選択的に結合する。例えば、前記結合パートナーは、少なくとも 1 つの他の G P C R に対するよりも少なくとも 5 倍又は 10 倍低い（すなわち、より高い親和性）、好ましくは 100 倍又は 500 倍以上低い  $K_d$  値（解離定数）を有することが好ましい。より好ましくは、G P C R の結合パートナーは少なくとも 1 つの他の G P C R に対するよりも 1000 倍又は 5000 倍以上低い  $K_d$  値を有する。しかしながら、限界値は結合パートナーの性質に依存して変化すると解されるであろう。かくして、典型的には、低分子結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には少なくとも 1 つの他の G P C R に対するよりも少なくとも 50 倍又は 100 倍低い  $K_d$  値を有する。典型的には、抗体結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には少なくとも 1 つの他の G P C R に対するよりも少なくとも 500 倍又は 1000 倍低い  $K_d$  値を有する。

20

#### 【 0 0 1 2 】

特定の立体構造に捕捉された安定化 G P C R の使用により、立体構造特異的結合パートナーが生産される可能性が増大する。したがって、当該方法は G P C R の立体構造特異的結合パートナーを生産するために使用してよいと解される。かくして、前記方法は、G P C R が安定化された立体構造によって決定されるアゴニスト又はアンタゴニスト（又は他の薬理学的分類）などの機能的活性を有する結合パートナーを同定するためにも使用してよい。

30

#### 【 0 0 1 3 】

「立体構造特異的」によって、本願では、G P C R の結合パートナーが G P C R の特定構造に選択的に結合し、したがって、同じ G P C R の他の立体構造についての  $K_d$  値よりも低いその立体構造についての  $K_d$  値を有することが意味される。かくして、立体構造特異的結合パートナーは、G P C R の 1 つの立体構造に結合する（そして G P C R にこの立体構造を採用させ得る）が、G P C R が採用することが可能な他の立体構造に対しては強く結合しない。したがって、2 つの立体構造と立体構造特異的結合パートナーの間の親和性の差は小さくてもよいが、典型的には、立体構造状態の間の平衡を変化させ、G P C R が特定の立体構造をとることを促進するのに十分であると解されるであろう。かくして、立体構造特異的結合パートナーは、G P C R を生物学的に有意義な立体構造（例えば、リガンド結合状態）に捕捉するものであると解されてよい。典型的には、立体構造特異的結合パートナーは、G P C R 立体構造の少なくとも 1 つの他の立体構造に対するよりも少なくとも 5 倍又は 10 倍低い（すなわち、より高い親和性）、好ましくは 100 から 1000 倍低い  $K_d$  値（解離定数）を有する。

40

#### 【 0 0 1 4 】

典型的には、立体構造特異的結合パートナーは、m M から p M 又は m M から f M、例えば  $\mu$  M から n M の範囲又は n M から p M の範囲の  $K_d$  で G P C R に結合する。

#### 【 0 0 1 5 】

$K_d$  値は、当該技術分野でよく知られた方法を用いて及び、例えば以下に記載するように、容易に測定することが可能である。 平衡時の  $K_d = [R][L] / [RL]$

50

[式中、角括弧内の用語は、

- ・受容体 - リガンド複合体 [ R L ]
- ・未結合受容体 [ R ]、及び
- ・未結合（「遊離」）リガンド [ L ]

の濃度を表す]。

#### 【0016】

$K_d$  を測定するためにはこれらの用語の値が既知でなければならない。受容体の濃度は通常既知ではないので、その場合は Hill - Langmuir の式：

$$\text{部分占有率} = [L] / [L] + K_d$$

が使用される。

10

#### 【0017】

実験的に  $K_d$  を測定するためには、平衡時の遊離リガンドと結合リガンドの濃度が既知でなければならない。典型的には、これは、放射標識又は蛍光標識リガンドを使用して、それを平衡に達するまで受容体（全細胞中又はホモジナイズされた膜中に存在する）と共にインキュベートすることによって実施されてよい。結合リガンドと遊離リガンドからのシグナルを分離することによって遊離リガンドと結合リガンドの量が測定できなければならない。放射性リガンドの場合、これは、溶液中の遊離リガンドから全細胞又は膜上に存在する結合リガンドを分離するための遠心分離又はろ過によって実施されてよい。代替的には、シンチレーション近接アッセイが使用される。このアッセイでは、受容体（膜中の）はシンチラントを含むビーズに結合されており、ビーズに固定化された受容体に結合した放射性リガンドが近接することによってのみシグナルが検出される。

20

#### 【0018】

親和性定数も機能的アッセイ ( $K_B$ ) において測定してよい。この場合、全細胞中又は膜中の受容体は、アゴニストリガンド及び測定される応答（例えば、細胞内カルシウムの可動化、Gタンパク質の活性化、アデニル酸シクリーゼ若しくはcAMPの増加若しくは減少、MAP - キナーゼ経路などのシグナル伝達経路の活性化又は遺伝子転写の活性化）によって活性化される。アゴニスト活性を阻害するアンタゴニストの能力を測定してもよく、競争的アンタゴニストに関しては、この能力は親和性定数に等しい。

#### 【0019】

一連の洗浄剤、界面活性剤及び可溶化剤緩衝液中のGPCR変異体の安定性は、それらの通常の膜環境の外でそれらを精製することを可能にする。したがって、GPCRは、非標的GPCRなどの望ましくない抗原、膜結合タンパク質、並びにリポタンパク質、アポリポタンパク質、脂質、ホスホイノシトール脂質及びリポ多糖類などの他の膜成分から取り出された単離形態で提供されてよい。かくして、本発明の方法は、その様な望ましくない抗原の非存在下でGPCRの結合パートナーを選択することを可能にする。かくして本発明は、他の膜成分に比べてGPCRに対して高い選択性を有する結合パートナーを生産する。

30

#### 【0020】

特定の立体構造における安定性を付与する親GPCRの変異は、特定の立体構造を備える親GPCRの特定結合パートナーへの結合には影響を及ぼさないと予想される。しかしながら、一度結合パートナーが、特定の立体構造を備えるGPCR変異体への結合を評価することによって単離されれば、同じ特定の立体構造を備える親GPCRへのその結合パートナーの結合も評価されてよいと解される。

40

#### 【0021】

かくして、1つの実施態様では本発明の方法は、

(e) 各々の試験化合物が前記特定立体構造を備える場合の親GPCRに結合するか否かを測定する工程、及び

(f) 前記特定立体構造を備える場合の親GPCRにも結合する前記試験化合物を単離する工程

をさらに含む。

50

## 【0022】

典型的には、前記選択した結合パートナーは、同じ特定の立体構造を備える場合の親GPCRに対する結合と同様の作用強度で特定の立体構造を備える場合のGPCR変異体に結合する。典型的には、GPCR変異体と親GPCRに結合する特定の結合パートナーについての $K_d$ 値は、互いに5から10倍以内、例えば2から3倍以内である。典型的には、親GPCRと比較してGPCR変異体に対する結合パートナーの結合は、最大で5倍弱く、最大で10倍強いであろう。

## 【0023】

典型的には、前記選択した結合パートナーは、同じ立体構造を備える場合の親受容体とほぼ等しい親和性（すなわち、典型的には2から3倍以内）又はより高い親和性でGPCR変異体に結合する。アゴニスト立体構造変異体に関しては、当該変異体は、典型的には親GPCRと同じか又はより高い親和性でアゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合し、典型的には親GPCRと同じか又はより低い親和性でアンタゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合する。アンタゴニスト立体構造変異体についても同様に、当該変異体は、典型的には親GPCRと同じか又はより高い親和性でアンタゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合し、典型的には親GPCRと同じか又はより低い親和性でアゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合する。

10

## 【0024】

GPCRの特定の立体構造に対する又は特定のGPCRに対する結合パートナーの選択性及び $K_d$ の計算は、当該技術分野でよく知られた結合アッセイを用いて及び、例えば、以下に記載するように決定してよい。典型的には、 $K_d$ 値は、各種の化合物濃度での結合親和性を測定する、膜における従来のGPCRアッセイを使用して計算される。適切なアッセイの例は、表面プラズモン共鳴アッセイ、及び当該技術分野でよく知られており、以下に記載する競合アッセイを含む。

20

## 【0025】

典型的には、本態様において使用するGPCR変異体は、以下に記載する方法のいずれかを使用して選択され、調製される。

## 【0026】

## 親GPCRのGPCR変異体を提供する工程

30

親GPCRと比較して増大した安定性を有するGPCR変異体は、以下に記載する方法によって、並びにPCT出願WO 2008/114020号及びPCT/GB2008/004032号に開示されている方法の任意のものによって提供されてよい。

## 【0027】

## 方法1

増大した安定性を有するGタンパク質共役型受容体(GPCR)変異体を選択するための方法は、

40

(a) 親GPCRの1つ又は複数の変異体を提供する工程、  
(b) 親GPCRが特定の立体構造を備えている際に前記GPCRに結合するリガンドを選択する工程、

(c) 前記選択したリガンドの結合に関する親GPCRの安定性と比較して、前記GPCR変異体又はその各々が前記リガンド結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、並びに

(d) 前記選択したリガンドの結合に関して、親GPCRと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程を含む。

## 【0028】

本発明者は、生物学的に有意義な形態（すなわち、薬理学的に有用な形態）におけるG

50

P C R の結晶化可能性を改善するために、前記タンパク質の安定性を増大するだけではなく、前記タンパク質が特定の立体構造にある際に増大した安定性を有することが望ましいと解している。前記立体構造は、選択したリガンドによって決定され、生物学的に有意義な立体構造、特に薬理学的に有意義な立体構造である。かくして、前記選択方法は、特定の立体構造の増大した安定性を有する G P C R の変異体を選択するための方法であると解されてよく、例えば、それらは増大した熱安定性の立体構造を有してもよい。前記方法を使用して、安定な立体構造が固定された G P C R を変異誘発によって作製してよい。選択された G P C R 変異体は、より高い割合のものが特定の立体構造の状態である点で、親分子よりも純度が高い形態である。したがって、この立体構造に選択的に結合する 1 つ又は複数のリガンドを使用することによって他の立体構造から分離される当該受容体立体構造の慎重な選択は、前記選択方法の重要な特徴である。前記方法は、より結晶化に供しやすい G P C R 変異体を選択するための方法であると解されてもよい。これは、分子の集団内での低い均一性又は高い多面作用が結晶化にとって好ましくなく、さらに、特定分子の立体構造の数が多いことも結晶化には不利に働くことがよく知られているからである。

10

## 【 0 0 2 9 】

かくして、増大した安定性を有する G タンパク質共役型受容体 ( G P C R ) 変異体を選択するための更なる方法は、

- ( a ) 親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程、
  - ( b ) 親 G P C R が特定の立体構造を備えている際に前記 G P C R に結合するリガンドを選択する工程、
  - ( c ) 前記選択したリガンドの結合に関する同じ特定の立体構造を備えた親 G P C R の安定性と比較して、前記 G P C R 変異体又はその各々が、特定の立体構造を備えている際に、前記リガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、並びに
  - ( d ) 前記選択したリガンドの結合に関して、親 G P C R と比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程
- を含む。

20

## 【 0 0 3 0 】

Hopkins &Groom (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1, 727-730 による新薬の開発につながるようなゲノムのレビューにおいて、表 1 には、その多数が G P C R であるタンパク質ファミリーの一覧が含まれている。Overington et al (2006) Nature Rev. Drug Discovery 5, 993-996 は、薬剤標的のより詳細な記載を提供しており、図 1 は、四分の一超の現在の薬剤が G P C R を標的とする事を示している。経口薬の 1 8 6 種の全標的のうち、5 2 種の G P C R 標的が存在する。

30

## 【 0 0 3 1 】

本発明において使用するのに適切な G P C R は、 - アドレナリン受容体、アデノシン受容体、特に、アデノシン A<sub>2a</sub> 受容体、及びニューロテンシン受容体 ( N T R ) を含むが、それらに限らない。他の適切な G P C R は当該技術分野においてよく知られており、上述の Hopkins & Groom (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1, 727-730 に挙げられているものを含む。加えて、International Union of Pharmacology は、G P C R の一覧を作成しており ( 参照によって本明細書に取り込む Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288 、当該一覧は、<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward> において定期的に更新されている ) 。 G P C R は、それらのアミノ酸配列の類似性に基づいて、各種の異なる種類に分類されることに注意されるであろう。それらは、それらが結合する天然のリガンドによるファミリーにも分類される。全ての G P C R が本発明の範囲に含まれる。

40

## 【 0 0 3 2 】

多数の G P C R のアミノ酸配列 ( 及びそれらをコードする c D N A のヌクレオチド配列 ) は、例えば GenBank を参照することによって、容易に利用可能である。特に、Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288 は、Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) に由来するヒトの遺伝子記号並びにヒト、マウス、及びラットの遺伝子

50

IDを挙げている。ヒトゲノムの配列は実質的に完全であるため、ヒトGPCRのアミノ酸配列は、そこから推定し得ることに注意すべきである。

#### 【0033】

GPCRは任意の起源に由来してよいが、真核生物起源に由来することが特に好ましい。哺乳類又は鳥類などの脊椎動物に由来することは特に好ましい。GPCRがラット、マス、ウサギ、若しくはイヌ、又はヒトを除く霊長類若しくはヒト、又はニワトリ若しくはシチメンチョウに由来することが特に好ましい。誤解を避けるために、「由来する」の意味には、cDNA又は遺伝子がその起源に由来する遺伝子材料を用いて元々得られたが、タンパク質がその後に任意の宿主細胞において発現されてよいことを含める。かくして、真核生物のGPCR（鳥類又は哺乳類のGPCR）が、大腸菌などの原核生物の宿主細胞で発現されてよいが、場合によって、鳥類又は哺乳類由来であると解されることは明らかである。10

#### 【0034】

ある場合においては、GPCRは、2以上の異なるサブユニットからなってよい。例えば、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体は、その生理学的なリガンド結合特性を獲得するために、一回膜貫通ヘリックスタンパク質（RAMP1）の結合を必要とする。GPCRと結合して機能的な複合体を形成又は調節するエフェクタータンパク質、付属タンパク質、補助タンパク質、又はGPCR相互作用タンパク質は当該技術分野においてよく知られており、例えば、受容体キナーゼ、Gタンパク質、及びアレスチンを含む（Bockaert et al (2004) Curr Opinion Drug Discov and Dev 7, 649-657）。20

#### 【0035】

親GPCRの変異体は、任意の適切な方法で生産されてよく、任意の適切な形態で提供されてよい。かくして、例えば、親タンパク質の全て又は一部における各アミノ酸残基が独立に他のアミノ酸残基に変換された、親タンパク質の一連の特定の変異体が作製されてよい。例えば、膜を貫通していると予測されるタンパク質の部分に変異を作製することが好都合であってよい。ロドブシンの三次元構造は既知であり（Li et al (2004) J Mol Biol 343, 1409-1438; Palczewski et al (2000) Science 289, 739-745）、当該構造を使用してあるGPCRのモデルを作製することが可能である。かくして、簡便には、GPCRの変異させる部分は、モデルに基づくものであってよい。同様に、疎水性に基づいてGPCRの膜貫通領域のモデルを作製するコンピュータープログラムを利用することも可能であり（Kyle & Dolittle (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132）、タンパク質の変異させる部分を選択する際にその様なモデルを使用してよい。従来の部位指向性変異導入を使用してよく、又は当該技術分野においてよく知られたポリメラーゼ連鎖反応に基づく手法を使用してよい。望ましいものではないが、タンパク質変異体の選択にリボソームディスプレイ法が使用されてもよい。30

#### 【0036】

典型的には、選択された各アミノ酸をAlaに置き換える（すなわち、Alaスキャニング変異誘発）が、任意の他のアミノ酸に置き換えてよい。選択したアミノ酸がAlaである場合は、好都合には、Leuによって置き換えてよい。代替的には、前記アミノ酸はGlyに置き換えてよく（すなわち、Glyスキャニング変異誘発）、これは、特定の立体構造にあるタンパク質を固定化してよい隣接するヘリックスのより近接したパッキングを可能にする。選択されたアミノ酸がGlyである場合は、好都合には、Alaによって置き換えてよい。40

#### 【0037】

特定の位置における所定のアミノ酸を置き換えるのに使用されるアミノ酸は、典型的には天然のアミノ酸、特に「コード可能な」アミノ酸であるが、非天然アミノ酸（この場合、典型的には、タンパク質は、化学合成又は非天然アミノ酸アシルtRNAを使用して作製される）であってよい。「コード可能な」アミノ酸は、mRNAの翻訳によってポリペプチドに取り込まれるものである。非天然アミノ酸を作製し、又は、例えば、タンパク質の翻訳後修飾若しくは半合成によって共有結合性の化学修飾によって所定の位置に非ペプ50

チド結合を導入することが可能である。これらの翻訳後修飾は、リン酸化、糖鎖付加、又はパルミトイル化などの天然のものであるか又は合成若しくは生合成によるものであつてよい。

#### 【0038】

代替的には、前記変異体は、タンパク質全体又はその選択した一部に対するものであつてよいランダム変異誘発法によって生産されてよい。ランダム変異誘発法は当該技術分野でよく知られている。

#### 【0039】

好都合には、前記G P C R変異体は、親タンパク質と比較して、1つの置き換わったアミノ酸を有する（すなわち、1つのアミノ酸部位において変異を有する）。このように、単独のアミノ酸を置き換えることによる安定性に対する寄与が評価されてよい。しかしながら、安定性について評価されるG P C R変異体は、親タンパク質と比較して2以上、例えば、2、3、4、5、又は6つの置き換わったアミノ酸を有してもよい。

10

#### 【0040】

以下により詳細に議論しているように、変異の組み合わせが、本発明の選択方法の結果に基づいて為されてよい。幾つかの特定の態様では、1つの変異を有するタンパク質における変異の組み合わせが、安定性における更なる向上を誘導することが認められた。かくして、前記選択方法は、例えば、当該方法を実施して安定性を増大する单一の変異を同定し、当該方法の工程（a）において提供される1つのG P C R変異体においてそれらの同定した変異を組み合わせることによって、繰り返し使用してよいと解されるであろう。かくして、多数の変異を有するタンパク質変異体が、本発明の方法を使用して選択されてよい。

20

#### 【0041】

親G P C Rは、天然のタンパク質である必要はない。好都合には、大腸菌などの適切な宿主生物中で発現することが可能な遺伝子操作を受けたものであつてよい。例えば、実施例1に記載の、好都合に操作したシチメンチョウ - アドレナリン受容体は、切断されており、アミノ酸配列の1 ~ 33残基を欠失している（すなわち、A R<sub>3 4</sub> - 4<sub>2 4</sub>）。親G P C Rは、天然のタンパク質の切断型であるか（一方又は両方の末端が切断されている）、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であつてよい。代替的又は付加的に、親G P C Rは、天然のG P C Rと比較して、例えば、可溶性、タンパク質分解安定性を改善するために修飾されてよい（例えば、切断、ループの欠失、グリコシリ化部位の変異、又はシステインなどの反応性アミノ酸側鎖の変異）。いずれにしても、親G P C Rは、天然のG P C Rに結合することが既知のものである、選択したリガンドに結合することが可能なタンパク質である。好都合には、親G P C Rは、適当なリガンドを加えて、Gタンパク質活性化によって影響を受けることが一般的に知られている1つ又は複数の下流の活性の任意のものに作用してよい。

30

#### 【0042】

しかしながら、前記変異体の安定性は、安定性における増大を評価できるため、親と比較されると解されるであろう。

40

#### 【0043】

特定の立体構造を備えている親G P C Rに結合するリガンドが選択される。典型的には、前記リガンドは、親G P C Rの1つの立体構造に結合する（そして、前記G P C Rに当該立体構造をとらせる）が、G P C Rが採用し得ない他の立体構造に強力に結合することはない。かくして、前記リガンドの存在は、G P C Rが特定の立体構造をとらせることを促進すると解されてよい。かくして、本発明の方法は、生物学的に有意義な立体構造（例えば、リガンド結合状態）に捕らわれ、当該立体構造でより安定であるG P C R変異体を選択する方法であると解されてよい。

#### 【0044】

好みしくは、G P C Rが工程（c）で備える特定の立体構造が、工程（b）で選択されるリガンドの種類と対応する。

50

## 【0045】

好ましくは、前記選択されるリガンドはアゴニストに分類されるリガンド由来のものであり、前記特定の立体構造はアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択されるリガンドはアンタゴニストに分類されるリガンド由来のものであり、前記特定の立体構造はアンタゴニスト立体構造である。

## 【0046】

好ましくは、前記選択されるリガンドはアゴニストに分類されるリガンドに由来し、G P C Rが工程(c)で備える特定の立体構造がアゴニスト立体構造である。

## 【0047】

好ましくは、受容体変異体に対する前記選択されるリガンドの結合親和性は、野生型の受容体に対するもの以上であり、選択されるリガンドに対して顕著に低減した結合を示す変異体は、典型的には、除外される。

10

## 【0048】

「リガンド」によって、本願では、G P C Rに結合し、且つ、G P C Rに特定の立体構造をとらせる任意の分子が含まれる。好ましくは、前記リガンドは、G P C R分子全体の半分超に特定の立体構造をとらせるものである。

## 【0049】

多数の適切なリガンドが既知である。

## 【0050】

典型的には、前記リガンドは完全なアゴニストであり、G P C Rに結合することが可能であり、例えば、G-タンパク質結合、下流のシグナル伝達現象、又は血管拡張などの生理的なアウトプットによって測定される、完全な(100%)生物学的応答を誘導することが可能である。かくして、典型的には、前記生物学的応答は、関連するエフェクター経路の刺激後のG-タンパク質におけるGDP/GTP交換である。前記測定は、典型的には、GDP/GTP交換又はその経路の最終産物(例えば、cAMP、cGMP、又はリン酸イノシトール)のレベルにおける変化である。前記リガンドは、部分的アゴニストであり、G P C Rに結合することが可能であり、部分的(<100%)な生物学的応答を誘導することが可能である。

20

## 【0051】

前記リガンドは、受容体に結合する分子であり、その基礎的な(すなわち、アゴニストによって刺激されていない)活性を場合によっては0にまでも低減する逆アゴニストであってもよい。

30

## 【0052】

前記リガンドは、受容体に結合し、アゴニストの結合を阻害して、生物学的応答を妨げるアンタゴニストであってもよい。逆アゴニスト及び部分的アゴニストは、あるアッセイ条件下では、アンタゴニストとなり得る。

## 【0053】

上記リガンドは、オルトステリック(orthosteric)であってよく、これは、それらが内在性アゴニストと同じ部位に結合するという意味を含む。または、それらはアロステリック(allosteric)又はアロトピック(allotopic)であってよく、これは、それらがオルトステリック部位と異なる部位に結合するという意味を含む。上記リガンドはシンтопick(syntopic)であってよく、これは、それらが同じ又は重複する部位で他のリガンドと相互作用するという意味を含む。それらは、可逆的又は非可逆的であってよい。

40

## 【0054】

アンタゴニストに関しては、サーマウンタブル(surmountable)であってよく、これは、アゴニストの最大の効果が、アンタゴニストを用いた事前処理又は同時処理によって低減されないという意味を含み；或いは、それらはインサーマウンタブル(insurmountable)であってよく、これは、アゴニストの最大の効果が、アンタゴニストの事前処理又は同時処理のいずれかによって低減されるという意味をふくみ；或いは、それらはニュートラル(neutral)であってよく、これは、アンタゴニストが逆アゴニスト又は部分的アゴニ

50

スト活性を有しないものであるという意味を含む。典型的には、アンタゴニストは、逆アゴニストでもある。

【0055】

前記選択方法に使用するリガンドは、ポジティブアロステリックモジュレータ、ポテンシエーター、ネガティブアロステリックモジュレータ、及びインヒビターなどのアロステリックモジュレータであってもよい。それらは、それら自体でアゴニスト又は逆アゴニストとしての活性を有してよく、又はそれらはアゴニスト又は逆アゴニストの存在下でのみ活性を有してよく、その場合には、GPCRと結合するためにその様な分子と組み合わせて使用される。

【0056】

参照によって本明細書に取り込むNeubig et al (2003) Pharmacol. Rev. 55, 597-606は、各種のリガンドを開示している。

【0057】

好ましくは、上述のリガンドは、低分子の有機又は無機成分であるが、ペプチド又はポリペプチドであってよい。典型的には、前記リガンドが低分子の有機又は無機成分である際は、50から2000、100から1000など、例えば、100から500のM<sub>r</sub>を有する。

【0058】

典型的には、前記リガンドは、mMからpM、例えばμM(マイクロモーラー)からnMの範囲のK<sub>d</sub>でGPCRに結合する。一般的には、最も低いK<sub>d</sub>を有するリガンドが好み。

【0059】

有機低分子のリガンドは、当該技術分野においてよく知られており、例えば、以下の実施例を参照のこと。他の低分子のリガンドは、5HT1A受容体において完全なアゴニストである5HT；5HT1A受容体に部分的なアゴニストであるエルトプラジン(Newman-Tancredi et al (1997) Neuropharmacology 36, 451-459参照)；ドーパミンD2受容体アゴニストである(+) - ブタクラモール及びスピペロン(Roberts & Strange (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 34-42参照)；並びにCB2のニュートラルアゴニストであるWIN55212-3(Savinainen et al (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 636-645)を含む。

【0060】

前記リガンドは、ペプチドミメティック、核酸、ペプチド核酸(PNA)、又はアブタマーであってよい。Na<sup>+</sup>又はZn<sup>2+</sup>などのイオン、オレアミドなどの脂質、又はヘパリンなどの炭水化物であってよい。

【0061】

前記リガンドは、GPCRに結合するポリペプチドであってよい。そのようなポリペプチド(オリゴペプチド含む)は、典型的には、M<sub>r</sub>500からM<sub>r</sub>50,000のであるが、それより大きいものであってもよい。前記ポリペプチドは、天然のGPCR相互作用タンパク質又はGPCRと相互作用する他のタンパク質又はその誘導体若しくは断片であってよいが、特定の立体構造にあるGPCRに選択的に結合するものである。GPCR相互作用タンパク質は、シグナル伝達と関連するもの及び輸送に関連するものを含み、多くの場合においては、GPCRのC末端部分のPDZドメインを介して作用する。

【0062】

あるGPCRに結合することが既知のポリペプチドは、Gタンパク質、アレスチン、RGSTタンパク質、Gタンパク質受容体キナーゼ、RAMP、14-3-3タンパク質、NSF、ペリプラキン、スピノフィリン、GPCRキナーゼ、レセプターチロシンキナーゼ、イオンチャンネル又はそのサブユニット、アンキリン、並びにShanks又はHomeタンパク質の任意のものを含む。他のポリペプチドは、NMDA受容体サブユニットNR1又はNR2a、カルシオン、又はフィブロネクチンドメインフレームワークを含む。前記ポリペプチドは、フィブリマー1などのGPCRの細胞外ドメインに結合するもの

10

20

30

40

50

であってよい。前記ポリペプチドは、ヘテロオリゴマーにおいて選択したG P C Rを結合する他のG P C Rであってよい。G P C Rにおけるタンパク質・タンパク質相互作用のレビューは、参照によって本明細書に取り込むMilligan & White (2001) Trends Pharmacol. Sci. 22, 513-518 又はBockaert et al (2004) Curr. Opinion Drug Discov. Dev. 7, 649-657において認められる。

#### 【0063】

ポリペプチドリガンドは、好都合には、G P C Rに結合する抗体であってよい。用語「抗体」によって、本願では、天然であるか又は部分的に若しくは完全に合成によって生成されたかにかかわらず、免疫グロブリンが含まれる。例としては、免疫グロブリンアイソタイプ及びそれらのアイソタイプサブクラス、並びにモノクローナル抗体及びF a b、F ( a b ' ) 2、一本鎖F v ( s c F v )、F v、ドメイン抗体 ( d A b ) 及びダイアボディ ( diabody ) などの抗原結合ドメインを含むそれらの断片が含まれる。ラクダ科の動物の抗体及びラクダ科の抗体であって遺伝子操作したものも挙げられてよい。G P C Rに結合するその様な分子は当該技術分野において既知であり、任意に、既知の技術を使用して作製されてよい。適切な抗体は、立体構造エピトープを認識する傾向があるため、G P C Rに対するラジオイムノアッセイ ( R I A ) で現在使用されているものである。

#### 【0064】

前記ポリペプチドは、アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラトリオペプチドリピートタンパク質、又は設計アンキリンリピートタンパク質 ( D A R P ) などのモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質、或いはリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスcaffoId) であってもよい。

#### 【0065】

前記選択方法の1つの実施態様では、前記リガンドはG P C Rに共有結合し、例えば、Gタンパク質又はアレスチン融合タンパク質などである。幾つかのG P C R ( 例えば、トロンビン受容体 ) は、プロテアーゼによってN末端で切断され、新しいN末端はアゴニスト部位と結合する。かくして、その様なG P C Rは天然のG P C R - リガンド融合体である。

#### 【0066】

抗体又は他の「ユニバーサルな」結合ポリペプチド ( 例えば、多数の異なるG P C Rに結合することが既知のGタンパク質 ) の使用は、天然のリガンド及び低分子リガンドが未知の「オーファン」G P C Rに対する本発明の方法の使用において特に有利であり得ると解されるであろう。

#### 【0067】

一度リガンドが選択されると、当該選択したリガンドの結合に関して親G P C Rと比較して、前記G P C R変異体又はその各々が、前記リガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かが測定される。当該工程 ( c ) は、選択したリガンドによって決定される特定の立体構造について、前記G P C R変異体又はその各々が ( 親と比較して ) 増大した安定性を有するか否かを測定するものである。かくして、前記G P C R変異体は、選択したリガンド結合の間に測定されるか又はリガンド結合によって測定される、選択したリガンドの結合の結合に関して増大した安定性を有する。以下に記載するように、増大した安定性が、選択したリガンドの結合の間に評価されることが好ましい。

#### 【0068】

増大した安定性は、好都合には、不安定にする可能性がある曝露条件下 ( 例えば、熱、強力な界面活性剤条件、及びカオトロピック剤など ) における、前記変異体の寿命の延長によって測定される。前記曝露条件下における不安定化は、典型的には、変性又は構造の損失の測定によって測定される。以下に記載するように、これは、リガンド結合能の損失又は二次若しくは三次構造の指標の損失によって現れる。

#### 【0069】

10

20

30

40

50

以下の図12（特に好ましい実施態様を記載する）に関して記載するように、G P C R変異体の安定性を測定するために使用してよい各種のアッセイ形式が存在する。

#### 【0070】

1つの実施態様では、前記G P C R変異体を、当該変異体の安定性を測定する方法に供する前にリガンドと接触させる（前記G P C R変異体及びリガンドは、試験の間に接触した状態のままである）。かくして、例えば、本発明の方法が、1つの立体構造においてリガンドと結合し、且つ、改善された熱安定性を有するG P C R変異体を選択するために使用される際は、前記受容体を、加熱される前に前記リガンドと接触させ、次いで、加熱後に前記受容体に結合しているリガンドの量を使用して、親受容体との比較における熱安定性を表わしてよい。これによって、変性条件（例えば、熱）に曝露した後にリガンド結合能を保持しているG P C Rの量の測定が提供され、これが安定性の指標である。

10

#### 【0071】

代替的（であるが上記のものよりは好ましいものではない）実施態様では、前記G P C R変異体を、前記リガンドと接触させる前に、前記変異体の安定性を測定する手法に供する。かくして、例えば、本発明の方法が、1つの立体構造においてリガンドと結合し、且つ、改善された熱安定性を有する膜受容体変異体を選択するために使用される際は、前記リガンドと接触させる前に、まず前記受容体を加熱し、次いで、前記受容体に結合したリガンドの量を使用して熱安定性を表わしてよい。そして、これによって、変性条件に曝露した後にリガンド結合能を保持しているG P C Rの量の測定が提供される。

20

#### 【0072】

双方の実施態様において、前記変異体の安定性の比較が、同一の条件下における親分子を参照することによって為されると解されるであろう。

#### 【0073】

これらの実施態様の双方において、選択された変異体は、親タンパク質と比較して、特定の立体構造を備える際に増大した安定性を有するものである。

#### 【0074】

好ましい経路は、特定のG P C Rに依存し、リガンドの非存在下におけるタンパク質のとり得る立体構造の数に依存するであろう。図12に記載の実施態様では、所望の立体構造が選択される可能性を増大するため、リガンドが加熱工程の間に存在することが好ましい。

30

#### 【0075】

したがって、前記選択方法は、増大した熱安定性を有するG P C R変異体を選択するための方法であって、（a）親G P C Rの1つ又は複数の変異体を提供する工程、（b）前記親G P C Rに結合するアンタゴニスト又はアゴニストを選択する工程、（c）前記アンタゴニスト又はアゴニストの存在下において、特定の温度で特定の時間の後にG P C R変異体の前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストへの結合能を測定することによって、前記変異体又はその各々が親G P C Rと比較して増大した熱安定性を有するか否かを測定する工程、及び（d）同一の条件下における親G P C Rよりも、特定の温度で特定の時間の後に前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストのより多くと結合するG P C R変異体を選択する工程を含む方法を包含すると解されるであろう。工程（c）では、特定の温度における一定の期間が、典型的には、前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストと結合するG P C R変異体の能力の測定において使用される。工程（c）では、典型的には、選択した前記アンタゴニスト又はアゴニストの結合が当該温度で一定期間の間に50%低減する（50%の受容体が不活化されていることを示す：「見かけ上の」Tm）温度及び時間が選択される。

40

#### 【0076】

好都合には、前記リガンドを使用してG P C Rをアッセイする（すなわち、前記アッセイを使用して非変性状態であるか否かを測定する）際は、前記リガンドは可視的に標識、例えば、放射標識又は蛍光標識される。他の実施態様では、リガンド結合は、二次検出系、例えば、抗体又は検出部位に共有結合する他の高親和性結合パートナー、例えば、比色

50

分析において使用されてよい酵素（例えば、アルカリホスファターゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ）を使用して、未結合のリガンドの量を測定することによって評価されてよい。FRET法が使用されてもよい。その安定性の測定においてGPCR変異体をアッセイするために使用するリガンドは、前記方法の工程（b）において選択されるものと同じリガンドである必要はないと解されるであろう。

#### 【0077】

リガンド結合能を非変性タンパク質の存在の指標として使用して、親GPCR及びGPCR変異体の安定性を測定することが好都合であるが、他の方法が当該技術分野で知られている。例えば、内在するトリプトファン蛍光の使用又は1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート（ANS）などの外来性の蛍光プローブの使用のいずれかによる、蛍光スペクトルにおける変化が、アンフォールディングの感度の良好な指標であってよく、例えば、ThermoFluor（商標）法（Mezzasalma et al, J Biomol Screening, 2007, Apr;12(3):418-428）において説明されている。タンパク質分解に対する安定性、質量分析器によって測定される重水素／水素交換、Blue Native Gel、キャビラリーゾーン電気泳動、円偏光二色性（CD）分光法、及び光散乱を使用して、二次又は三次構造と関連するシグナルの損失によってアンフォールディングを測定してよい。しかしながら、これらの方法の全てが、それらを使用する前に、適度な量（例えば、高いpmol/nmol量）で精製されたタンパク質を必要とするが、実施例に記載の方法は、pmol量の本質的に未精製のGPCRを使用する。

10

#### 【0078】

好みの実施態様では、工程（b）において、各々の存在がGPCRに同一の特定の立体構造を備えさせる、2又はそれ以上の同じ種類のリガンドを選択する。かくして、当該実施態様において、同じ種類の1つ又は複数の（天然又は非天然）リガンド（例えば、完全なアゴニスト又は部分的アゴニスト又はアンタゴニスト又は逆アゴニスト）が使用されてよい。平行して又は連続的に当該方法に同じ種類の多数のリガンドを含めることによって、例えば結合部位において親と実質的に異なるが、代償的変化によって依然としてリガンドに結合することが可能な多数の変性を有する受容体の立体構造を、思わず遺伝子操作及び選択する理論的なリスクが最小化される。以下：

20

1. 例えば結合分析、機能分析、又は分光分析によって根拠付けられる共通の薬理学的分類を有する、化学的に異なるリガンドのセット（例えば、n=2から5）を選択する工程（これらのリガンドは、例えば野生型受容体及び／又は変異型受容体を使用する競争結合試験並びに／或いはそれらが共通のファーマコフォアを表わす必要は無いが分子モデリングによって根拠付けられるように、受容体の共通の空間的領域に結合すると解されるべきである）；

30

2. 安定性を増大することが意図される1つ又は複数の受容体変異体を作製し、リガンドセットの全てを使用してタイト結合についてアッセイする工程（前記アッセイは、平行、多重、又は連続的に為されてよい）；

3. 例えば、各リガンドについての結合等温線の測定によって、及びリガンドを用いた安定性のシフトの測定によって（典型的には、野生型と比較してウィンドウが狭い）、安定化された受容体変異体の確実性を確認する工程を使用して当該リスクを軽減してよい。

40

#### 【0079】

変異による結合部位に対する影響によって生じる見掛けの親和性における変化に対する監視のために、好みは、同じ薬理学的分類を有するが、異なる化学的分類を有するリガンドを使用して、受容体をプロファイルるべきである。典型的には、これらによって、異なる分子認識特性を有するが、同様の親和性におけるシフト（変異体vs親、例えば野生型）が示されるべきである。結合実験は、好みは、同じ薬理学的分類内の標識リガンドを使用して実施すべきである。

#### 【0080】

それにもかかわらず、同じ薬理学的分類内のリガンドの複数の化学的分類に特異的な立体構造基質が存在する可能性があり、これらは、その手法において、選択したリガンドの

50

化学的分類に依存して特異的に安定化される可能性があることが認識されるべきである。

【0081】

典型的には、前記選択したリガンドは、親G P C Rに対する結合と同様の作用強度でG P C R変異体に結合する。典型的には、G P C R変異体及び親G P C Rに対する特定のリガンド結合についての $K_d$ 値は、互いに5から10倍、例えば、2から3倍の範囲である。典型的には、親G P C Rと比較してG P C R変異体に対するリガンドの結合は、最大で5倍弱く、最大で10倍強いであろう。

【0082】

典型的には、選択された立体構造で安定化された受容体変異体は、親受容体と同程度（典型的には、2から3倍以内）又はそれ以上の親和性で選択したリガンドに結合するはずである。アゴニスト-立体構造変異体について、前記変異体は、典型的には、親G P C Rと同じ又はそれ以上の親和性で前記アゴニストと結合し、典型的には、親G P C Rと同じ又はそれ以下の親和性でアンタゴニストと結合する。同様に、アンタゴニスト-立体構造変異体について、前記変異体は、典型的には、親G P C Rと同じ又はそれ以上の親和性でアンタゴニストと結合し、典型的には、親G P C Rと同じ又はそれ以下の親和性でアゴニストと結合する。

【0083】

選択するリガンドについての親和性における顕著な低減（典型的には2から3倍超）を示す変異体は、典型的には除外する。

【0084】

典型的には、同じ分類を有する一連のリガンドの結合の序列は同程度であるが、当該序列において1つ又は2つの逆転が存在する可能性があり、あるいは一連のリガンドに異常値が存在する可能性がある。

【0085】

更なる実施態様では、同じ立体構造の受容体に結合する2つ又はそれ以上のリガンド、例えば、アロステリックモジュレータ及びオルトステリックアゴニストを使用してよい。

【0086】

誤解を避けるために、また、実施例から明らかなように、効果的な方法に多数のリガンドを使用することが必要なわけではない。

【0087】

更なる実施態様では、選択したリガンドに結合することが可能であるが、第一のリガンドとは異なる分類のものである第二の選択したリガンドには結合できないか又は親G P C Rより弱く結合するG P C R変異体を選択することも有利であってよい。かくして、例えば、G P C R変異体は、選択したアンタゴニストの結合に関して増大した安定性を有するものであることに基づいて選択されるものであってよいが、その様に選択されたG P C R変異体を更に試験して、完全なアゴニストに結合するか（又は親G P C Rよりも弱く完全なアゴニストに結合するか）否かを測定する。完全なアゴニストに結合しない（又は結合が低減する）変異体が選択される。このように、1つの特定の立体構造に固定化されているG P C Rを更に選択する。

【0088】

選択されたリガンド（本発明の方法の工程（b）で選択したもの）及び上述の更なる（第二の）リガンドが、リガンドの種類の任意のペア、例えば、完全なアゴニストとアンタゴニスト；アンタゴニストと逆アゴニスト；逆アゴニストとアンタゴニスト；逆アゴニストと完全なアゴニスト；及び完全なアゴニストと逆アゴニストなどであってよい。

【0089】

前記受容体変異体が、更なる（第二の）リガンドに対する親受容体の親和性の50%未満の親和性、より好ましくは10%未満、更に好ましくは1%未満又は0.1%未満又は0.01%未満の親和性で更なる（第二の）リガンドに結合することが好ましい。かくして、前記受容体変異体と第二のリガンドとの相互作用の $K_d$ は、親受容体よりも高い。実施例1に示すように、アドレナリン受容体変異体であるA R - m 2 3（アンタゴニス

10

20

30

40

50

トを使用して当該選択方法によって選択される)は、その親よりも3桁弱くアゴニストに結合する(すなわち、 $K_d$ が1000倍以上)。同様に、実施例2では、アデノシンA2a受容体変異体であるRant21が、親よりも2から4桁弱くアゴニストに結合する。

#### 【0090】

このタイプの対抗選択を使用して、より特異的(及び、そのため、より迅速且つより効率的)に変異誘発法を、リガンドによって決まる純粋な立体構造に対する経路に沿って管理することが可能であるため有用である。

#### 【0091】

好ましくは、GPCR変異体は、構造の完全性を維持している適切な可溶化形態で提供され、機能的形態である(例えば、リガンドに結合することが可能である)。特定のタンパク質について有効な当業者に選択されてよい適当な可溶化系、例えば、適切な界面活性剤(又は他の両親媒性剤)及び緩衝液系を使用する。典型的には、使用してよい界面活性剤は、例えば、ドデシルマルトシド(DDM)又はCHAPS又はオクチルグルコシド(OG)又は他の多数の界面活性剤を含む。コレステロールヘミスクシネット若しくはコレステロール自体又はヘプタン-1,2,3-トリオールなどの他の化合物を含めることも好都合であってよい。グリセロール又はプロリン又はベタインの存在は有用であってよい。GPCRは、一度膜から可溶化されると、アッセイするために十分に安定である必要があることは重要である。幾つかのGPCRについては、DDMは十分であるが、望ましい場合には、グリセロール又は他のポリオールを添加して、アッセイのための安定性を増大させてよい。さらなるアッセイのための安定性は、任意にグリセロールの存在下において、例えば、DDM、CHAPS、及びコレステロールヘミスクシネットの混合物に可溶化することによって達成されてよい。特に不安定なGPCRについては、ジギトニン又はアンフィポール(amphipol)或いは従来の界面活性剤の非存在下において膜から直接GPCRを可溶化することが可能であり、顕著な数の脂質をGPCRに結合させた状態のまとすることによって典型的に安定性を維持する他のポリマーを使用して可溶することが望ましい。機能的な形態の非常に不安定な膜タンパク質を可溶化するために、ナノディスク(nanodisc)を使用してもよい。

10

20

30

40

#### 【0092】

典型的には、GPCR変異体は、(例えば、大腸菌などの前記変異体を発現させた宿主細胞由来の膜画分の)粗抽出物で提供される。タンパク質変異体が、典型的には少なくとも75%、より典型的には少なくとも80%、又は85%、又は90%、又は95%、又は98%、又は99%のサンプル中に存在するタンパク質を占める形態で提供されてよい。言うまでもなく、典型的には、上述のように可溶化され、多くの場合にGPCR変異体は界面活性剤及び/又は脂質分子と相互作用する。

30

#### 【0093】

任意の変性又は変性条件に対して、例えば、熱、界面活性剤、カオトロピック剤、又は極端なpHのいずれか1つ又は複数に対して増大した安定性を有するGPCR変異体が選択される。

#### 【0094】

熱に対する安定性(すなわち、熱安定性)に関して、これは、リガンド結合を測定することによって、或いは特定の温度における蛍光、CD、又は光散乱などの分光学的方法によって容易に測定することが可能である。典型的には、GPCRがリガンドに結合する際は、特定の温度においてリガンドに結合するGPCRの能力を使用して、前記変異体の熱安定性を測定してよい。「見かけの $T_m$ 」、すなわち、50%の受容体が所定の条件下で所定の時間(例えば、30分)に亘ってインキュベートした後に、不活化される温度を測定することも好都合であり得る。より高い熱安定性のGPCR変異体は、それらの親と比較してより大きな見かけの $T_m$ を有する。

#### 【0095】

界面活性剤又はカオトロピックに対する増大した安定性に関しては、典型的には、前記GPCRを、試験界面活性剤又は試験カオトロピック剤の存在下において所定の時間に亘

50

ってインキュベートして、例えば、リガンド結合又は上述の分光学的方法を使用して安定性を測定する。

【0096】

極端なpHに関しては、典型的な試験pHは、例えば、4.5から5.5(低pH)の範囲又は8.5から9.5(高pH)の範囲で選択されるであろう。

【0097】

比較的強力な界面活性剤を結晶化の段階で使用するため、GPCR変異体がその様な界面活性剤の存在下において安定であることが好ましい。ある界面活性剤の「強力」さは、DDM、C<sub>11</sub>、C<sub>10</sub>、C<sub>9</sub>、C<sub>8</sub>マルトシド又はグルコシド、ラウリルジメチルアミンオキシド(LDAO)及びSDSの順である。GPCR変異体がC<sub>9</sub>マルトシド又はグルコシド、C<sub>8</sub>マルトシド又はグルコシド、LDAO、及びSDSのいずれかに対して良い安定であることが特に好ましく、そのため、これらの界面活性剤を安定性試験に使用することが好ましい。

10

【0098】

測定の容易性のため、熱安定性を測定することが好ましく、所定の条件に関して親タンパク質と比較して増大した熱安定性を有する変異体を選択する。熱は変性剤としての作用を有し、サンプルを冷却すること、例えば、氷上に置くことで容易に取り除くことが可能であると解されるであろう。熱安定性は、他の変性剤又は変性条件に対する安定性の指針でもある可能性がある。かくして、増大した熱安定性は、変性界面活性剤、特にDDMよりも変成作用が強いもの、例えば、より小さな頭部基及びより短いアルキル鎖並びにノ又は荷電した頭部基を有する界面活性剤中の安定性に置き換えられる可能性がある。本発明者は、熱安定性を有するGPCRが強力な界面活性剤に対してもより安定であることを発見した。

20

【0099】

変性条件として極端なpHを使用する際は、中和剤を添加することによって迅速にこれを取り除くことができると解されるであろう。同様に、カオトロピック剤を変性剤として使用する際は、カオトロピック剤がカオトロピック効果を奏する濃度未満にサンプルを希釈することによって、変性効果を除去し得る。

30

【0100】

当該選択方法の特定実施態様では、GPCRは-アドレナリン受容体(例えば、シチメンチヨウ由来)であり、リガンドは、アンタゴニストであるジヒドロアルブレノロール(DHA)である。

【0101】

当該選択方法の更なる好ましい実施態様では、GPCRがアデノシンA<sub>2a</sub>受容体(A<sub>2a</sub>R)(例えば、ヒト由来)であり、リガンドが、アンタゴニストであるZM241385(4-[2-[[7-アミノ-2-(2-フリル)[1,2,4]-トリアゾロ[2,3-] [1,3,5]トリアジン-5-イル]アミノ]エチル]フェノール)又はアゴニストであるNECA(5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン)である。

【0102】

当該選択方法のさらに好ましい実施態様では、GPCRはニューロテンシン受容体(NTR)(例えば、ラット由来)であり、リガンドが、アゴニストであるニューロテンシンである。

40

【0103】

方法2

上記のように選択したGPCR変異体を調製するための方法は、

(a) 上述したGPCR変異体を選択する方法を実施する工程、

(b) 増大した安定性について選択された1つ又は複数のGPCR変異体中の1つ又は複数の変異したアミノ酸残基の位置を同定する工程、及び

(c) 同定した位置の1つ又は複数に変異を含むGPCR変異体を合成する工程

50

を含む。

**【0104】**

実施例において認められるように、驚くべきことに、G P C R の内部の単独のアミノ酸に対する変化が、前記タンパク質が特定の立体構造を備える条件下において、親タンパク質と比較して前記タンパク質の安定性を増大させる。かくして、本発明の第二の態様に係る方法の第一の実施態様では、親タンパク質の1つのアミノ酸残基がタンパク質変異体では変化している。典型的には、前記アミノ酸残基は、本発明の第一の態様に係る方法において試験した変異体において認められるアミノ酸残基に変化される。しかしながら、任意の他のアミノ酸残基、例えば、任意の天然アミノ酸残基（特に、「コード可能な」アミノ酸残基）又は非天然アミノ酸に置き換えられてよい。一般的には、簡便にするために、アミノ酸残基は、19の他のコード可能なアミノ酸の1つに置き換えられる。好ましくは、上述の選択方法において選択した変異体に存在する置き換えられたアミノ酸残基である。10

**【0105】**

実施例で認められるように、安定性における更なる増大が、親タンパク質のアミノ酸の2つ以上を置き換えることによって得られてよい。典型的には、置き換えられたアミノ酸の各々が、上述の選択方法を使用して同定されたものである。典型的には、同定された各アミノ酸は、タンパク質変異体に存在するアミノ酸に置き換えられてよいが、上述のように、それは任意の他のアミノ酸で置き換えられてもよい。20

**【0106】**

典型的には、G P C R 変異体は、親タンパク質と比較して、1から10の置き換えられたアミノ酸、好ましくは1から8、典型的には2から6、例えば、2、3、4、5、又は6の置き換えられたアミノ酸を含む。20

**【0107】**

多数の変異体が、本発明の第一の態様に係る選択方法に供されてよいと解されるであろう。換言すると、多数の変異体が当該選択の工程（a）で提供されてよい。その立体構造が非常に安定な多重点変異タンパク質を作製するために選択された、多数の変異誘発されたG P C R が作製されてよいと解されるであろう。

**【0108】**

G P C R 変異体は任意の適切な方法によって調製されてよい。好都合には、前記タンパク質変異体は、適切な核酸分子にコードされ、適切な宿主細胞において発現される。前記G P C R 変異体をコードする適切な核酸分子は、当該技術分野でよく知られている標準的なクローニング技術、部位特異的突然変異誘発法、及びP C R を用いて作製されてよい。適切な発現系は、細菌又は酵母における構成的又は誘導性の発現系、バキュロウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、及びレンチウイルスなどのウイルス発現系、又は昆虫若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を含む。適切な宿主細胞は、大腸菌、乳酸連鎖球菌、サッカロミセスセレビシアエ、スキゾサッカロミセスポンベ、ピチアパストリス、スボドプテラフルギペルダ、及びトリコブルシアニ細胞を含む。適切な動物宿主細胞は、H E K 2 9 3、C O S、S 2、C H O、N S O、及びD T 4 0などを含む。幾つかのG P C R は、機能するために特定の脂質（例えば、コレステロール）を必要とする。その場合には、脂質を含む宿主細胞を選択することが望ましい。加えて又は代替的に、前記脂質は、前記タンパク質変異体の単離及び精製の間に添加してもよい。これらの発現系及び宿主細胞は、当該選択方法の工程（a）におけるG P C R 変異体について使用してもよいと解されるであろう。3040

**【0109】**

遺伝子及びc D N A のクローニング及び操作のため、D N A を変異させるため、及び宿主細胞においてポリヌクレオチドからポリペプチドを発現させるための分子生物学的方法が、参照によって本明細書に取り込む「Molecular cloning, a laboratory manual」, third edition, Sambrook, J. & Russell, D.W. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 」に例示されているように、当該技術分野においてよく知られている。

## 【0110】

本発明の第一又は第二の態様の更なる実施態様では、選択又は調製したG P C R変異体がGタンパク質に結合することが可能であるか否かを測定してもよいと解される。前記選択又は調製したG P C R変異体が、親G P C Rと同程度の広がり及び/又は親和性の順位で、選択したリガンドと同じ分類の複数のリガンドに結合することが可能であるか否かを測定することも好ましい。

## 【0111】

## 方法3

実施例1から3に示し、且つ上述したように、熱安定化変異は、シチメンチョウ1アドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、ラットニューロテンシン受容体、及びヒトムスカリーン受容体の配列全体に広く分布する。図17は、ヒト-2A Rの配列を有するこれらの配列のアラインメントを提供し、熱安定化変異が前記配列に位置する際に、全部で70のうち11例において、2つの配列が同じ位置に変異を含有している(図17において星印で示す)。かくして、1つ又は複数の安定化変異が1つのG P C Rで同定されると、増大した安定性を有する更なるG P C Rを、G P C Rのアミノ酸配列アラインメント及び対応する1つ又は複数の位置で1つ又は複数の変異を作製することによって產生されてよい。この概念は、シチメンチョウ1-m23の6つの熱安定化変異がヒト2受容体に直接転用した図26に明確に例示されている。結果として得られた変異体である2-m23は、ヒト2受容体よりも12高いTmを有していた。

10

## 【0112】

従って、親G P C Rと比較して増大した安定性を有するG P C R変異体を製造するための更なる方法は、

(i) 第一の親G P C Rと比較して増大した安定性を有する第一の親G P C Rの1つ又は複数の変異のアミノ酸配列において、1つ又は複数の変異体が第一の親G P C Rと比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、1つ又は複数の位置を同定する工程、及び

(ii) 対応する1つ又は複数の位置において、第二のG P C Rを規定するアミノ酸配列に1つ又は複数の変異を作製し、第二の親G P C Rと比較して増大した安定性を有する第二の親G P C Rの1つ又は複数の変異体を提供する工程

20

を含む。

30

## 【0113】

第一の親G P C Rの1つ又は複数の変異体は、上述した選択又は調製方法に従って選択又は調製されてよい。したがって、この方法を、変異誘発により安定で立体構造が固定されたG P C Rを作製するために使用してもよい。例えば、特定の立体構造における増大した安定性を有するG P C R変異体の選択の後に、安定化変異を同定し、第二のG P C Rの対応する位置のアミノ酸が置き換えられ、第二の親G P C Rと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有するG P C R変異体を製造することが可能である。

## 【0114】

誤解を避けるために言及すると、第一の親G P C Rは、天然の配列を有するG P C Rであってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

40

## 【0115】

典型的には、1つ又は複数の変異体が第一の親G P C Rと比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する、1つ又は複数の位置を同定することは、例えば、Clustal Wプログラム(Thompson et al., 1994)を使用して、それらのアミノ酸配列を親G P C Rの配列とアラインメントすることを伴う。

## 【0116】

「対応する1つ又は複数の位置」によって、例えば、MacVector及びClustal Wを使用して、第一の及び第二のG P C Rがアラインメントによって比較される

50

際に、第一のG P C R のアミノ酸配列における位置に整列（アライン）する第二のG P C R のアミノ酸配列における位置を含む。例えば、図17におけるアラインメントで示すように、シチメンチョウ 1-m23における6つの安定化変異であるR68S, M90V, Y227A, A282L, F327A、及びF338Mが、ヒト 2受容体における残基であるK60, M82, Y219, C265, L310、及びF321の各々に対応する位置である。

#### 【0117】

第二のG P C R のアミノ酸配列における対応する1つ又は複数の位置を同定して、それらの位置のアミノ酸を他のアミノ酸で置き換える。典型的には、前記アミノ酸は、第一の親G P C R の変異体における対応する位置のアミノ酸を置き換えたものと同じアミノ酸で置き換えられる（但し、それらのアミノ酸が既にその残基に存在する場合を除く）。例えば、シチメンチョウ 1-m23の68位では（R68S）、アルギニン残基がセリン残基で置き換えられている。したがって、ヒト 2受容体の対応する位置である60位（K60）において、リジン残基が好ましくはセリン残基で置き換えられる。

10

#### 【0118】

変異は、例えば、上述のように、且つ、当該技術分野においてよく確立された技術を使用して、アミノ酸配列において作製されてよい。

#### 【0119】

第二のG P C R は任意の他のG P C R であってよいと解されるであろう。例えば、1つの種に由来するG P C R における安定化変異は、他の種に由来する第二のG P C R に転用してよい。同様に、1つの特定のG P C R アイソフォームにおける安定化変異は、異なるアイソフォームである第二のG P C R に転用してよい。好ましくは、第二の親G P C R は、第一の親G P C R と同じG P C R の分類又はファミリーのものである。系統発生解析は、タンパク質配列の類似性に基づいて、G P C R を3つの主な分類、すなわち、クラス1、2、及び3に分けており、それらのフェノタイプはロドプシン、セレクチンレセプター、及びメタボトロピックグルタメート受容体の各々である（Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288）。かくして、第二のG P C R は、第一の親G P C R と同じG P C R の分類のG P C R であってよい。同様に、G P C R は、グルタメート及びGABAなどの天然のリガンドによってファミリーに分類されている。かくして、第二のG P C R は、第一の親G P C R と同じG P C R ファミリーのものであってよい。G P C R の分類及びファミリーの一覧は、International Union of Pharmacology (Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288) によって作成されており、その一覧は<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>で定期的に更新されている。

20

#### 【0120】

第二の親G P C R は、第一のG P C R における変異の対応する位置を第二のG P C R において決定し得るように、第一の親G P C R と整列（アライン）することが可能でなくはならないと解されるであろう。かくして、典型的には、第二の親G P C R は、前記第一の親G P C R に対して少なくとも20%の配列同一性を有し、より好ましくは第一の親G P C R に対して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%の配列同一性を有する。しかしながら、幾つかのG P C R は、低い配列同一性を有しており（例えば、ファミリーB及びCのG P C R）、同時に構造においては非常に似ている。かくして、20%の配列同一性のしきい値は絶対的なものではない。

30

#### 【0121】

##### 方法 4

40

本発明者は、増大した安定性を有するG P C R 変異体における1つ又は複数の変異が存在する構造モチーフの同定が、増大した安定性を有する更なるG P C R 変異体を製造するのに有用であろうと考えた。

#### 【0122】

したがって、親Gタンパク質共役型受容体（G P C R）と比較して増大した安定性を有

50

する G P C R 変異体を製造するための更なる方法は、

a . 第一の親 G P C R と比較して増大した安定性を有する第一の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体を提供する工程、

b . 1 つ又は複数の変異体が第一の親 G P C R と比較して少なくとも 1 つの異なるアミノ酸残基を有する、 1 つ又は複数の構造モチーフを構造膜タンパク質モデルにおいて同定する工程、及び

c . 第二の親 G P C R における 1 つ又は複数の対応する構造モチーフを規定するアミノ酸配列における 1 つ又は複数の変異を作製し、第二の親 G P C R と比較して増大した安定性を有する第二の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異を提供する工程

を含む。

10

#### 【 0 1 2 3 】

1 つ又は複数の既知の構造モデルにおいて安定化変異をマッピングすることを使用して、その様な安定化変異を有する特定の構造モチーフを同定してよい。本発明者は、その様なモチーフを同定するために、 2 - アドレナリン受容体の構造モデルに対して 1 アドレナリン受容体の安定化変異をマッピングした (Rasmussen et al (2007) Nature 450, 3 83-387; Cherezov et al (2007) Science 318:1258-65; Rosenbaum et al (2007) Science 318:1266-1273)。例えば、表 (v i ) は、本発明者がヒト 2 - アドレナリン受容体に対してマッピングしたシチメンチョウ 1 - アドレナリン受容体変異体を挙げており、それらが存在する対応する構造モチーフを記載している。実施例 4 に記載のように、 Y 2 27 A 变異 (ヒト <sub>2</sub> 受容体の Y 219 に対応する) のヒト <sub>2</sub> アドレナリン受容体に対するマッピングは、変異がヘリックス界面におけるパッキングを改善し得るように、ヘリックス間の界面に位置することを明らかにする (実施例 15, 16, 及び 23 参照)。同様に、 M 90 V 变異 (ヒト <sub>2</sub> 受容体における M 82 に対応する) のヒト <sub>2</sub> - 受容体に対するマッピングは、ヘリックスが折れ曲がる (キンク) 部分でヘリックス 2 に変異が存在することを明らかにする (図 15, 16, 及び 20 参照)。他の変異は、脂質二重膜、疎水性 - 親水性境界領域、タンパク質結合ポケット、及びループ領域に向いている膜貫通ヘリックス表面を含む更なる構造モチーフに存在することが認められた (表 (v i ) 及び 図 18 - 19, 21 - 22, 及び 24 - 25)。

20

#### 【 0 1 2 4 】

その様な構造モチーフは、安定化変異を含有することによって、タンパク質の安定性の決定に重要である。したがって、これらのモチーフを変異の標的とすることは、安定化 G P C R 変異体の產生を容易にするであろう。事実、同じ構造モチーフに 2 以上の変異がマップされた複数の例が存在する。例えば、シチメンチョウ 1 アドレナリン受容体 Y 227 A, V 230 A, 及び A 234 L 变異は、同じヘリックス界面にマップされ、 V 89 L 及び M 90 V 变異は同じヘリックスの折れ曲がり (キンク) にマップされ、 F 327 A 及び A 334 L 变異は脂質二重膜に向いた同じヘリックス表面にマッピングされた (表 (v i ))。かくして、 1 つの安定化変異が同定された際は、変異が存在する構造モチーフの決定は、更なる安定化変異の同定を可能にするであろう。

30

#### 【 0 1 2 5 】

第一の親 G P C R の 1 つ又は複数の変異体は、上述した方法の任意のものに従って選択又は調製されてよい。したがって、この方法を、変異誘発により安定で立体構造が固定された G P C R を作製するために使用してもよい。例えば、特定の立体構造における増大された安定性を有する G P C R 変異体の選択の後に、その様な安定化変異が存在する構造モチーフを同定してよい。他の G P C R において、対応する構造モチーフを規定するアミノ酸配列における 1 つ又は複数の変異を作製することが、次いで、親 G P C R と比較して特定の立体構造において増大された安定性を有する G P C R 変異体を製造するために使用されてよい。

40

#### 【 0 1 2 6 】

本発明者は、ヒト -2 A R, ラット N T R 1, シチメンチョウ -1 A R, ヒトアデノシン A 2 a R, 及びヒトムスカリン M 1 受容体のアミノ酸配列 (図 17) の多重配列ア

50

ラインメントを実施し、同定された熱安定化変異（実施例1から3）が前記配列に存在する際は、全部で70のうち11例において、2つの配列が同じ位置で変異を有していることが示されている（図17において星印で示す）。いずれかの理論につなげることを意図しないが、本発明者は、これらの位置の熱安定化変異は、構造膜タンパク質モデルにマッピングするための促進された転用可能性を有するものであるはずである。かくして、1つの実施態様では、第一の親G P C Rの変異体は、対応する親受容体と比較した際に、図17に記載のヒト-2 A Rの番号付けした以下の位置：Ala 59, Val 81, Ser 143, Lys147, Val 152, Glu 180, Val 222, Ala 226, Ala 271, Leu 275 及びVal 317の任意の1つ又は複数に対応する位置で異なるアミノ酸を有する、ヒト-2 A R、ラットN T R 1、シチメンチョウ-1 A R、ヒトアデノシンA 2 a R、又はヒトムスカリンM 1受容体である。

10

## 【0127】

1つ又は複数の構造モチーフを同定するために、安定化変異を膜タンパク質の既知の構造にマッピングする。

## 【0128】

「膜タンパク質」によって、細胞又はオルガネラの膜に結合又は接合するタンパク質を意味する。好ましくは、前記膜タンパク質は、膜に持続的に組み込まれ、脂質二重層を物理的に破壊する界面活性剤、非極性溶媒、又は変性剤を用いてのみ除去され得る内在性膜タンパク質である。

20

## 【0129】

膜タンパク質の構造モデルは任意の適切な構造モデルであってよい。例えば、前記モデルは、既知の結晶構造であってよい。G P C R結晶構造の例は、ウシロドブシン（Palczewski, K. et al., Science289, 739-745. (2000)）及びヒト-2アドレナリン受容体（Rasmussen et al, Nature 450, 383-7 (2007); Cherezov et al (2007) Science 318:1258-65; Rosenbaum et al (2007) Science 318:1266-1273）を含む。ヒト-2アドレナリン受容体構造の座標は、RCSB Protein Data Bankにおいて2rh1, 2r4r 及び2r4sの登録番号で認められる。代替的には、構造モデルは、ホモロジーに基づくか又はde novo構造予測法を使用して、コンピューターによって生成されるモデルであってよい（Qian et al Nature (2007) 450: 259-64）。

30

## 【0130】

所定のG P C R変異体の安定化変異は、G P C Rに対して十分な構造類似性を有する任意の膜タンパク質の構造モデルにマッピングされてよい。特に、膜タンパク質のドメインは、転用可能な所定の変異について、安定化変異が存在するG P C Rドメインに対して十分な構造類似性を有する。

## 【0131】

タンパク質ドメインは、典型的には、単独のタンパク質として単独で存在するか又は他のドメインとの組み合わせにおける大きなタンパク質の一部であってよい二次構造要素の個別的に折りたたまれた集合として規定される。一般的には、機能的な進化単位である。

## 【0132】

G P C Rは本質的には大きなN末端ドメインを有するものを除く単独のドメインタンパク質である。したがって、典型的には、その構造モデルは、G P C Rに対して十分な類似性を有する少なくとも1つのドメインを含む膜タンパク質のものである。

40

## 【0133】

構造類似性は、配列同一性の分析によって間接的に又は構造の比較によって直接的に決定されてよい。

## 【0134】

配列同一性に関しては、変異体が第一の親G P C Rと比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有するG P C Rドメインをコードするアミノ酸配列を、構造モデルが利用可能な膜タンパク質のドメインをコードするアミノ酸配列と整列（アライン）する。これらの配列の1つ又は複数は、主要保存ドメインに加えて、挿入配列又はN末端若しくはC

50

末端伸長を含有してよい。最適なアラインメントのために、その様な配列は、分析を歪めないように除外する。問題のドメインに亘る十分な配列同一性を有する膜タンパク質を、次いで、変異をマッピングするための構造モデルとして使用してよい。可溶性タンパク質ドメインについては、それらの3D構造は、配列同一性が増大すると100%まで増大する構造保存のレベルとともに、約20%の配列同一性で広範に保存されており、良好には30%超の同一性で保存されていることが示されている (Ginalski,K. Curr Op Struc Biol (2006) 16, 172-177)。かくして、構造膜タンパク質モデルが、第一の親GPCRと比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を含有するGPCRドメイン変異体と少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%、さらに好ましくは少なくとも95%又は99%の配列同一性を共有するドメインを含有する膜タンパク質のモデルである。

10

#### 【0135】

配列同一性は、BLAST又はPSI-BLAST (Altschul et al, NAR (1997), 25, 3389-3402)などのアルゴリズム又はHidden Markov Models (Eddy S et al, J Comput Biol (1995) Spring 2 (1)9-23)に基づく方法を使用して測定してよい。典型的には、2つのポリペプチドの間の配列同一性の%は、任意の適切なコンピュータープログラム、例えば、University of Wisconsin Genetic Computing GroupのGAPプログラムを使用して測定してよく、配列が最適に整列(アライン)されたポリペプチドに関して同一性の%を計算すると解されるであろう。そのアラインメントは、代替的には、ClustalWプログラムを使用して実施されてよい (Thompson et al., 1994)。使用するパラメータは、以下: Fast pairwise alignment parameters: K-tuple(word) size; 1, window size; 5, gap penalty; 3, number of top diagonals; 5. Scoring method: x percent. Multiple alignment parameters: gap open penalty; 10, gap extension penalty; 0.05. Scoring matrix: BLOSUMのものであってよい。

20

#### 【0136】

配列同一性に加えて、構造類似性が、構造モデルの比較によって直接的に決定されてよい。構造モデルを使用して、配列中で連続的であるか又はそうでなくてよい、配列分析のみからは明らかでない構造類似領域を検出してよい。例えば、ファミリーB及びCのGPCRは類似した構造を共有すると解されているが、それらの配列同一性は非常に低い。同様に、水輸送アクリアポリンであるホウレンソウSopip2、大腸菌Aquaporin、メタノコッカスAquaporin、ラットAquaporin4、ヒトAquaporin1、及びヒツジAquaporin0は、低い配列同一性を共有しているが、それら全ては類似した構造を有する。

30

#### 【0137】

高い忠実性の構造モデルが、構造が相同的なタンパク質の既知の構造に基づいてモデルを作製するMODELLER (Sali A and Blundell T, J Mol Biol (1993) 234(3) 779-815)などの標準的なソフトウェアパッケージを使用して未知の構造のタンパク質について作製されてよい。その様なモデリングは、配列同一性の増大とともに改善する。典型的には、未知の構造の配列と既知の3D構造の配列との間の配列同一性は、30%超である (Ginalski,K. Curr Op Struc Biol (2006) 16, 172-177)。加えて、配列のみに基づくde novo構造予測法を使用して、未知の構造のタンパク質のモデルを作製してよい (Qian et al, (2007) Nature 450:259-64)。構造を実験的に測定又はモデリングによって導き出すと、構造類似領域が、2以上の3D構造の直接的な比較によって検出されてよい。それらは、例えば、DALI (Holm, L and Sander, C (1996) Science 273, 595-603)などのソフトウェアを使用して検出可能な特定の構造及びトポロジーといった二次的な構造要素を含んでよい。それらは、アミノ酸側鎖及びポリペプチド主鎖の局所的な配列、特定の空間配置における原子の特定のセット若しくは原子のグループを含んでよく、例えば、グラフ理論的表現を使用して検出されてもよい (Artymiuk,P et al, (2005) J Amer Soc Info Sci Tech 56 (5) 518-528)。この手法において、比較するタンパク質又はタンパク質の領域内の原子又は原子のグループが、典型的には、ノードの間の角度及び間隔を表示するグラフのエッジとともにグラフのノードとして表わされる。これらのグラフにお

40

50

ける共通のパターンは、共通の構造モチーフを示す。この手法が拡張されて、水素結合ドナー若しくはアクセプター、疎水性、形状、電荷、又は芳香性などの原子又は原子のグループの任意の記述子を含んでよく、例えば、G R I D 及び類似性調査のための基礎として使用される当該表示を使用して、その様な記述子にしたがってタンパク質が空間的にマッピングされてよい。前記方法、ソフトウェアの利用可能性、及び使用者の規定するパラメータ、しきい値、及び許容値の選択のためのガイドラインの説明は上述の参考文献に記載している。

## 【0138】

好ましい実施態様では、構造膜タンパク質モデルは構造 G P C R モデルである。G P C R の構造モデルは、第一の親 G P C R のモデルであってよいと解されるであろう。例えば、増大された安定性を有する G P C R 変異体内の安定化変異は、第一の親 G P C R 構造及びその様な変異が存在する構造モチーフに直接マッピングされてよい。第一の親 G P C R の構造が未知である場合は、他の G P C R の構造モデルを使用してよい。例えば、1つの種に由来する G P C R の安定化変異は、他の種に由来する同じ G P C R の既知の構造モデルにマッピングされてよい。同様に、1つの特定の G P C R アイソフォームにおける安定化変異は、他の G P C R アイソフォームの既知の構造モデルにマッピングされてよい。さらに、1つの G P C R に由来する安定化変異は、同じ分類又はファミリーの他の G P C R にマッピングしてよい。G P C R の分類及びファミリーの一覧は、International Union of Pharmacology (Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288) によって作成されており、当該一覧は、<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>で定期的に更新されている。

10

20

30

40

## 【0139】

上述のように、構造モデルが、G P C R 変異体が第一の親 G P C R と比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸を有するドメインに亘って十分な構造類似性を有する任意の G P C R のものであってよいと解されるであろう。かくして、G P C R が、第一の親 G P C R と比較して少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を含有するタンパク質ドメインに亘って、第一の親 G P C R の変異体と少なくとも 20 %、より好ましくは少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、又は 90 %、さらに好ましくは少なくとも 95 % 又は 99 % の配列同一性を共有することが好ましい。しかしながら、発明者は、20 % の配列同一性のしきい値は絶対的なものではないと認識している。第一の親 G P C R に対して 20 % 未満の配列同一性を有する G P C R は、低い配列同一性が他の類似性、例えば、第一の親 G P C R と比較して同じ配列モチーフの存在、同じ G - タンパク質に対する結合、又は同じ機能を有すること、或いは同じ疎水性親水性指標のプロットを有することによって相殺される場合に、安定化変異が転用される構造モデルとしても役に立ち得る。

## 【0140】

構造モデルに対する安定化変異のマッピングは、当該技術分野において既知の適切な任意の方法を使用して実施されてよい。例えば、典型的には、構造モデルが利用可能な G P C R のアミノ酸配列を、第一の親 G P C R の変異体のアミノ酸配列と整列（アライン）する。第一の親 G P C R と関係する、G P C R 変異体の少なくとも1つの異なるアミノ酸残基の1つ又は複数の位置は、構造モデルが利用可能な G P C R のアミノ酸配列に存在してよい。

## 【0141】

「構造モチーフ」によって、熱安定化変異の G P C R 構造モデルにおける位置の三次元的記載を含める。例えば、構造モチーフは、G P C R の内部の任意の二次又は三次構造モチーフであってよい。「三次構造モチーフ」によって、水素結合ドナー若しくはアクセプター、疎水性、形状、電荷、又は芳香性などの原子又は原子のグループの任意の記述子を含める。例えば、タンパク質は、G R I D 及び構造モチーフを規定するための基礎として使用される当該表示を使用してその様な記述子にしたがって空間的にマッピングされてよい (Baroni et al (2007) J Chem Inf Mod 47, 279-294)。

## 【0142】

50

表(vi)は、安定化変異が存在することが認められるシチメンチョウ 1アドレナリン受容体の構造モチーフを挙げている。表から認められるように、変異は多数の異なる位置に存在している。3つの変異が、水性溶媒に接近可能であることが予測されるループ領域に存在する。8つの変異が、膜貫通 - ヘリックスに存在し、脂質二重層に向いており；これらの変異のうち3つが、ヘリックスの末端近辺であり、疎水性 - 親水性境界層にあると解されてよい。8つの変異は、膜貫通 - ヘリックスの間にあり、そのうち3つはヘリックスの折れ曲げられた(キンクされた)又は歪められた領域のいずれかに存在し、他の2つの変異は1つのヘリックスに存在するが、変異残基に対する空間に近接した折れ曲がり(キンク)を含む1つ又は複数の他のヘリックスと近接していると認められる。これらの後者の変異は、折れ曲がり(キンク)領域内のアミノ酸のパッキングに作用し、熱安定性を生じさせ得る。他の変異は基質結合ポケットに存在する。

10

## 【0143】

したがって、1つの実施態様では、構造モチーフは、ヘリックス界面、ヘリックス折れ曲がり(キンク)、ヘリックス折れ曲がり(キンク)の逆のヘリックス、脂質二重層に向いたヘリックス表面、疎水性 - 親水性境界層における脂質二重層に向いたヘリックス表面、ループ領域、又はタンパク質結合ポケットのいずれかである。

20

## 【0144】

安定化変異が存在する構造モチーフの同定は、タンパク質安定性におけるモチーフの重要性を示唆する。したがって、対応する1つ又は複数の構造モチーフを規定するアミノ酸配列における1つ又は複数の変異の作製は、第二の親GPCRと比較して増大した安定性を有する第二の親GPCRの1つ又は複数の変異体を提供するはずである。

20

## 【0145】

構造モチーフを規定するアミノ酸配列は、タンパク質の二次又は三次構造において結合して構造モチーフを形成する、アミノ酸残基の一次アミノ酸配列である。その様な一次アミノ酸配列が連続的又は非連続的なアミノ酸残基を含んでよいと解されるであろう。かくして、構造モチーフを規定するアミノ酸配列の同定は、関与する残基を決定し、配列を実質的に規定することを伴うであろう。変異は、例えば、上述のように、当該技術分野においてよく確立された技術を使用して、アミノ酸配列において作製されてよい。

## 【0146】

「対応する1つ又は複数の構造モチーフ」によって、第二の親GPCRに存在する構造モデルにおいて同定される一つ又は複数の類似構造モチーフを意味する。例えば、ヘリックス界面を同定する場合には、第二の親GPCRにおける対応するヘリックス界面は、構造モデルに存在するヘリックスに類似するヘリックスの間の界面であろう。ヘリックスの折れ曲がり(キンク)を同定した場合には、対応するヘリックスの折れ曲がり(キンク)は、構造モデルに存在する折れ曲がった(キンク)ヘリックスに類似するヘリックスにおける折れ曲がり(キンク)であろう。第二の親GPCRにおける1つ又は複数の類似する構造モチーフは、例えば配列アラインメントによって、構造モデルにおける1つ又は複数のモチーフを規定する第二の親GPCRの配列中の類似のアミノ酸配列を検索することによって同定されてよい。さらに、コンピューターに基づくアルゴリズムは、当該技術分野において広く利用可能であり、アミノ酸配列に基づくタンパク質モチーフの存在の予測に使用されてよい。かくして、アミノ酸配列内の特定のモチーフの相対的な位置及び他のモチーフに関連する位置に基づいて、類似する構造モチーフが容易に同定されてよい。第二の親GPCRの構造モデルが利用可能である場合に、類似する1つ又は複数の構造モチーフがタンパク質の構造に対して直接マッピングされてよいと解されるであろう。典型的には、類似する構造モチーフを規定するアミノ酸配列は、構造モデルにおいてモチーフを規定する配列と少なくとも20%、より好ましくは30%、40%、50%、60%、70%、80%、及び90%、並びにさらに好ましくは95%及び99%の配列同一性を有する。

40

## 【0147】

1つの実施態様では、第二の親GPCRは第一の親GPCRである。誤解を避けるため

50

に言及すると、第二の親 GPCR は、第一の親 GPCR の天然の配列を有してよく、又は切断型であってよく、又は天然タンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

#### 【0148】

代替的な態様において、第二の親 GPCR は、第一の親 GPCR ではない。例えば、増大した安定性を有する第一の親 GPCR の変異体が同定されてよいが、増大した安定性を有する異なる GPCR の変異体を產生することが望ましい。好ましくは、第二の親 GPCR は、上述の第一の親 GPCR と同じ GPCR の分類又はファミリーのものである。しかしながら、第二の親 GPCR が任意の既知の GPCR であってよいが、第一の親 GPCR の変異体の安定化変異が存在する対応する構造モチーフを含有するように、第一の親 GPCR と顕著な構造類似性を共有すると解されるであろう。かくして、典型的には、第二の親 GPCR が、第一の親 GPCR と少なくとも 20%、より好ましくは少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は 90% の配列同一性を有する。しかしながら、上述のように、幾つかの GPCR は、低い配列同一性を有するが（例えば、ファミリー B 及び C の GPCR）、構造において類似する。かくして、20% の配列同一性のしきい値は絶対的なものではない。

10

#### 【0149】

増大された安定性について GPCR においてスクリーニングされ得る数千の変異体が潜在的に存在するため、安定性に対する寄与において重要であることが既知の特定の変異を標的とすることが有利である。したがって、方法 3 及び 4 は、増大した安定性を有する GPCR 変異体を選択する方法において使用してよいと解されるであろう。特に、方法 3 及び 4 を実施して、安定性の決定に重要な構造モチーフを規定する特定のアミノ酸残基又はアミノ酸配列に対する変異を標的としてよい。

20

#### 【0150】

したがって、1つの実施態様では、方法 3 及び 4 は、  
 (I) 特定の立体構造を備えた第二の親 GPCR に結合するものであるリガンドを選択する工程、  
 (II) 第二の親 GPCR の変異体又はその各々が、特定の立体構造を備える際に、同じ特定の立体構造を備えている第二の親 GPCR のリガンド結合についての安定性と比較して、選択したリガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び  
 (III) 選択したリガンドの結合に関して第二の親 GPCR と比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程  
 をさらに含む。

30

#### 【0151】

工程 (I)、(II)、及び (III) は、上述の方法 1 の工程 (b)、(c)、及び (d) に対応することに留意されたい。したがって、リガンド及び安定性を評価する方法は、好ましくは方法 1 に関して上述しているものである。

40

#### 【0152】

親 GPCR と比較して増大した安定性を有する任意の GPCR 変異体、例えば、上述した方法 1 ~ 4 のいずれかによって提供されるものを本発明において使用してよい。例えば、親 GPCR と比較して増大した安定性を有する GPCR 変異体、特に増大した熱安定性を有するものを使用してよい。本発明における使用に適した GPCR 変異体の特定例は以下で提供される。

#### 【0153】

1つの実施態様では、当該 GPCR 変異体は、親受容体と比較して、以下の位置：(i)  
 ) 図 9 に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けによる： Ile 55  
 , Gly 67 , Arg 68 , Val 89 , Met 90 , Gly 67 , Ala 184 , Arg 199 , Ala 203 , Leu 208 , Glu 210 , Ser 213 , Glu 219 , Arg 220 , Ser 223 , Thr 224 , Glu

50

226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser  
 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln  
 311, Pro 313, Lys 315、(i i i) 図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる: Ala 69, Leu 72, Ala 73, Ala  
 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 10  
 9, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 13  
 9, Phe 147, Ala 155, Val 165, Glu 166, Lys 17  
 6, Ala 177, Thr 179, Met 181, Ser 182, Arg 18  
 3, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 21  
 5, Val 229, Met 250, Ile 253, Leu 256, Ile 26 10  
 0, Asn 262, Val 268, Asn 270, Thr 279, Met 29  
 3, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 31  
 0, Val 313, Phe 342, Asp 345, Tyr 349, Tyr 35  
 1, Ala 356, Phe 358, Val 360, Ser 362, Asn 37  
 0, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Cys 386, Pro 38  
 9, Gly 390, Trp 391, Arg 392, His 393, Arg 39  
 5, Lys 397, Pro 399、及び(iv) 図17に記載のムスカリン受容体の番号付けによる: Leu 65, Met 145, Leu 399, Ile 383及びMet 384の任意の1つ又は複数に対応する位置に、少なくとも1つの異なるアミノ酸を有するGPCR変異体である。 20

## 【0154】

図17に示すシチメンチョウ 1AR、ヒトアデノシン受容体、ラットニューロテンシン受容体、及びヒトムスカリン受容体アミノ酸配列のアラインメントは、70のうちの1例において、2つの配列が同じ位置、すなわち、図17に記載のヒト 2ARの番号付けした以下の位置: Ala 59, Val 81, Ser 143, Lys 147, Val 152, Glu 180, Val 222, Ala 226, Ala 271, Leu 275 及びVal 317に変異を含有することを示す。従って、更なる実施態様では、当該GPCR変異体は、親受容体と比較して、これらの位置の任意の1つに異なるアミノ酸を有するものである。

## 【0155】

## - アドレナリン受容体変異体

- アドレナリン受容体は当該技術分野においてよく知られている。それらは互いに配列相同性を共有し、アドレナリンに結合する。 30

## 【0156】

1つの実施態様では、当該GPCR変異体は、対応する野生型の - アドレナリン受容体と比較した際に、図9に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、 40 - アドレナリン受容体変異体である。

## 【0157】

- アドレナリン受容体変異体は、任意の - アドレナリン受容体変異体であってよいが、所定のシチメンチョウ - アドレナリン受容体アミノ酸配列に参照されるアミノ酸の位置の1つ又は複数において変異されている。

## 【0158】

GPCR変異体が、MacVector及びCLUSTALW (Thompson et al (1994) Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680)を使用して測定すると、前記所定のシチメンチョウ

- アドレナリン受容体配列と比較した際に少なくとも20%アミノ酸配列同一性を有する者であることが特に好ましい。より好ましくは、前記受容体変異体は、少なくとも30

10

20

30

40

50

%、少なくとも40%、又は少なくとも50%のアミノ酸配列同一性を有する。一般的に、より高い程度のアミノ酸同一性が、天然のリガンドが結合するオルトステリック（「活性」）部位の付近では保存されている。

#### 【0159】

以下の実施例1及び図1に記載のように、親シチメンチョウ - アドレナリン配列（図9に示す）における以下のアミノ酸残基：Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338の個々の置換は、熱安定性の増大を引き起す。

#### 【0160】

かくして、親と比較した際に、これらのアミノ酸残基の1つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているシチメンチョウ - アドレナリン受容体変異体を使用してよい。親受容体における1つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来する - アドレナリン受容体変異体も使用してよい。

#### 【0161】

1つの実施態様では、当該G P C R変異体は、構造モチーフに少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有する - アドレナリン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図9に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338. のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

#### 【0162】

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有する - アドレナリン受容体であってよく、又はその切断型であってよく、又は天然のタンパク質又はその断片との融合体であってよく、又はリガンド結合能を保持している天然配列と比較して変異を含有してよい。

#### 【0163】

「対応するアミノ酸残基」によって、シチメンチョウ - アドレナリン受容体と他の - アドレナリン受容体をMacVector及びCLUSTALWを使用して比較する際に、シチメンチョウ - アドレナリン受容体中の所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他の - アドレナリン受容体のアミノ酸残基が含まれる。

#### 【0164】

図9は、シチメンチョウ - アドレナリン受容体ヒト 1、2、及び 3 - アドレアナリン受容体との間のアラインメントを示す。

#### 【0165】

ヒト 1 の Ile 72 はシチメンチョウ - アドレナリン受容体の Ile 55 と対応し；ヒト 2 の Ile 47 はシチメンチョウ - アドレナリン受容体の Ile 55 と対応し；ヒト 3 の Thr 51 がシチメンチョウ - アドレナリン受容体の Ile 55 と対応していることが認められる。ヒト 1、2、及び 3 における他の対応するアミノ酸残基は図9を参照して容易に同定することが可能である。

#### 【0166】

特定のアミノ酸がAlaに置き換えられることが好ましい。しかしながら、特定のアミノ酸残基がAlaである際は、Leuで置きかえられることが好ましい（例えば、図1におけるシチメンチョウ - アドレナリン受容体のAla 234、Ala 282、及びAla 334）。

#### 【0167】

さらに大きい安定性が与えられる可能性があるため、 - アドレナリン受容体は、2以上のアミノ酸の位置において、親と比較して異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒト 1 受容体変異体は、以下のアミノ酸残基：K85, M107, Y244, A316, F36

10

20

30

40

50

1 及び F372の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する残基である場合を除く）。

【 0 1 6 8 】

上述の 3 又は 4 又は 5 又は 6 の変異の組み合わせを有するヒト 1 受容体変異体を調製する。

【 0 1 6 9 】

特に好ましいヒト 2 受容体変異体は、以下のアミノ酸：K60, M82, Y219, C265, L310 及びF321の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

10

【 0 1 7 0 】

上述の 3 又は 4 又は 5 又は 6 の変異の組み合わせを有するヒト 2 受容体変異体が好ましい。

【 0 1 7 1 】

図 2 6 は、 1 - m 2 3 における 6 の熱安定化変異 (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) は、ヒト 2 受容体に転用して（対応する変異K60S, M82V, Y219A, C265L, L310 A, F321M）、ヒト 2 - m 2 3 を作製した際の熱安定性に対する効果を示す。ヒト 2 及び 2 - m 2 3 の Tm は、 29 及び 41 の各々であり、かくして、熱安定化変異を 1 つの受容体から他の受容体に転用可能であることが例示される。したがって、特に好ましいヒト 2 受容体変異体は、K60S, M82V, Y219A, C265L, L310A, F321M の変異を含むものである。

20

【 0 1 7 2 】

特に好ましいヒト 3 受容体変異体は、以下のアミノ酸：W64, M86, Y224, P284, A330 及びF341の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられたものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

30

【 0 1 7 3 】

上述の 3 又は 4 又は 5 又は 6 の変異の組み合わせを有するヒト 3 受容体変異体が、好ましい。

【 0 1 7 4 】

特に好ましい変異の組み合わせは、実施例 1 の表 1 及び 2 に詳細に記載しており、適切な変異体は、シチメンチョウ - アドレナリン受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例 1 の表 1 及び 2 に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている、 - アドレナリン受容体変異体も含む。

40

【 0 1 7 5 】

特に好ましい変異体は、シチメンチョウ - アドレナリン受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸に変異を含有するものである (R68S, Y227A, A282L, A334L) (下記の表 2 の m6-10 参照); (M90V, Y227A, F338M) (下記の表 2 の m7-7 参照); (R68S, M90V, V230A, F327A, A334L) (下記の表 2 の m10-8 参照); 及び (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) (下記の表 2 の m23 参照)。

【 0 1 7 6 】

アデノシン受容体変異体

アデノシン受容体は当該技術分野においてよく知られている。それらは互いに配列相同意を共有し、アデノシンに結合する。

【 0 1 7 7 】

1 つの実施態様では、当該 GPCR 変異体は、対応する野生型アデノシンと比較した際に、図 1 0 に記載のヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体の番号付けによる以下の位置: Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala

50

203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg  
 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His  
 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu  
 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys  
 315, Ala 54, Val 57, His 75, Thr 88, Gly 114,  
 Gly 118, Thr 119, Lys 122, Gly 123, Pro 149,  
 Glu 151, Gly 152, Ala 203, Ala 204, Ala 231,  
 Leu 235, Val 239の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、アデノシン受容体変異体である。

## 【0178】

10

アデノシン受容体変異体は任意のアデノシン受容体の変異体であってよいが、所定のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体アミノ酸配列を参照して記載されるアミノ酸位置の1つ又は複数において変異されている。

## 【0179】

20

MacVector及びCLUSTALWを使用して測定すると、GPCR変異体が所定のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体配列を比較した際に、少なくとも20%の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、GPCR変異体は、少なくとも30%又は少なくとも40%又は少なくとも50%又は少なくとも60%の配列同一性を有する。典型的には、より高い程度の配列保存がアデノシン結合部位に存在する。

## 【0180】

20

以下の実施例2に記載するように、(図10に示す)ヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体配列の以下のアミノ酸残基:Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315の個々の置き換えは、アゴニストである5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン(NECAP)を使用して測定した際の熱安定性における増大を引き起こす。

## 【0181】

(図10に示す)ヒトA<sub>2a</sub>受容体配列における以下のアミノ酸残基:Ala 54, Val 57, His 75, Thr 88, Gly 114, Gly 118, Thr 119, Lys 122, Gly 123, Pro 149, Glu 151, Gly 152, Ala 203, Ala 204, Ala 231, Leu 235, Val 239の置き換えは、アンタゴニストであるZM 241385(4-[2-[[7-アミノ-2-(2-フリル)[1,2,4]-トリアゾロ[2,3-] [1,3,5]トリアジン-5-イル]アミノ]エチル]フェノール)を使用して測定した際の熱安定性の増大を引き起こす。

30

## 【0182】

かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の1つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体変異体を使用してよい。親受容体における1つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するアデノシン受容体変異体も使用してよい。

## 【0183】

40

1つの実施態様では、当該GPCR変異体は、構造モチーフに少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有するアデノシン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2a</sub>受容体の番号付けによる以下の位置:Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315.のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

## 【0184】

50

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するアデノシン受容体であ

ってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

#### 【0185】

「対応するアミノ酸残基」によって、ヒトアデノシン受容体 A<sub>2a</sub> 受容体及び他のアデノシン受容体を MacVector 及び CLUSTALW を用いて比較する際に、ヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体における所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他のアデノシン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。

#### 【0186】

図 10 は、ヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体及び 3 種の他のヒトアデノシン受容体（A<sub>2b</sub>、A<sub>3</sub>、及び A<sub>1</sub>）の間のアラインメントを示す。 10

#### 【0187】

例えば、A<sub>2b</sub> 受容体（AA2BR と示されている）における Ser115 が A<sub>2a</sub> 受容体の Gly114 と対応することが認められる。同様に、A<sub>3</sub> 受容体（AA3R と示されている）における Ala60 が A<sub>2a</sub> 受容体における Ala54 に対応することが認められる。ヒトアデノシン受容体 A<sub>2b</sub>、A<sub>3</sub>、及び A<sub>1</sub> における他の対応するアミノ酸残基は、図 10 を参照して容易に同定することが可能である。

#### 【0188】

親の特定のアミノ酸が Ala に置き換わることが好ましい。しかしながら、親の特定のアミノ酸残基が Ala である際は、Leu で置き換えることが好ましい。 20

#### 【0189】

アデノシン受容体変異体が、2 以上のアミノ酸の位置において親と比較して異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒトアデノシン A<sub>2b</sub> 受容体は、以下のアミノ酸残基：A55, T89, R123, L236 及び V240 の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換わっているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala 又は Val 又は Met 又は Leu 又は Ile で置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

#### 【0190】

3 又は 4 又は 5 の上述の変異を有するヒトアデノシン A<sub>2b</sub> 受容体変異体が好ましい。

#### 【0191】

特に好ましいヒトアデノシン A<sub>3</sub> 受容体は、以下のアミノ酸残基：A60, T94, W128, L2 32 及び L236 の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala 又は Val 又は Met 又は Leu 又は Ile で置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。 30

#### 【0192】

3 又は 4 又は 5 の上述の変異を有するヒトアデノシン A<sub>3</sub> 受容体変異体が好ましい。

#### 【0193】

特に好ましいヒトアデノシン A<sub>1</sub> 受容体は、以下のアミノ酸残基：A57, T91, A125, L2 36, 及び L240 の 1 つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala 又は Val 又は Met 又は Leu 又は Ile で置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。 40

#### 【0194】

変異の特に好ましい組み合わせは実施例 2 に詳細に記載している。適切な変異体は、これらのヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例 2 に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている他のアデノシン受容体変異体も含む。

#### 【0195】

特に好ましいアデノシン受容体変異体は、ヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸に変異を含有するものである（A54L, K122A, L235A）（Rant 17）；（A54L, T88A, V239A, A204L）（Rant 19）；及び（A54L, T88A, V239A, K 122A）（Rant 21）。 50

## 【0196】

## ニューロテンシン受容体変異体

ニューロテンシン受容体は当該技術分野において知られている。それらは配列相同性を共有し、ニューロテンシンに結合する。

## 【0197】

1つの実施態様では、当該G P C R変異体は、対応する野生型のニューロテンシン受容体と比較した際に、図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置:A l a 6 9 , L e u 7 2 , A l a 7 3 , A l a 8 6 , A l a 9 0 , S e r 1 0 0 , H i s 1 0 3 , S e r 1 0 8 , L e u 1 0 9 , L e u 1 1 1 , A s p 1 1 3 , I l e 1 1 6 , A l a 1 2 0 , A s p 1 3 9 , P h e 1 4 7 , A l a 1 5 5 , V a l 1 6 5 , G l u 1 6 6 , L y s 1 7 6 , A l a 1 7 7 , T h r 1 7 9 , M e t 1 8 1 , S e r 1 8 2 , A r g 1 8 3 , P h e 1 8 9 , L e u 2 0 5 , T h r 2 0 7 , G l y 2 0 9 , G l y 2 1 5 , V a l 2 2 9 , M e t 2 5 0 , I l e 2 5 3 , L e u 2 5 6 , I l e 2 6 0 , A s n 2 6 2 , V a l 2 6 8 , A s n 2 7 0 , T h r 2 7 9 , M e t 2 9 3 , T h r 2 9 4 , G l y 3 0 6 , L e u 3 0 8 , V a l 3 0 9 , L e u 3 1 0 , V a l 3 1 3 , P h e 3 4 2 , A s p 3 4 5 , T y r 3 4 9 , T y r 3 5 1 , A l a 3 5 6 , P h e 3 5 8 , V a l 3 6 0 , S e r 3 6 2 , A s n 3 7 0 , S e r 3 7 3 , P h e 3 8 0 , A l a 3 8 5 , C y s 3 8 6 , P r o 3 8 9 , G l y 3 9 0 , T r p 3 9 1 , A r g 3 9 2 , H i s 3 9 3 , A r g 3 9 5 , L y s 3 9 7 , P r o 3 9 9 の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、ニューロテンシン受容体変異体である。  
10

## 【0198】

M a c V e c t o r 及びC L U S T A L Wを使用して測定すると、G P C R変異体が所定のラットニューロテンシン受容体配列を比較した際に、少なくとも20%の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、G P C R変異体は、少なくとも30%又は少なくとも40%又は少なくとも50%又は少なくとも60%の配列同一性を有する。  
20

## 【0199】

ニューロテンシン受容体変異体は任意のニューロテンシン受容体変異体であってよいが、所定のラットニューロテンシン受容体アミノ酸配列を参照して言及されるアミノ酸位置の1つ又は複数で変異している。  
30

## 【0200】

以下の実施例3に記載しているように、(図11及び28に示す)ラットニューロテンシン受容体配列の以下のアミノ酸残基:L e u 7 2 , A l a 8 6 , A l a 9 0 , S e r 1 0 0 , H i s 1 0 3 , S e r 1 0 8 , L e u 1 0 9 , L e u 1 1 1 , A s p 1 1 3 , I l e 1 1 6 , A l a 1 2 0 , A s p 1 3 9 , P h e 1 4 7 , A l a 1 5 5 , L y s 1 7 6 , T h r 1 7 9 , M e t 1 8 1 , S e r 1 8 2 , P h e 1 8 9 , L e u 2 0 5 , T h r 2 0 7 , G l y 2 0 9 , G l y 2 1 5 , L e u 2 5 6 , A s n 2 6 2 , V a l 2 6 8 , M e t 2 9 3 , A s p 3 4 5 , T y r 3 4 9 , T y r 3 5 1 , A l a 3 5 6 , P h e 3 5 8 , S e r 3 6 2 , A l a 3 8 5 , C y s 3 8 6 , T r p 3 9 1 , A r g 3 9 2 , H i s 3 9 3 , L y s 3 9 7 , P r o 3 9 9 の個々の置き換えは、ニューロテンシンの不在下について考えた際に熱安定性における増大を引き起こす。  
40

## 【0201】

以下の実施例3に記載のように、(図11及び28に記載の)ラットニューロテンシン受容体配列における以下のアミノ酸残基:A l a 6 9 , A l a 7 3 , A l a 8 6 , A l a 9 0 , H i s 1 0 3 , V a l 1 6 5 , G l u 1 6 6 , A l a 1 7 7 , A r g 1 8 3 , G l y 2 1 5 , V a l 2 2 9 , M e t 2 5 0 , I l e 2 5 3 , I l e 2 6 0 , T h r 2 7 9 , T h r 2 9 4 , G l y 3 0 6 , L e u 3 0 8 , V a l 3 0 9 , L e u 3 1 0 , V a l 3 1 3 , P h e 3 4 2 , P h e 3 5 8 , S e r 3 6 2 , A l a 3 8 5 , C y s 3 8 6 , T r p 3 9 1 , A r g 3 9 2 , H i s 3 9 3 , L y s 3 9 7 , P r o 3 9 9 の個々の置き換えは、ニューロテンシンの存在下について考えると、熱安定性における増大を引き起こす。  
50

## 【0202】

かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の1つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているラットニューロテンシン受容体変異体を使用してよい。親受容体における1つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するニューロテンシン受容体変異体も使用してよい。

## 【0203】

1つの実施態様では、当該G P C R変異体は、構造モチーフに少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有するニューロテンシン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置:A l a 6 9 , L e u 7 2 , A l a 7 3 , A l a 8 6 , A l a 9 0 , S e

r 1 0 0 , H i s 1 0 3 , S e r 1 0 8 , L e u 1 0 9 , L e u 1 1 1 , A s  
p 1 1 3 , I l e 1 1 6 , A l a 1 2 0 , A s p 1 3 9 , P h e 1 4 7 , A l  
a 1 5 5 , V a l 1 6 5 , G l u 1 6 6 , L y s 1 7 6 , A l a 1 7 7 , T h  
r 1 7 9 , M e t 1 8 1 , S e r 1 8 2 , A r g 1 8 3 , P h e 1 8 9 , L e  
u 2 0 5 , T h r 2 0 7 , G l y 2 0 9 , G l y 2 1 5 , V a l 2 2 9 , M e  
t 2 5 0 , I l e 2 5 3 , L e u 2 5 6 , I l e 2 6 0 , A s n 2 6 2 , V a  
l 2 6 8 , A s n 2 7 0 , T h r 2 7 9 , M e t 2 9 3 , T h r 2 9 4 , G l  
y 3 0 6 , L e u 3 0 8 , V a l 3 0 9 , L e u 3 1 0 , V a l 3 1 3 , P h  
e 3 4 2 , A s p 3 4 5 , T y r 3 4 9 , T y r 3 5 1 , A l a 3 5 6 , P h  
e 3 5 8 , V a l 3 6 0 , S e r 3 6 2 , A s n 3 7 0 , S e r 3 7 3 , P h  
e 3 8 0 , A l a 3 8 5 , C y s 3 8 6 , P r o 3 8 9 , G l y 3 9 0 , T r  
p 3 9 1 , A r g 3 9 2 , H i s 3 9 3 , A r g 3 9 5 , L y s 3 9 7 , P r  
o 3 9 9 のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

## 【0204】

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するニューロテンシン受容体であってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してもよいが、リガンド結合能を保持する。

## 【0205】

「対応するアミノ酸残基」によって、ラットニューロテンシン受容体と他のニューロテンシン受容体とをM a c V e c t o r及びC L U S T A L Wとを使用して比較する際に、ラットニューロテンシン受容体における所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他のニューロテンシン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。

## 【0206】

図11は、ラットニューロテンシン受容体と2つのヒトニューロテンシン受容体1及び2との間のアラインメントを示す。例えば、ヒトニューロテンシン受容体1のA l a 8 5がラットニューロテンシン受容体のA l a 8 6が対応し；ヒトニューロテンシン受容体1のP h e 3 5 3がラットニューロテンシン受容体のP h e 3 5 8に対応することなどが認められる。ヒトニューロテンシン受容体1及び2における他の対応するアミノ酸残基は、図11を参照して容易に同定可能である。

## 【0207】

親の特定のアミノ酸残基がA l aに置き換えられることが好ましい。しかしながら、親の特定のアミノ酸残基がA l aである際は、L e uで置き換えられることが好ましい。

## 【0208】

ニューロテンシン受容体変異体は、2以上のアミノ酸の位置において、親と比較すると異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒトニューロテンシン受容体（N T R 1）は、以下のアミノ酸残基：A l a 8 5, H i s 1 0 2, I l e 2 5 9, P h e 3 3 7 及びP h e 3 5 3の1つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基がA l a又はV a l又はM e t又はL e u又はI l eで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

10

20

30

40

50

## 【0209】

3又は4又は5の上述の変異を有するヒトニューロテンシン受容体(NTTR1)が好ましい。

## 【0210】

特に好ましいヒトニューロテンシン受容体(NTTR2)は、以下のアミノ酸残基:V54, R69, T229, P331及びF347の1つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基がAla又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる(ただし、それらが既に存在する場合を除く)。3又は4又は5の上述の変異を有するヒトニューロテンシン受容体(NTTR2)が好ましい。

## 【0211】

特に好ましい変異の組み合わせは、実施例3に詳細に記載している。適切な変異体は、これらのラットニューロテンシン受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例3に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている、他のニューロテンシン受容体変異体も含む。

## 【0212】

特に好ましいニューロテンシン受容体変異得体は、ラットニューロテンシン受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基における変異を含有するものである(F358A, A86L, I260A, F342A)(Nag7m); (F358A, H103A, I260A, F342A)(Nag7n)。

## 【0213】

ムスカリーン受容体変異体

ムスカリーン受容体は当該技術分野において知られている。それらは配列相同意を共有し、ムスカリーンに結合する。

## 【0214】

1つの実施態様では、当該GPCR変異体は、対応する野生型のムスカリーン受容体と比較した際に、図17に記載のヒトムスカリーン受容体M1の番号付けによる以下の位置: Leu 65、Met 145、Leu 399、Ile 383及びMet 384の任意の1つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、ムスカリーン受容体変異体である。

## 【0215】

MacVector及びCLUSTALWを使用して測定すると、GPCR変異体が所定のヒトムスカリーン受容体配列を比較した際に、少なくとも20%の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、GPCR変異体は、少なくとも30%又は少なくとも40%又は少なくとも50%の配列同一性を有する。

## 【0216】

ムスカリーン受容体変異体は、任意のムスカリーン受容体の変異体であってよいが、所定のムスカリーン受容体アミノ酸配列を参照して挙げられているアミノ酸の位置の1つ又は複数で変異されている。

## 【0217】

かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の1つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているヒトムスカリーン受容体変異体を使用してよい。親受容体における1つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するムスカリーン受容体変異体も使用してよい。

## 【0218】

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するムスカリーン受容体であってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質又はその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

## 【0219】

10

20

30

40

50

1つの実施態様では、当該G P C R変異体はムスカリン受容体変異体である。例えば、ムスカリン受容体変異体は、構造モチーフに少なくとも1つの異なるアミノ酸残基を有してよく、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図17に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置: L e u 65、M e t 145、L e u 399、I l e 383及びM e t 384のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

#### 【0220】

「対応するアミノ酸残基」によって、ヒトムスカリン受容体と他のムスカリン受容体とをMacVector及びCLUSTALWを使用して比較した際に、ヒトムスカリン受容体における所定のアミノ酸に対して整列(アライン)する他のムスカリン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。

10

#### 【0221】

特定のアミノ酸残基がA l aで置き換えられることが好ましい。しかしながら、特定のアミノ酸残基がA l aである際は、L e uで置き換えられることが好ましい。

#### 【0222】

本発明で使用するG P C R変異体は、熱、界面活性剤、カオトロピック剤、及び極端なp Hのいずれか1つに対する増大した安定性を有することが好ましい。

#### 【0223】

本発明で使用するG P C R変異体は増大した熱安定性を有することが好ましい。

#### 【0224】

アドレナリン受容体変異体、アデノシン受容体変異体、及びニューロテンシン受容体変異体を含む本発明で使用するG P C R変異体が、それらのリガンドの存在下又は不在下で、親と比較して増大した熱安定性を有することが好ましい。

20

典型的には、リガンドは、アンタゴニスト、完全なアゴニスト、部分的アゴニスト、又は逆アゴニストであり、オルトステリック又はアロステリックのいずれかである。上述のように、リガンドは、抗体などのポリペプチドであってよい。

#### 【0225】

本発明で使用するG P C R変異体、例えば、アドレナリン受容体変異体又はアデノシン受容体変異体又はニューロテンシン受容体変異体又はムスカリン受容体変異体は、親よりも少なくとも2、好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも8、さらに好ましくは少なくとも10又は15又は20安定であることが好ましい。

30

典型的には、親受容体及び受容体変異体の熱安定性は、同じ条件下で測定される。典型的には、熱安定性は、G P C Rが特定の立体構造を備えている条件下でアッセイされる。典型的には、当該選択される条件は、G P C Rに結合するリガンドの存在下である。

#### 【0226】

本発明で使用するG P C R変異体は、適切な界面活性剤において可溶化及び精製された場合、ドデシルマルトシド中で精製されたウシロドブシンに類似した熱安定性を有することが好ましい。G P C R変異体が、30分間に亘る40の加熱後に少なくとも50%のリガンド結合活性を保持することが、特に好ましい。G P C R変異体が、30分間に亘る55の加熱後に少なくとも50%のリガンド結合活性を保持することが、さらに好ましい。

40

#### 【0227】

誤解を避けるために、本発明の第一の態様に係る方法の工程(a)で提供されるG P C R変異体は、例えば、翻訳後修飾、例えばグリコシリ化又はリン酸化又は脂肪アシル化のための部位の導入又は欠失によって、伸長又は切断されてよく、内部欠失又は挿入を含んでよく、又はさもなければ安定化変異の導入を越えて変化していてもよい。前記G P C R変異体は、合成的に、例えばペプチド半合成又は架橋又はアルキル化によって、化学修飾されてもよい。いずれにしても、提供されるG P C R変異体は、親G P C Rと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する。

#### 【0228】

結合パートナーの選択

50

膜タンパク質に対する結合パートナーの選択は困難な課題であることが過去に証明されている。必要とされる純粋な抗原の調製には問題がある。膜タンパク質は多くの場合に界面活性剤で可溶化され、それらはタンパク質・界面活性剤複合体として精製される。界面活性剤の種類及び濃度は、タンパク質をその天然立体構造に保持するために極めて重要である。一部の界面活性剤は、タンパク質が一般的な E L I S A 支持体として使用されるプラスチック及びポリスチレン表面に結合するのを妨げることがある。加えて、固相への吸着はタンパク質の部分的な変性を引き起こし得る。

#### 【0229】

対照的に、G P C R 変異体の増大した安定性は、G P C R が免疫原又はスクリーニングのための選択試薬として使用される際にいくつかの利点を付与し、それらが様々な状況において使用されることを可能にする。

#### 【0230】

したがって、1つの実施態様では、G P C R 変異体は、全細胞製剤中若しくは細胞膜断片に存在するか、界面活性剤に可溶化されてよく、又は脂質単層、脂質二重層、ビーズ結合脂質粒子、他の固体支持脂質層若しくはプロテオリポソームに組み込まれてよい。G P C R が固定化される場合、脂質層は、固体支持体の表面上の層として直接支持されてよく、又は Cooper M . A . J Mol Recognit . 2004 Jul - Aug ; 17 ( 4 ) : 286 - 315 に記載されるように層又は小胞として固定されてよいと解される。

#### 【0231】

本発明者らは、ハイスループット膜受容体スクリーニングが、整列又は多重化され得るビーズ上又は表面上に膜を固定化することによって促進されることを認識する。典型的には、膜タンパク質をプロテオリポソームの形態で脂質と共に表面に沈着させる。プロテオリポソームの形成のために最も一般的に使用される方法は、原核細胞又は真核細胞から出発する。膜タンパク質は、界面活性剤との混合ミセルとして単離するか、有機溶媒に溶解するか又は緩衝液中の超音波処理により膜断片として凝集させてよい。一度単離され、精製されると、膜タンパク質は、a) 有機溶媒を介した再構成（例えば、逆相蒸発、脂質・タンパク質膜の再水和）、b) 機械的手段（例えば、超音波処理、フレンチプレス、凍結融解）、又は c) 界面活性剤を介した手段（例えば、透析、希釈、又はあらかじめ形成された小胞若しくはバイセルへの直接組込み）によって小胞に再構成してよい。

#### 【0232】

G P C R 変異体の界面活性剤可溶化形態は、部分的に純粋又は高度に純粋な製剤でよい。改善された安定性と可溶化条件の最適化によって可能となる精製は、外来性の「付着性」抗原及び脂質並びに、例えばファージが付着し得る、炭水化物などの他の細胞表面物質の除去という利点を付与する。このことは、例えば、ファージ粒子は疎水性又は荷電した表面に非特異的に付着することが知られているので、「外来性」物質が荷電している又は疎水性である場合に特に有益である。さらに、あるファージ抗体はそれ自体が無差別に抗原に結合し得る。S D S - P A G E によって評価される通常のレベルの純度は 80 ~ 95 % である。したがって、好ましくは G P C R 変異体の界面活性剤可溶化形態は、他のタンパク質から少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、さらに好ましくは少なくとも 90 %、又は少なくとも 93 %、又は少なくとも 95 % 純粋である。当該技術分野において知られるように、高レベルの、例えば少なくとも 99 % の純度が付加的な精製技術を使用して達成され得る。

#### 【0233】

可溶化受容体製剤は、典型的には、20 mM Tris (pH 7.0)、0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10 % グリセロール、0.07 % CHS、0.33 % DOM、0.33 % Chaps、0.33 mM DOPC / DOPS (7:3)、及び緩衝液 50 mL につき 1 個のプロテアーゼインヒビター錠の緩衝液中で作製される。可溶化の試みとして、0.5 mL のこの可溶化緩衝液を約 2 × 10<sup>6</sup> 細胞に添加し、これらの細胞懸濁液を、P

10

20

30

40

50

ローブソニケーター（6パルス／秒）を使用して超音波処理し、4のロッカー上に置く。2時間後、卓上型遠心分離機を使用して溶液を4で20分間に亘って14,000 rpmで遠心分離する。可溶化された受容体を含む上清を新しい管に移し、分析まで-80で凍結保存する。

#### 【0234】

膜断片又は膜-界面活性剤抽出物から形成されるG P C R変異体の製剤は、参照によつて本明細書に取り込むCooper M. A. J Mol Recognit. 2004 Jul-Aug; 17(4): 286-315において詳細に総説されている。特に興味深いのは、Graham, J. M.; Higgins, J. A. Membrane Analysis; Springer-Verlag: New York, 1997及びDignam, J. D. Methods in Enzymology 1990, 182, 194-203から適合された方法である。例えば、1つの方法は以下のとおりである：i) 500mlの適切な細胞培養物（例えば、CHO、Sf9）を1000gで10分間に亘って回転させ、ペレットを、ペレット容積の約2倍の適切な氷冷20mM tris-HCl pH 8、1mM EDTA、1mM EGTA、0.1mM PMSF、2μg/mlアプロチニン、及び10μg/mlロイペプチドに再懸濁する、ii) Donneホモジナイザー（A型）で10ストロークホモジナイズし、次に30,000gで20分間に亘って遠心分離する、iii) ペレットを50mlの20mM tris HCl pH 8、3mM MgCl<sub>2</sub>、10μg/ml DNase IプラスPMSF、2μg/mlアプロチニン及び10μg/mlロイペプチド（溶液B）に再懸濁し、再びホモジナイズする、iv) 30,000gで20分間に亘って遠心分離し、ペレットを20mlの溶液Bに再懸濁し、再びホモジナイズする、v) 瞬間凍結後、即時使用のために4で保存する。

#### 【0235】

G P C R変異体は、当該技術分野においてよく知られているように、C末端又はN末端に分子タグを含むように操作してよい。タグは、FLAGタグ、Hisタグ、c-Mycタグ、DDDDKタグ、HSVタグ、Haloタグ又はビオチンタグの任意のものでよい。その様なタグは、溶液中のファージに基づく選択プロトコールを容易にするために使用してよく、また固体支持体への結合を与えるために使用してもよい。さらに、その様なタグは、中でも特に、アフィニティーカラム、アフィニティーフィルター、磁気ビーズ及び選択的な固体支持試薬の他の例、ろ過、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー並びに透析を使用した不純製剤からのG P C R変異体の選択と富化を促進するであろう。

#### 【0236】

一連の界面活性剤及び可溶化緩衝液及び添加剤中のG P C R変異体の増大した安定性により、それらは固体表面に固定化されるのに特に好適である。かくして、1つの実施態様では、G P C R変異体は固体支持体上に固定化される。各種の支持体が当該技術分野において知られており、例えば、ビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートを含む。固定化は共有結合又は非共有結合相互作用を介してよい。

#### 【0237】

固定化が非共有結合相互作用を介する場合、支持体は、アビジン、ストレプトアビジン、金属イオン、親G P C Rに対する抗体、又はG P C R変異体に結合された分子タグに対する抗体の任意のもので被覆されてよい。例えば、タグは、FLAGタグなどの抗体によって認識されるものであってよく、又は、例えばVenturi et al., Biochemistry et Biophysica Acta 1610 (2003) 46-50に記載されている、ニッケル又はコバルトなどの金属イオンへの結合を可能にするポリヒスチジンタグであってよい。代替的には、G P C R変異体は、例えば、アビジン又はストレプトアビジンで被覆された表面に結合され得るビオチンタグで化学修飾されてよい。さらに、G P C R変異体は、天然の受容体配列に対して產生された抗体を介して固定化されてよい。

#### 【0238】

10

20

30

40

50

固定化が共有結合相互作用を介する場合、支持体は、カルボキシル化デキストランなどのポリマー支持体で被覆されてよい。例えば、G P C R 变異体は、アミンカップリングを介してカルボキシル化ポリマーで被覆された表面に共有結合的に固定化されてよい。例えば、デキストラン又はヒアルロン酸などのカルボキシメチル化支持体の水溶性カルボジイミドを介した活性化は、タンパク質の利用可能なアミノ部分を介したG P C R 变異体の直接の共有結合捕捉を可能にし、安定なアミド結合を形成する。代替的には、G P C R は操作されてよく、又は遊離の表面チオール（例えば、天然の遊離C y s、M e t 残基又は操作されたC末端C y s 残基）との反応を可能にするスルフィドリル反応性試薬（例えば、ピリジニルジチオエタンアミン（P D E A）又は3 - (2 - ピリジニルジチオ)プロピオン酸N - ヒドロキシスクシンイミドエステル）（S P D P））でさらに誘導体化されて、可逆的ジスルフィド結合を形成してよい。同様に、マレイミドカップリング試薬、例えばスルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート（スルホ-S M C C）及びN - (- マレイミドブチルオキシ)スルホスクシンイミドエステル（G M B S）を使用して安定なチオエーテル結合を形成してよい。固体支持体は、シスタミンで誘導化して、ジスルフィド活性化G P C Rとのカップリングを生じさせてよい。さらに、ヒドラジンによる処理とそれに続く還元的アミノ化により、アルデヒドとのカップリングが可能となる。アルデヒド基は、受容体に対して天然であってよく、又は固体支持体に存在する（デキストラン、アガロース、セファロース、ヒアルロン酸及びポリアジネートなどの炭水化物の糖残基に存在する）任意のシス - ジオールの穏やかな酸化によって形成されてよい。上記に加えて、アミノ存在表面を市販の二官能価架橋試薬で処理して、E r n s t , O . P . et al . , M e t h . E n z y m o l . 2 0 0 0 , 3 1 5 , 4 7 1 - 4 8 9 及びN u n o m u r a , W . et al . , J . B i o l . C h e m . 2 0 0 0 , 2 7 5 , 2 4 5 4 0 - 2 4 5 4 6 によって開示されているように受容体上の遊離アミノ基又はスルフヒドリル基とのカップリングを生じさせてよい。

## 【0239】

G P C R 变異体の定位は結合パートナーの同定の所望結果に依存するであろう。例えば、治療用低分子又は抗体の同定に関しては、G P C R 变異体は、典型的にはC末端又はアッセイにおいて細胞外ドメインが外側を向くことを可能にする他の細胞内ドメインを介して固定化される。天然の細胞内G P C R 結合パートナー又はG P C R 結合に干渉する物質を同定するために、G P C R 变異体は、典型的にはN末端又は細胞外ドメインによって固定化される。N末端又は細胞外ドメインによる固定化は、細胞内ドメインに結合する治療用分子も同定してもよい。しかしながら、その様な分子がインビボで活性であるためには、それらが細胞膜を通過することが可能でなければならないと解されるであろう。

## 【0240】

代替的実施態様では、G P C R 变異体は固定化されず、例えば、界面活性剤に可溶化されるか又は全細胞製剤中に存在する。この場合には、試験化合物（例えば、試験化合物のライブラリー）がチップ表面などの固体支持体に固定化されてよい。化合物をチップ表面に固定化するための各種の技術が当該技術分野において知られており、任意のものを利用してよい。例えば、適切な技術は、フォトリソグラフィー（A f f y m e t r i x , S a n t a C l a r a , C a l i f . ）、メカニカルマイクロスポットティング（S c h e n a et al . , S c i e n c e ( 1 9 9 5 ) v o l . 2 7 0 , p . 4 6 7 - 4 7 0 ; S y n t e n i , F r e m o n t , C a l i f . ）及びインクジェッティング（I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s , P a l o A l t o , C a l i f . ; 及びP r o t o g e n e , P a l o A l t o , C a l i f . ）を含む。チップ上の試験化合物/G P C R 变異体の対の空間的位置が、試験化合物の同一性を明らかにするために使用される。他の適切な方法は、例えば、全て参照によって本明細書に取り込む、F a n g , Y . et al . D r u g D i s c o v e r y T o d a y 2 0 0 3 , 8 , 7 5 5 - 7 6 1 、及び参考文献、A l v e s , I . D . et al . C u r r . P r o t . & P e p t i d e S c i . 2 0 0 5 , 6 , 2 9 3 - 3 1 2 ; B a r r y , R . et al . P r o t e o m i c s 2 0 0 4 , 4 , 3 7 1 7 - 3 7 2 6 ; B e s e n i c a r , M . et

10

20

30

40

50

al. *Chem. Phys. Lipids* 2006, 141, 169 - 178; Cocklin, S. et al. *Prot. Sci.* 2004, 13, 194 - 194; Cooper, M. A. *J. of Mol. Recognit.* 2004, 17, 286 - 315; Fang, Y. et al. *Drug Discov. Today* 2003, 8, 755 - 761; Ferracci, G. et al. *Anal. Biochem.* 2004, 334, 367 - 375; Graneli, A. et al. *Anal. Biochem.* 2007, 367, 87 - 94.; Graneli, A. et al. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 498 - 504; Groves, J. T. *Curr. Op. Drug Discov. Develop.* 2002, 5, 606 - 612; Groves, J. T. et al. *J. Immunol. Meth.* 2003, 278, 19 - 32; Harding, P. J. et al. *Eur. Biophys. J. Biophys.* Let. 2006, 35, 709 - 712; Komolov, K. E. et al. *Anal. Chem.* 2006, 78, 1228 - 1234; Kuroda, K. et al. *App. Psychophys. Biofeedback* 2006, 31, 127 - 136; Lang, M. J. et al. *Curr. Prot. Peptide Sci.* 2006, 7, 335 - 353; Leifert, W. R. et al. *J. Biomol. Screening* 2005, 10, 765 - 779; Martin-Garcia, J. et al. *J. Virology* 2005, 79, 6703 - 6713; Minic, J. et al. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* 2005, 1724, 324 - 332; Mozsolits, H. et al. *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 77 - 89; Navratilova, I. et al. *Anal. Biochem.* 2006, 355, 132 - 139; Ott, D. et al. *Prot. Eng. Design & Selection* 2005, 18, 153 - 160; Park, P. S. H. et al. *Febs Lett.* 2004, 567, 344 - 348.; Sobek, J. et al. *Combinat. Chem. & High Throughput Screening* 2006, 9, 365 - 380; Stenlund, P. et al. *Analytical Biochemistry* 2003, 316, 243 - 250; Winter, E. M. et al. *Anal. Chem.* 2006, 78, 174 - 180; Yokogawa, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12021 - 12027; Zurawski, J. A. et al. *Biopolymers* 2003, 71, 388 - 389に記載されている。  
**【0241】**

1つの実施態様では、例えば、ファージディスプレイ選択プロトコールでは、G P C R 及び試験化合物のどちらも固定化されず、溶液中に存在する。

#### **【0242】**

特定の立体構造において安定化された精製 G P C R のミリグラム量を生産できることは、生体膜に存在する天然 G P C R に対しては利用できないであろうスクリーニングアプローチを可能にする。かくして、本発明の方法は、天然のリガンドが未知である「オーファン」 G P C R のリガンドを同定するために使用してよい。オーファン G P C R のリガンドは、血液若しくは組織抽出物などの生物学的試料から又はリガンドのライブラリーから同定してよい。同様に、G P C R 変異体のリガンドも、前記リガンドがアクセサリータンパク質などの相互作用性タンパク質である場合は同定してよい。ペプチド又はタンパク質治療薬も、立体構造特異的抗体と同様に本発明の方法によって同定してよいと解される。例えば、以下に記載するように作製された抗体は、立体構造特異的 G P C R 結合に関して評価してよい。特に、抗体は、免疫動物から採取した B 細胞より得た上清から、免疫動物由来の B 細胞の不死化後に得たハイブリドーマから、又はファージ粒子上で若しくはリボソームディスプレイなどのインビトロ発現系を介して発現され得る組換え抗体ライブラリーから、同定してよい。本発明の方法は、作用機構がこれまで知られていなかった化合物の作用機構を測定するためにも使用してよい。例えば、「 G P C R ome 」である G P C R

10

20

30

40

50

の混合物又はそのサブセットを化合物に対してスクリーニングして、それらの作用機構が G P C R への結合を介するか否かを同定してよい。加えて、本発明は、特定の化合物が化合物の混合物から精製される生化学的アフィニティー精製システムとして使用してよい。

#### 【 0 2 4 3 】

試験化合物は生物学的試料として提供されてよい。特に、前記試料は、個体から採取した任意の適切な試料でよい。例えば、試料は血液、血清、血漿又は脊髄液などの液体試料であってよい。代替的には、試料は組織又は細胞抽出物であってよい。

#### 【 0 2 4 4 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物はポリペプチドである。例えば、試験化合物は、ある G P C R に結合することが知られるが、立体構造特異的ポリペプチドの同定を所望する場合には特定のタイプのポリペプチドであってよい。代替的には、ポリペプチドは候補治療分子、例えばアンチカリンであってよい ( Skerra J Biotech 2001 ) 74 ( 4 ) : 257 - 75 ) 。

10

#### 【 0 2 4 5 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物はペプチドである。

#### 【 0 2 4 6 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物は、アフィボディ、ペプチドミメティック、核酸、ペプチド核酸 ( P N A ) 若しくはアプタマー、又は脂質若しくは炭水化物である。

20

#### 【 0 2 4 7 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物は、アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質 ( D A R P i n ) などのモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質、又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質である。

#### 【 0 2 4 8 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物は低分子、例えば 5 0 0 0 ダルトン未満の分子であるか、又は1つ若しくは複数の試験化合物は天然生成物である。

#### 【 0 2 4 9 】

1つの実施態様では、1つ又は複数の試験化合物は抗体である。例えば、試験化合物は、親 G P C R の G P C R 変異体に対して產生された抗体であってよく、前記 G P C R 変異体は、親 G P C R と比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する。好ましくは、G P C R 変異体は、工程 ( a ) において提供されるものと同じ G P C R 変異体である。

30

#### 【 0 2 5 0 】

本明細書で使用する、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、F a b 断片及び F a b 発現ライブラリーによって生成される断片を含むが、これらに限定されない。その様な断片は、標的物質に対する結合活性を保持する全長抗体の断片である、F v、F ( a b ' ) 及び F ( a b ' ) 2 断片、並びに抗体の遺伝子操作された誘導体、例えば一本鎖抗体 ( s c F v ) 、融合タンパク質、ドメイン抗体 ( d A b ) 及びダイアボディを含む。例えば、組換え D N A 技術を、元の抗体の結合特異性を保持する更なる抗体又はキメラ分子を作製するために使用してよいと解されるであろう。その様な技術は、例えば、欧州特許出願第 E P - A - 1 8 4 1 8 7 号、英国特許第 G B 2 1 8 8 6 3 8 A 号又は欧州特許出願第 E P - A - 2 3 9 4 0 0 号に記載されているように、抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域 ( C D R ) をコードする D N A を別の免疫グロブリンの定常領域又は定常領域プラスフレームワーク領域に融合する工程を含んでよい。さらに、ハイブリドーマ又は抗体を产生する他の細胞を、產生される抗体の結合特異性を変化させてもよく又は変化させなくてもよい遺伝子変異又は他の変化に供してよい。かくして、抗体は多くの方法で修飾され得るので、用語「抗体」は、必要と

40

50

される特異性を備えた結合ドメインを有する任意の特定結合要素又は物質を包含すると解釈されるべきである。したがってこの用語は、天然であるか又は完全に若しくは部分的に合成であるかにかかわらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む、抗体断片、抗体の誘導体、機能的等価物及びホモログを包含する。したがって、免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、又は他のポリペプチドに融合した等価物が含まれる。さらに、抗体及びその断片は、当該技術分野でよく知られるように、ヒト抗体又はヒト化抗体であってよい。

#### 【0251】

当該技術分野において知られる各種の手順を、G P C R 変異体、又はその断片若しくは融合体に対する抗体を產生するために使用してよい。

10

#### 【0252】

例えば、親 G P C R と比較して増大した安定性を有する G P C R 変異体に対する抗体は、リンパ球を G P C R 変異体の免疫原で免疫する工程、そのようにして作製された抗体を G P C R に結合する抗体に関してスクリーニングする工程、及び前記抗体を単離する工程によって生産されてよい。「リンパ球を免疫する工程」によって、動物全体が免疫されるインビオ免疫、及び、例えば米国特許第 5,290,681 号に記載されている、リンパ球がインビトロで免疫されるインビトロ免疫の両方が含まれる。

#### 【0253】

好ましくは、G P C R 変異体の免疫原は一般的にその G P C R 変異体全体であるが、G P C R 変異体の一部、例えば G P C R 変異体の断片であってもよい。例えば、安定化された G P C R の生産は、標的免疫アプローチから利益を受けるであろう、これまで天然立体構造からは明らかでなかった G P C R の一部の同定を促進し得る。G P C R 変異体の断片は、抗体応答などの免疫応答を惹起することが可能な G P C R の任意の部分であってよい。わずかに 5 アミノ酸を有するペプチドが抗体応答を惹起し得ることが知られるが、典型的にはより大きなペプチドが使用される。かくして、免疫原の断片は、少なくとも 5 アミノ酸、典型的には 5 ~ 1000 アミノ酸、例えば 5 ~ 500、5 ~ 200、5 ~ 100、5 ~ 50、5 ~ 40、5 ~ 30、5 ~ 20、例えば 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 アミノ酸を有してよい。

20

#### 【0254】

さらに、免疫原は、G P C R が、リンパ球に対して免疫原性であることが知られる第二のタンパク質に融合している G P C R 変異体の融合体であってよい。その様な免疫原性タンパク質の例は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、及びダイズトリプシンインヒビターを含むが、これらに限定されない。免疫原は、インビオで哺乳動物において G P C R 変異体に対する免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに含んでもよい。免疫応答を増大するために使用される各種のアジュバントは、フロイントアジュバント（完全及び不完全）、無機ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、ジニトロフェノール等）、カルメット-ゲラン杆菌及びコリネバクテリウム・バルブム (*Corynebacterium parvum*) などのヒトにおいて使用可能なアジュバント、又は同様の免疫刺激剤を含むが、これらに限定されない。使用してよいアジュバントの更なる例は、MPL-TDM アジュバント（モノホスホリ脂質 A、合成トレハロースジコリノミコレート）を含む。アジュバントの選択は G P C R の構造を維持するうえで重要であり得、この理由から、Tritermax 及び Ribia アジュバント乳剤などの水中油型乳剤が特に好ましい。安定化された G P C R 変異体をバッケボーン上で共に連結して、抗原性をさらに増大するための多価分子を生成してもよい。

40

#### 【0255】

G P C R 変異体の免疫原は G P C R 変異体の変異形であってよいが、G P C R 変異体に対する免疫応答を惹起することが可能であり、G P C R 変異体の安定性を有意に低下させないものであると解される。その様な変異形は、G P C R 変異体と比較して 1 つ又は複数のアミノ酸置換を有し、5 % もの割合の置換を有するポリペプチドを含む。典型的には、

50

例えば、「変異形」が、1つ又は複数の位置にアミノ酸の挿入、欠失、又は保存的若しくは非保存的な置換が存在するタンパク質を表すが、その様な変化が、依然としてG P C R 変異体に対する免疫応答を惹起することが可能であり、G P C R 変異体の安定性を有意に低下させないタンパク質を生じるものである場合には、置換は保存的置換である。「保存的置換」によって、G l y、A l a；V a l、I l e、L e u；A s p、G l u；A s n、G l n；S e r、T h r；L y s、A r g；及びP h e、T y rなどの組み合わせが意味される。G P C R 変異体のその様な変種は、タンパク質の操作及び部位指定変異誘発の標準的な方法を使用して作製されてよい。

#### 【0256】

免疫原は、安定化G P C R 又はその断片をコードするポリヌクレオチドであってもよいと解される。例えば、ポリヌクレオチドは、インビボで細胞に取り込まれて、細胞表面で発現されてよく、そこで免疫応答を刺激するであろう。

#### 【0257】

G P C R 変異体の免疫原は、上述したように、全細胞製剤として、細胞膜断片中で、界面活性剤に可溶化されて、脂質単層中で、脂質二重層中で、ビーズ結合脂質粒子中で、固体に支持された脂質層中で、又はプロテオリポソーム中で提供されてよい。

#### 【0258】

ポリクローナル抗体の作製のために、各種の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、マウス又は他の哺乳動物）を免疫原の1回又は複数回の注射によって免疫してよい。免疫原性タンパク質に対するポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血清又は卵黄から）単離してよく、主として免疫血清のI g G画分を提供する、プロテインA又はプロテインGを使用したアフィニティークロマトグラフィーなどのよく知られている技術によってさらに精製してよい。

#### 【0259】

モノクローナル抗体は、K o h l e r and M i l s t e i n , N a t u r e , 256 : 495 (1975) によって開示されたものなどの、ハイブリドーマ法を使用して作製してよい。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を、典型的には免疫剤で免疫して、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することが可能なリンパ球を誘発する。

#### 【0260】

一般的には、ヒト起源の細胞を所望する場合は末梢血リンパ球が使用され、非ヒト哺乳動物起源を所望する場合は脾細胞又はリンパ節細胞が使用される。リンパ球を、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用して不死化細胞株と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する (G o d i n g , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e , A c a d e m i c P r e s s , (1986) pp. 59 - 103)。不死化細胞株は、通常は形質転換した哺乳動物細胞、特にげっ歯動物、ウシ及びヒト起源の骨髄腫細胞である。通常は、ラット又はマウス骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の増殖又は生存を阻害する1つ又は複数の物質を含有する適切な培地で培養してよい。例えば、親細胞が酵素、ヒポキサンチングアミニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ (H G P R T 又はH P R T ) を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジンを含み（「H A T 培地」）、前記の物質はH G P R T 欠損細胞の増殖を防止する。

#### 【0261】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル発現を支持し、且つ、H A T 培地などの培地に感受性であるものである。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫株であり、これは、例えば、S a l k I n s t i t u t e C e l l D i s t r i b u t i o n C e n t e r , S a n D i e g o , C a l i f . 及びt h e A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n , M a n a s s a s , V a . より入手可能である。ヒト骨髄腫及びマウス・ヒトへ

10

20

30

40

50

テロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の產生のために開示されている (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51 - 63)。

#### 【0262】

代替的には、モノクローナル抗体は、当該技術分野においてよく知られており、例えば、Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7843 - 7848 に記載されている、「選択的リンパ球抗体法」(Selected Lymphocyte Antibody Method) (SLAM) を使用して作製可能である。簡単に説明すると、リンパ系細胞の大きな集団の中で、所望の特異性又は機能を備えた抗体を產生している1個のリンパ球が同定される。通常は、インビボ免疫に由来するリンパ系細胞を、適合させた溶血ブラークアッセイ (Jerne & Nordin, 1963, Science, 140: 405) 及びその後そのリンパ球から回収される抗体の特異性をコードする遺伝情報を使用して、選択した抗原に結合する抗体を產生するものをスクリーニングする。

#### 【0263】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されているものなどの組換えDNA法によって作製してもよい。増大した安定性を有するGPCR変異体に対して產生されるモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離し、配列決定することが可能である。上述のハイブリドーマ細胞はその様なDNAの好ましい起源として役立つ。一度単離されれば、DNAを発現ベクターに組み込んでよく、それを、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を產生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。DNAは、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列で置き換えることによって(米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812 - 13 (1994))、又は非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合的に連結することによって、修飾されてもよい。その様な非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインを置換してよく、又はキメラ二価抗体を作製するために本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを置換してよい。

#### 【0264】

GPCRに特異的な一本鎖抗体も作製されてよいと解されるであろう(例えば、米国特許第4,946,778号参照)。GPCR変異体に対するイディオタイプを含む抗体断片も、当該技術分野において既知の技術によって作製されてよく、(i)抗体分子のペプシン消化によって生成される $F_{(ab')_2}$ 断片；(ii) $F_{(ab')_2}$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成される $F_{ab}$ 断片；(iii)抗体分子をパパインと還元剤で処理することによって生成される $F_{ab}$ 断片、及び(iv) $F_v$ 断片を含むが、これらに限定されない。特異的結合部位を保持する抗体断片の合成に関する技術的一般的な総説は、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293 - 299に認められる。

#### 【0265】

二重特異性抗体も作製されてよい。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する抗体、好ましくはヒト又はヒト化モノクローナル抗体である。この場合、結合特異性の1つはGPCR変異体に対してである。第二の結合標的は任意の他の抗原であり、好都合には、他のGPCR又は受容体サブユニットを含む、細胞表面タンパク質又は受容体である。例えば、二重特異性抗体は、ヘテロ二量体を形成し得るGPCRの対のために有用であろう(Millingan, Biochim Biophys

10

20

30

40

50

Acta. 2007 Apr; 1768(4):825-35)。この場合、二重特異性抗体は特異的ヘテロ二量体受容体を選択的に標的してよい。二重特異性抗体は、ウイルス侵入の共受容体に対しても有用であってよく、共受容体の1つはGPCR、例えばCD4及びGPCR CCR5又はCXCR4である(Alkhatib G, Berger EA. Eur J Med Res. 2007 Oct 15; 12(9):375-84)。二重特異性抗体を作製するための方法は当該技術分野において知られている。伝統的に、二重特異性抗体の組換え生産は2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の共発現に基づき、前記2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖と軽鎖のランダムな組み合わせの故に、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を產生し、そのうちの1種だけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常はアフィニティークロマトグラフィー工程によって為される。同様の手順は、1993年5月13日公開の国際公開広報第WO 93/08829号、及びTraunecker et al., 1991 EMBO J., 10:3655-3659に開示されている。

10

## 【0266】

一部の場合には、試験化合物のハイスループットスクリーニングが好ましく、この方法は、当業者によく知られた用語である、「ライプラリースクリーニング」法として使用してよいと解される。かくして、試験化合物は試験化合物のライプラリーであってよい。例えば、ライプラリーは、例えばインビボ、エクスピボ又はインビトロのいずれかで調製されるリボソームディスプレイ又は抗体ライプラリーによって作製される、ペプチド又はタンパク質ライプラリーであってよい。その様なライプラリーを作製し、スクリーニングするための方法は当該技術分野において知られている。

20

## 【0267】

かくして、親GPCRと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有するGPCR変異体に対して產生される抗体である試験化合物を、そのGPCRへの結合に関して試験するよりもむしろ、試験化合物は抗体ライプラリーであってよい。かくして、GPCRに特異的な抗体を作製するための他の方法は、細菌、酵母、纖維状ファージ、リボソーム若しくはリボソームサブユニット又は他のディスプレイ系において発現される、免疫グロブリン遺伝子又はその部分をコードする発現ライプラリーをスクリーニングする工程を含む。この方法では、抗体配列又は抗体断片配列の大きなライプラリーが、健常ドナー、患者又は動物(健常又はそうでない)などの多様な起源から得られる。これらの配列をクローニングし、適切な系において発現させて、典型的には、固体表面に固定化された増大した安定性を有するGPCRに結合させることによって抗体が選択される。

30

## 【0268】

抗体ライプラリーの特定の例は、組換えコンビナトリアル抗体ライプラリー、例えば、ヒトリンパ球に由来するmRNAから調製したヒトVL及びVH cDNAを使用して作製される、scFv又はFabファージディスプレイライプラリーである(McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990))。この技術によれば、抗体VDメイン遺伝子が、M13又はfdなどの纖維状バクテリオファージの大きな又は小さなコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として提示される。纖維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、増大した安定性を有するGPCRへの抗体の結合能に基づく選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も生じさせる。ファージディスプレイは各種の形式で実施されてよい；それらの総説については、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)参照。さらに、抗体ディスプレイライプラリーを作製し、スクリーニングする際の使用に特に適した方法及び試薬の例は、例えば、Ladner et al. 米国特許第5,223,409号；Kang et al. PCT特許公開番号第

40

50

WO 92/18619号; Dower et al. PCT特許公開番号第WO 91/17271号; Winter et al. PCT特許公開番号第WO 92/20791号; Markland et al. PCT特許公開番号第WO 92/15679号; Breitling et al. PCT特許公開番号第WO 93/01288号; McCafferty et al. PCT特許公開番号第WO 92/01047号; Garrard et al. PCT特許公開番号第WO 92/09690号; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridom as 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 及びBarbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982に認められる。  
【0269】

前記方法は、例えばファージディスプレイ法に関して上述したように、GPCRのポリペプチド結合パートナーを発現することが可能なポリヌクレオチドを同定するために使用してもよい。適切なベクター中の発現ライブラリーの一定分量を、必要とされる結果を与える能力に関して試験してよい。必要な特性を備えたポリヌクレオチドの1つの種を同定するためには、必要な特性を有するポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを同定する工程及びそれらのポリヌクレオチドを再スクリーニングする工程の数回のサイクルが必要とされ得ると解されるであろう。

【0270】  
本発明は、疾患又は状態を治療する際に使用する薬剤又はリード化合物を同定するためのスクリーニング方法を含む。ハイスループット操作が可能なスクリーニングアッセイは特に好ましいと解される。

【0271】  
当業者によく知られる用語である、薬剤スクリーニング法であってよい、本明細書に記載する方法では、試験化合物は、薬剤様化合物又は薬剤様化合物の開発のためのリード化合物であってよいと解される。

【0272】  
用語「薬剤様化合物」は、当業者によく知られており、化合物を医学における使用、例えば薬剤における有効成分としての使用に適したものにし得る性質を有する化合物という意味を含んでよい。かくして、例えば、薬剤様化合物は、有機化学の技術によって、好ましいものではないが分子生物学又は生化学の技術によって合成され得る分子であってよく、好ましくは、5000ダルトン未満であってよく、且つ水溶性であってよい低分子である。薬剤様化合物は、付加的に、特定の1つ又は複数のタンパク質との選択的相互作用の特徴を示してよく、また生物学的に利用可能及び/又は標的細胞膜又は血液脳関門を貫通することが可能であってよいが、これらの特徴は重要ではないと解されるであろう。

【0273】  
用語「リード化合物」は、同様に当業者によく知られており、化合物が、それ自体は薬剤としての使用に適さないが（例えば、意図される標的に対して弱い作用強度しかない、作用が非選択的である、不安定である、溶解度が低い、合成が困難である、又はバイオアベイラビリティーが低いという理由で）、より望ましい性質を有し得る他の化合物の設計のための出発点を提供し得るという意味を含んでよい。

【0274】

かくして1つの実施態様では、当該方法は、特定の立体構造を備えるG P C R 変異体に結合することが示された試験化合物を修飾する工程、及び修飾した試験化合物が特定の立体構造を備えるG P C R 変異体に結合するか否かを測定する工程をさらに含む。修飾した試験化合物が、特定の立体構造を備える親G P C R にも結合するか否かをさらに測定してよいと解されるであろう。

#### 【0275】

G P C R と試験化合物の結合を測定するには各種の方法を使用してよく、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、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、及びファージディスプレイ法を含み、これらは当該技術分野において一般的に実施されており、例えば、Plant et al. (1995) Analyt Biochem. 226 (2), 342 - 348 及び Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York に記載されている。試験化合物とG P C R の結合を検出する他の方法は、イオンスプレー質量分析 / H P L C 法を伴う限外ろ過又は他の物理的及び分析的方法を含む。例えば、当業者によく知られた蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）法も使用してよく、この方法では、2つの蛍光標識実体の結合を、相互に近接した際の蛍光標識の相互作用を測定することによって測定してよい。

#### 【0276】

G P C R 変異体が全細胞製剤、膜プロトプラスト又はプロテオリポソームとして提供される場合、パッチクランプ法、マジック角スピニングN M R 、蛍光相關分光法、蛍光共鳴エネルギー移動及び超遠心分析法などの生物物理学的技術を、試験化合物に対するG P C R 変異体の結合を分析するために使用してよい（New, R. C., Liposomes: a practical approach. 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, 1990 及び Graham, J. M.; Higgins, J. A., Membrane Analysis. Springer-Verlag: New York, 1997 に記載される）と解されるであろう。その様な相互作用の親和性及び速度論の両方の定量的な非侵襲的測定を可能にする方法は、膜 - タンパク質結合の継続的観測を可能にする直接アッセイ、又は一部の場合には、結合相互作用体と遊離相互作用体の超高速分離とそれに続く膜結合分析物と膜遊離分析物の定量を含む。

#### 【0277】

結合試験化合物は、ペプチド標識、核酸標識（Kerr et al., JACS (1993) vol. 115, p. 2529 - 2531; 及び Brenner & Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) vol. 89, p. 5381 - 5383）、化学物質標識（Ohlmeier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) vol. 90, p. 109222 - 10926; 及び Maclean et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) vol. 94, p. 2805 - 2810）、蛍光標識（Yamashita & Weinstock (Smith Kline Beecham Corporation)、国際公開広報第WO 95 / 32425号(1995); 及び Sebestyen et al., Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 22nd 1992 (1993), p. 63 - 64）、又はR F タグ（Nicolaou et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1995) vol. 34, p. 2289 - 2291; 及び Moran et al., JACS (1995) vol. 117, p. 10787 - 10788）などの、化合物に関連する独自の標識又はタグを使用して検出してよいと解されるであろう。

#### 【0278】

試験化合物が、上述の方法のいずれかを使用して作製された、増大した安定性を有する

10

20

30

40

50

G P C R 変異体に対する抗体である場合、結合は、好ましくは、免疫沈降法を使用して、又は放射免疫検定法（R I A）若しくは酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）などのインビトロ結合アッセイによって検定される。その様な技術及びアッセイは当該技術分野において知られている。例えば、E L I S Aでは、典型的には、安定化G P C Rをマイクロタイタープレート又は他の固体表面に固定化する。最初にプレートをB S A又は他の類似のタンパク質と共にインキュベートして、非特異的結合部位をブロックする。抗体を含有する試料（血清又は卵黄又はハイブリドーマ細胞の培養上清など）をプレートに添加し、固定化したG P C Rに抗体を結合させる。結合抗体は、第一の抗体に結合し、後程検出してよい反応を触媒する酵素へのその接合を介して検出を可能にする、第二の検出抗体の添加によって検出される。加えて、抗体の結合親和性は、Munson and Pol lard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980) のScatchard解析によって測定してもよい。好ましくは、標的G P C Rに対して高度の特異性と高い結合親和性を有する抗体を単離する。

10

## 【0279】

抗体がハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体である場合は、特異的抗体を発現するものとして同定されたハイブリドーマクローンを、その後、限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法を使用して増殖させてよいと解されるであろう。このための適切な培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及びR P M I - 1 6 4 0 培地を含む。代替的には、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水としてインビボで増殖させてよい。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を単離してよく、又は、例えば、プロテインA - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、若しくはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって培地若しくは腹水からさらに精製してよい。

20

## 【0280】

試験化合物がファージディスプレイ抗体ライブラリーである場合、安定化G P C Rへの結合は以下のように評価してよい。典型的には、増大した安定性を有するG P C R変異体をマイクロタイタープレートのウエルに4で一晩被覆する。ウエルをP B Sで洗浄し、M P B S (P B S中の3%粉乳)において37で1時間ブロックする。例えばヒトs c F vのレパートリー(10形質導入単位(t u))を発現する、ファージミドライブラリーに由来する精製ファージを、100μlの最終容量の3%M P B Sにおいて1時間ブロックする。ブロックしたファージをブロックしたG P C Rのウエルに添加し、1時間インキュベートする。ウエルをP B S T (0.1%v/vのT w e e n 2 0を含むP B S)で5回洗浄した後、P B Sで5回洗浄する。結合したファージ粒子を溶出し、10m lの対数増殖期の大腸菌T G 1を感染させるために使用する。感染細胞を2 T Y プロスにおいて37で1時間増殖させ、2 T Y A G プレートに広げて、30で一晩インキュベートする。この1回目のパニング選択からの培養物をヘルパー・ファージで重複感染させ、回収して(rescued)、例えば、2回目のパニングのためのs c F v抗体を発現するファージ粒子を与える。

30

## 【0281】

ファージディスプレイ抗体のための代替的な結合アッセイは、典型的には100nMの最終濃度のビオチニル化G P C R変異体タンパク質を用いた可溶性選択の使用を含む。この場合は、s c F vファージミドライブラリー(上述の)からの精製s c F vファージ(1012t u)を1m lの3%M P B Sに懸濁し、30分間ブロックする。ビオチニル化G P C Rを添加し、室温で1時間インキュベートする。その後、ファージ/抗原複合体を、1m lの3%M P B Sにおいて37で1時間ブロックしておいた250μlのD y n a 1 M 2 8 0 ストレプトアビジン磁気ビーズに添加し、ビーズと共に室温でさらに15分間インキュベートする。磁気ラックを使用してビーズを捕捉し、1m lの3%M P B S / 0.1% (v/v) T w e e n 2 0 中で4回、続いてP B S中で3回洗浄する。最後のP B S洗浄後、ビーズを100μlのP B Sに再懸濁し、5m lの対数増殖期の大腸菌を感染させるために使用する。再び、この1回目の可溶性選択からの培養物をヘルパー・

40

50

アージで重複感染させ、回収して、2回目の可溶性選択のためのscFv抗体を発現するファージ粒子を与える。

#### 【0282】

ハイスループット操作が可能なスクリーニングアッセイ、例えばチップベースのアッセイは、GPCR変異体への結合を測定するために特に好ましいと解される。安定化GPCR変異体は、精製した際にこれらの形式において使用するのに十分なほど安定でない親GPCRと異なり、その様なアッセイに特に適する。特に、VL SIPS（商標）と呼ばれる技術は、数十万又はそれ以上の異なる分子プローブ、すなわち試験化合物を含む極めて小さなチップの生産を可能にした。これらの生物学的チップは、アレイに配置されたプローブを有し、各々のプローブには特定の位置が割り当てられている。各々の位置が例えば10ミクロンの尺度を有する、生物学的チップが生産されている。前記チップを使用して、標的分子がチップ上のプローブのいずれかと相互作用するか否かを測定してよい。選択した試験条件下でアレイを標的分子に曝露した後、走査装置でアレイの各々の位置を検査し、標的分子がその位置のプローブと相互作用したか否かを測定してよい。10

#### 【0283】

チップ表面のGPCR変異体に対する試験化合物は、チップ表面を放射能又は蛍光に関して走査することによって検出してよい。チップ上の相互作用する対の空間的位置が試験化合物の同一性を明らかにするか、又はチップ上にGPCR変異体のアレイが存在する場合は、受容体の同一性を明らかにする（例えば、Kuimelis et al., Addressable Protein Arrays, U.S.現在は放棄された、1998年4月3日出願の米国特許出願第60/080,686号、及び1999年3月31日出願の米国特許出願第09/282,734号参照）。後者の場合は、GPCR変異体のアレイを、同じGPCRの各種の立体構造又は各種のGPCRのいずれかに対する化合物の選択性のデータを得るための方法として使用してよい。20

#### 【0284】

試験化合物、例えばDNA、RNA、タンパク質及びリン脂質、低分子並びに天然生成物に対するGPCR変異体の結合を検出する代替的な方法は、例えばPlant et al. (2005) Analyt Biochem 226(2), 342-348に記載されている、表面プラズモン共鳴アッセイ(SPA)を含む。SPAビーズに固定化されたGPCR変異体は、例えば、蛍光基で標識された1つのリガンドと共にインキュベートされてよく、又はリガンドは放射性リガンドであってよい。GPCR変異体への試験化合物の結合能は、蛍光リガンド又は放射性リガンドを置き換えるその能力を介して測定してよい。他の例では、GPCR変異体をチップ表面に固定化し、試験化合物の結合を、表面プラズモン共鳴及びエバネッセント波を使用する関連技術によって検出する。結合化合物の量、相互作用の親和性及び会合解離のキネティクスを測定するには屈折率の変化が使用できる。このアプローチの一例は、長いアルキル基で修飾されたカルボキシル化デキストラン表面に固定化されたロドブシンに関して記述されている。界面活性剤で可溶化された受容体のアミンカップリング後、脂質/界面活性剤混合ミセルが固定化表面に付着した。その後、界面活性剤は緩衝液流に溶出され、残存する脂質はチップ表面で二重層を形成した(Karlsson OP, Lofas S., Anal Biochem. 2002 Jan 15; 300(2): 132-8)。30

#### 【0285】

試験化合物がペプチド又はタンパク質、例えば、オーファン受容体に対するリガンド又は相互作用性タンパク質である場合は、結合リガンドを溶出し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF)又はエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)などの質量分析法によって同定してよい(Williams C. Addona TA. Trends Biotechnol. 2000 Feb; 18(2): 45, Williams C. Curr Opin Biotechnol. 2000 Feb; 11(1): 42-6)。GPCR変異体は、カラム若しくはビーズに固定化してよく、又は細胞において標識形態で発現させ、タグに対する直接の試40

10

20

30

40

50

薬又はG P C Rに対する直接の試薬を使用してその様な複合体混合物からリガンドと共に同時精製してよい(Rigaaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. Nat Biotechnol. 1999 Oct; 17(10): 1030-2)。

## 【0286】

G P C Rに対する高親和性の立体構造特異的結合パートナーを生成できることは、治療用のG P C R結合パートナーの生産を促進するであろう。かくして、G P C Rへの結合を確立することに加えて、G P C Rに対する結合パートナーの機能的影響を測定することも望ましいと解されるであろう。

## 【0287】

したがって、本発明の1つの実施態様では、前記方法は、結合パートナーが、結合するG P C Rの機能に影響を及ぼすか否かを測定し、そしてG P C Rの機能に影響を及ぼす試験化合物を単離することをさらに含む。

## 【0288】

例えば、1つの実施態様では、結合パートナーがG P C Rのリガンドへの結合を変化させるか否かが測定される。リガンドによって、本願では、G P C Rに結合し、且つ、上述のようにG P C Rに特定の立体構造を備えさせる任意の分子が含まれる。好ましくは、リガンドは、そのG P C Rの天然リガンド又はその類似体である。リガンドへのG P C Rの結合は、当該技術分野において知られる標準的なリガンド結合法を使用して、例えば上述のようにアッセイしてよい。例えば、リガンドは放射標識又は蛍光標識されてよい。結合アッセイは、安定化G P C R変異体又は親G P C Rを使用して実施してよい。典型的には、安定化G P C Rを精製するか又は哺乳動物、細菌若しくは昆虫細胞などの細胞において発現させる。典型的には、親受容体を哺乳動物、細菌又は昆虫細胞などの細胞において発現させる。アッセイは、全細胞に関して又は細胞から得た膜に関して実施してよい。結合パートナーは、標識リガンドの結合を変化させるその能力によって特徴づけられるであろう。

## 【0289】

1つの実施態様では、結合パートナーは、G P C Rとそのリガンドの間の結合を低下させる。例えば、結合パートナーは、結合を少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、250倍、500倍又は1000倍低下させてよい。好ましくは、結合パートナーは結合を100から1000倍、例えば10から100倍低下させる。

## 【0290】

1つの実施態様では、結合パートナーは、G P C Rとそのリガンドとの間の結合を上昇させる。例えば、結合パートナーは、結合を少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、250倍、500倍又は1000倍上昇させてよい。好ましくは、結合パートナーは結合を100から1000倍、例えば10から100倍上昇させる。

## 【0291】

更なる実施態様では、結合パートナーがG P C Rの活性を調節するか否かが測定される。例えば、アゴニスト立体構造で安定化されたG P C R変異体が本発明の方法の工程(a)で提供される場合、選択されるパートナーはアゴニスト結合パートナーであり、それゆえG P C Rの活性化を上昇させてよい。アンタゴニスト立体構造で安定化されたG P C R変異体が本発明の方法の工程(a)で提供される場合、選択される結合パートナーはアンタゴニスト結合パートナーであり、それゆえG P C Rの活性化を低下させてよい。

## 【0292】

このアッセイでは、親G P C R又は安定化G P C R変異体はインピボで、例えば、G P C Rが、よく知られたG P C Rシグナル伝達経路に結合することが可能である哺乳動物又は昆虫細胞において発現される(Eglen R. M. Functional G protein-coupled receptor assays for primary

10

20

30

40

50

y and secondary screening. Comb Chem High Throughput Screen. 2005 Jun; 8(4):311-8)。その様なアッセイは以下を含む:カルシウム可動化(Gonzalez JE, Maher MP. Cellular fluorescent indicators and voltage/ion probe reader(VIPR) tools for ion channel and receptor drug discovery. Receptors Channels. 2002; 8(5-6):283-95, Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Deltheux M. Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. Receptors Channels. 2002; 8(5-6):319-30)、cAMPレベルの変化(Weber M, Ferrer M, Zheng W, Ingles J, Strulovici B, Kunapuli P. A 1536-well cAMP assay for Gs- and Gi-coupled receptors using enzyme fragmentation complementation. Assay Drug Dev Technol. 2004 Feb; 2(1):39-49.)、キナーゼ経路の活性化(Leroy D, Missotten M, Walitzinger C, Martin T, Scheer A. G protein-coupled receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. J Recept Signal Transduct Res. 2007; 27(1):83-97)、例えばレポーター遺伝子の使用を介した、遺伝子転写の調節(Liu B, Wu D. Analysis of the coupling of G12/13 to G protein-coupled receptors using a luciferase reporter assay. Methods Mol Biol. 2004; 237:145-9, Kent TC, Thompson KS, Naylor LH. Development of a generic dual-reporter gene assay for screening G-protein-coupled receptors. J Biomol Screen. 2005 Aug; 10(5):437-46)、-アレスチンのレクルートメント(Hudson CC, Oakley RH, Sjaastad MD, Loomis CR. High-content screening of known G protein-coupled receptors by arrestin translocation. Methods Enzymol. 2006; 414:63-78)、GTPアーゼ活性の測定などのGタンパク質の活性化(Jameson EE, Roof RA, Whorton MR, Mosberg HI, Sunahara RK, Neubig RR, Kennedy RT. Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. J Biol Chem. 2005 Mar 4; 280(9):7712-9)、又は[35S]GTP-S結合の測定(Rodgers G, Hubert C, McKinzie J, Suter T, Statnick M, Emmerson P, Stancato L. Development of displacement binding and GTPgammaS scintillation proximity assays for the identification of antagonists of the micro-opioid receptor. Assay Drug Dev Technol. 2003 Oct; 1(5):627-36)。

典型的には、受容体の活性化を調節する結合パートナーが選択される。

【0294】

アゴニスト結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には受容体の天然リガンドの活性を模倣し、受容体の活性化、Gタンパク質の活性化又はシグナル伝達の上昇を生じさせるであろう。これは付加的なアゴニストの不在下で起こる。アゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1000倍又は10000倍上昇させてよい。

【0295】

結合パートナーが受容体の活性化を上昇させ得る2つの方法があると解されるであろう。例えば、結合パートナーは直接アゴニストとして作用してよく、その場合受容体の活性化は、典型的には2から1000倍高められる。他の方法では、結合パートナーはアゴニストの活性を増幅するように作用してよい。例えば、結合パートナーはアゴニストの作用強度を上昇させてよく、その場合受容体の活性化は、典型的には2から1000倍、例えば10から100倍高められ、又は結合パートナーはアゴニストによってもたらされる最大応答を上昇させてよく、その場合受容体の活性化は、典型的には2から10倍高められる。内因性リガンドによって既にスイッチが入った受容体の活性を活性化／増幅する工程は、より生理的に特異的であり、脱感作及び望ましくない副作用などの問題を軽減し得るので、全ての利用可能な受容体のスイッチを入れるために好ましいと解されるであろう (Christopoulos A (2002) Nat Rev Drug Discov 1: 198 - 210)。

10

20

30

40

50

【0296】

アンタゴニスト結合パートナーの場合には、結合パートナーは、典型的には受容体の活性又はアゴニストによるその活性化をブロックするように働く。アンタゴニスト結合パートナーは、アゴニストの結合をブロックすることによって又はGタンパク質に共役することが不可能であるように受容体を不活性形態に固定することによってこれを行ってよい。アンタゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1000倍又は10000倍低下させてよい。典型的には、アンタゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を検出不能なレベルに低下させるであろう。

【0297】

複数のGPCRに結合する試験化合物又は試験化合物の組み合わせを生成することが望ましい場合があると解されるであろう。例えば、試験化合物は同じクラスのファミリーの複数のGPCRに結合してよい。GPCRのクラス及びファミリーのリストが、International Union of Pharmacology (Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279 - 288)によって作成されており、このリストは [http://www.iuphar-db.org/GPCR/Receptor\\_Families\\_Foward](http://www.iuphar-db.org/GPCR/Receptor_Families_Foward)において定期的に更新されている。試験化合物は、1つの標的GPCR及び少なくとも1つの更なるGPCRに結合してよい。少なくとも1つの更なるGPCRは、疾患経路に関係があるとされてきたGPCR、又は標的GPCRと同じシグナル伝達経路、例えば疾患経路を制御する若しくは調節するシグナル伝達経路に関与するGPCRであってよい。加えて、少なくとも1つの更なるGPCRは、標的GPCRに対する試験化合物の作用を増強する又は抑制するものであってよい。その様な作用の増強又は抑制は、結合アッセイ及び、例えば上述の、機能的アッセイを含む、当該技術分野においてよく知られた方法を使用して測定してよい。

【0298】

したがって、1つの実施態様では、複数のGPCR変異体が工程(a)で提供される。例えば、異なる親GPCRの少なくとも2、3、4又は5つのGPCR変異体が工程(a)で提供されてよい。かくして、この実施態様では、複数のGPCRに結合する試験化合物が選択される。化合物は、例えば、低分子、アフィボディ、抗体又はダイアボディを含

む交差反応性化合物であってよい。その様なアプローチは結合パートナーの効果又は作用強度の改善をもたらし得ると解されるであろう。

#### 【0299】

かくして、第一と第二のG P C Rに結合する試験化合物が選択されてよく、この場合、第一と第二のG P C Rは任意の対のG P C Rであってよい。例えば、前記方法を使用して、ヘテロ二量体を形成するG P C Rに結合する二価パートナーを選択してよく、この場合、二価パートナーは両方の受容体に同時に結合してよい。これに関する適切なG P C Rヘテロ二量体の例は、ドーパミンD1及びアデノシンA1、オピオイド受容体ヘテロ二量体、カンナビノイドCB1及びオレキシン受容体を含む(Marshall F H. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Feb; 1(1): 40-4; Kent T, McAlpine C, Sabetnia S, Presland J. G-protein-coupled receptor heterodimerization: assay technologies to clinical significance. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 Sep; 10(5): 580-9)。さらに、増強された治療活性のために2つの独立した受容体に結合して、それらの受容体の活性を調節する結合パートナーが選択されてよい。例えば、CCK1/オピオイド受容体ペプチドは、CCK1とオポイド受容体の両方に結合する(Garcia-Lopez M T, Gonzalez-Muniz R, Martin-Martinez M, Herranz R. Strategies for design of non peptide CCK1 receptor agonist/antagonist ligands. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7(12): 1180-94)。他の適切な例は、2アゴニストとムスカリンアンタゴニストの組み合わせ；ドーパミンD2と5HT2アンタゴニストの組み合わせ；D2アンタゴニストと5HT6アンタゴニストの組み合わせ；及びM1アゴニストと5HT6アンタゴニストの組み合わせを含む。

#### 【0300】

工程(a)で提供される複数のG P C Rは、同じ立体構造を備えてよく又は同じ立体構造を備えなくてもよいと解されるであろう。例えば、ダイアボディ又は同様の二価結合パートナーは、分子の一方の末端でアゴナイズし、他方の末端でアンタゴナイズしてよく、この場合、G P C Rは同じ立体構造を備える必要はないであろう。

#### 【0301】

典型的には、複数のG P C Rに結合する試験化合物が選択される場合、試験化合物は同様の作用強度で各々のG P C Rに結合する。典型的には、それらのG P C Rの各々に結合する特定の結合パートナーのK<sub>d</sub>値は、互いの5から10倍の範囲内、例えば2から3倍の範囲内である。

#### 【0302】

本発明の方法は、1つの試験化合物でこの方法を反復すること、この方法の1つのサイクルにおいて複数の試験化合物を提供すること、又はこの方法において試験化合物のライブラリーを使用することのいずれかによって、複数のG P C Rに結合する試験化合物の組み合わせを単離することを可能にすると解されるであろう。

#### 【0303】

更なる実施態様では、依然として第一のG P C Rに結合することは可能であるが、少なくとも1つの他のG P C R、例えば第二のG P C Rには結合することができない、又は第一のG P C Rよりも弱くしか結合できない試験化合物を選択することは好都合であろう。第一と第二のG P C Rは任意の対のG P C Rであってよいと解されるであろう。かくして、例えば、試験化合物は、第一のG P C Rに結合することに基づいて選択されるものであってよいが、そのようにして選択された試験化合物は、それが第二のG P C Rに結合する(又は第一のG P C Rよりも弱く第二のG P C Rに結合する)か否かを測定するためにさらに試験される。第二のG P C Rに結合しない(又は第二のG P C Rに対して低い結合を

有する)試験化合物が選択される。結合パートナーが治療用分子である場合、その様なアプローチは結合パートナーの毒性を低下させるのに役立ち得る。

【0304】

試験化合物は、第一のG P C Rに対して前記化合物が有する親和性の50%未満、より好ましくは第一のG P C Rに対して前記化合物が有する親和性の10%未満、さらに好ましくは1%未満又は0.1%未満又は0.01%未満の親和性で更なる(第二の)G P C Rに結合する。かくして、第一のG P C Rと試験化合物の相互作用についてのK<sub>d</sub>は、第二のG P C RについてのK<sub>d</sub>よりも高い。

【0305】

本発明の第二の態様は、G P C Rの結合パートナーを生成するための方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の態様による方法を実施することによって同定可能な結合パートナーを合成することを含む。

10

【0306】

結合パートナーは、有機化学、分子生物学又は生化学の技術を含む、当該技術分野において知られる任意の適切な方法によって合成してよい。例えば、結合パートナーがポリペプチドである場合、結合パートナーは、当該技術分野において知られるように、結合パートナーをコードする核酸分子を適切な宿主細胞において発現させることによって作製してよい。抗体は、例えば、組換えD N A技術を含む上述の方法のいずれかを使用して合成してよい。

20

【0307】

本発明の第三の態様は、本発明の第一の態様の方法のいずれかによって得られる結合パートナーを提供する。

【0308】

1つの実施態様では、結合パートナーは、上述した立体構造特異的結合パートナーである。

30

【0309】

本発明の第四の態様は、本発明の第一の態様の方法のいずれかによって得ることが可能な結合パートナー、例えば立体構造特異的結合パートナーを提供する。

【0310】

結合パートナーは、ポリペプチド：アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アブタマー；ダルビン；F a b、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、s c F v若しくはd A b抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質(D A R P i n)を含むモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質；又はリポカリン若しくはフィプロネクチンドメイン又はヒトクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールド、に基づくタンパク質の任意のものであってよい。

【0311】

好みの実施態様では、結合パートナーは抗体である。例えば、抗体は、G P C Rにおける非隣接エピトープに特異的であってよく、又はG P C Rにおける隣接するエピトープに特異的であってよい。好みの場合は、抗体によって認識される親G P C R及びG P C R変異体における関連エピトープは、それらが隣接しているか又は非隣接であるかにかかわらず、類似する。特に、親G P C R及びG P C R変異体のC若しくはN末端又はポリペプチドループなどの細胞外エピトープは、好みの場合は類似する。

40

【0312】

典型的には、結合パートナーは、親G P C Rに対してと同様の作用強度でG P C R変異体に結合。典型的には、G P C R変異体及び親G P C Rに結合する特定の結合パートナーについてのK<sub>d</sub>値は、互いに5から10倍、例えば2から3倍の範囲である。典型的には、親G P C Rと比較してG P C R変異体に対する結合パートナーの結合は、最大で5倍弱

50

く、最大で10倍強いであろう。

【0313】

典型的には、選択された立体構造で安定化された受容体変異体は、親受容体と同程度(すなわち、典型的には2から3倍以内)又はそれ以上の親和性で結合パートナーに結合するはずである。アゴニスト立体構造の結合パートナーに関して、前記変異体は、典型的には、親G P C Rと同程度又はそれよりも高い親和性で前記アゴニストと結合し、典型的には、親G P C Rと同程度又はそれ未満の親和性でアンタゴニストと結合する。同様に、アンタゴニスト立体構造の結合パートナーに関して、前記変異体は、典型的には、親G P C Rと同程度又はそれよりも高い親和性でアンタゴニストと結合し、典型的には、親G P C Rと同程度又はそれ未満の親和性でアゴニストと結合する。

10

【0314】

本発明の方法は、分子、特に生体分子などの標的物質を検出するためのバイオセンサーとして使用してよいと解される。例えば、前記バイオセンサーは、診断又は予後徵候として使用し得る疾患又は薬剤治療のバイオマーカーを検出するために使用してよい。G P C R変異体をセンサー表面に固定化し、例えば、上述の表面プラズモン共鳴によって、化合物の結合を検出してよい。バイオセンサーの更なる例では、受容体に結合する化合物を、内在性トリプトファン蛍光の変化によって又は内在性トリプトファン常在ドナーと蛍光アクセプターとの間の蛍光共鳴エネルギー移動を使用して検出してよい(Lakowicz J R 1999. Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum New York, Martin DD, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN. J Biol Chem. 2006 Jul 21; 281(29): 20418-26)。代替的には、G P C R変異体を音響バイオセンサーとして使用してよく、その場合は、G P C R変異体を水晶振動子センサー(QCRS)に固定化し、音響センサー応答を化合物-G P C R変異体結合相互作用を検出するために使用する(Cooper MA, Drug Discovered Today. 2006 Dec; 11(23-24): 1068-74. Epub 2006 Oct 20)。

20

【0315】

したがって、本発明の第五の態様は、親G P C Rと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する親G P C RのG P C R変異体を含むバイオセンサーであって、標的物質が前記G P C R変異体に結合した場合、検出可能なシグナルが生成されるバイオセンサーを提供する。

30

【0316】

G P C R変異体及びそれらの生成の方法は、本発明の第一の態様に関して上記で規定したものであることが好ましい。

【0317】

好ましくは、バイオセンサーはチップ形態又はビーズ支持形態であり、G P C R変異体はチップ又はビーズに固定化され、標的物質を検出するために使用される。しかしながら、G P C R変異体は可溶化形態で提供されてよく、その場合バイオセンサーは溶液を含むと解されるであろう。

40

【0318】

バイオセンサーへの組込みのための固体支持体へのG P C R変異体の固定化は、当該技術分野でよく知られ、本発明の第一の態様に関して上述した方法を使用して実施してよい。典型的には、G P C R変異体は、流量依存性表面再構成(flow-mediated surface reconstitution)を介した直接バイオセンサー分析に適するチップ表面に再構成される(Karlsson et al., Analytical Biochemistry 300, 132-138 (2002))。例えば、長いアルキル基で修飾されたカルボキシル化デキストラン表面へのG P C Rの迅速な固定化と再構成は、界面活性剤で可溶化された受容体のアミンカップリング後に達成可能である;多くのバイオセンサーシステムにおいて存在する内蔵フローセルを利用して、それらを

50

固定化表面に注入したとき、脂質／界面活性剤混合ミセルが付着する。界面活性剤はその後の緩衝液流に溶出され、機能性で無傷の G P C R 変異体がその後のスクリーニングと分析のために残される。界面活性剤を含有するその様な G P C R 変異体製剤は、水晶膜厚計バイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、プレーナー導波路バイオセンサー、表面ラマンセンサー、又は表面プラズモン共鳴バイオセンサーなどの、フローベースのバイオセンサーにおける使用に理想的に適する。後者の場合、可溶化された受容体は、 G E

Health care ( Biacore ) CM4 又は CM5 デキストランセンサーチップ上に捕捉されてよい。センサーチップのデキストランマトリックスを、 5  $\mu$  L / 分の流速の 35  $\mu$  L の 50 mM N - ヒドロキシスクシンイミド及び 200 mM N - エチル - N - [ (ジメチルアミノ) プロピル ] カルボジイミド、次いで 0.1 mg / mL の界面活性剤で可溶化された G P C R 受容体（例えば、 10 mM MOPS 、 pH 7.5 中の 25 mM CHAPS ）の 7 分間の注入によって活性化する。残存する反応性カルボキシ基は、 1 M 塩酸エタノールアミン、 pH 8.5 の 7 分のパルスを使用して不活性化する。注入後、バイオセンサーチップを、安定な基線が回復されるまで（約 30 分間）表面プラズモン共鳴作業溶液により高流量で洗浄する。この洗浄工程はフロー透析手順と同様に機能し、センサーチップ表面からの界面活性剤の除去を確実にする；しかし、 G P C R の疎水性部分は、機能的完全性を維持するために依然として一部の脂質又は界面活性剤分子に結合していてよいと解されるであろう。

### 【 0319 】

標的物質は、分子、生体分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、 G P C R リガンド、合成分子、薬剤、薬剤代謝産物又は疾患バイオマーカーの任意のものであってよい。

### 【 0320 】

1つの実施態様では、検出可能なシグナルは、色の変化；蛍光；エバネッセンス；表面プラズモン共鳴；電気伝導度若しくは電荷分離；紫外、可視若しくは赤外吸収；発光；化学発光；電気化学発光；蛍光異方性；蛍光強度；蛍光寿命；蛍光偏光；蛍光エネルギー移動；分子量；電子スピン共鳴；核磁気共鳴；流体力学的容積若しくは半径；比重；シンチレーション；電界効果抵抗；電気インピーダンス；音響インピーダンス；量子消失（ quantum evanescence ）；共鳴散乱；蛍光クエンチング；蛍光相關分光法；音響負荷；音響せん断波速度；結合力；又は界面応力のいずれかである。

### 【 0321 】

本発明を、以下の図面及び実施例を参照してより詳細に記載する。

#### 【 図面の簡単な説明 】

### 【 0322 】

【 図 1 】 AR におけるアミノ酸変化は熱安定性を誘導する。安定性指数は、 32 で 30 分間に亘ってサンプルを加熱した後に変異体の残存する結合活性の % を示す。全ての値は、 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub> ( 50 % 、破線で示す ) に対して標準化されて、アッセイの間の任意の実験のばらつきを除去する。バーは各変異体の安定性を示す。x 軸の文字は、変異に存在するアミノ酸を示す。 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub> における本来のアミノ酸及びその位置は下に示す。 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub> における同じアミノ酸に対応するバーは同じ色のものであり、最も良好な変異を矢印で示す。誤差は、測定を重複して行って算出し、最も良好な変異体は、その後に再びアッセイして各変異についての Tm を測定し、各変異体についての安定性の正確な順位を得た（実施例 1 参照）。

【 図 2 】 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub> における熱安定化変異に対応する位置であるロドプシンにおける側鎖。 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub> における変異アミノ酸残基に対応するロドプシンにおけるアミノ酸残基を、ロドプシン、 1 アドレナリン受容体、ニューロテンシン受容体、及びアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体の間のアラインメントに基づいて、ロドプシン構造に示す（データ示さず）。同じ膜貫通ヘリックスにおける側鎖は、同じ色の空間充填モデルとして示す。アミノ酸残基の名前及び位置はロドプシンのものである。

【 図 3 】 AR における熱安定性の進化。 AR - m10 - 8 から出発して、変異の組み

10

20

30

40

50

合わせを系統的に再配列させて、変異の最適な組み合わせを見出した（表2参照）。

【図4】apo-state又は結合したアンタゴニスト [ $^3\text{H}$ ] - DHAの含有におけるAR-m23及びAR<sub>34-424</sub>の安定性。リガンドの非存在下(apo-state、破線)においてTmを測定するために、界面活性剤で可溶化した受容体を、結合アッセイを実施する前に、所定の温度で30分に亘ってインキュベートした。アンタゴニストが結合した形態のTm測定のために(連続線)、界面活性剤で可溶化した受容体を、 [ $^3\text{H}$ ] - DHAと事前インキュベートした後に所定の温度でインキュベートした。AR-m23(丸)及びAR<sub>34-424</sub>(四角)。データポイントは、代表的な実験の二回重複した測定によるものである。

【図5】AR-m23及びAR<sub>34-424</sub>に対するアゴニストの競争的結合。結合アッセイをDDM中で部分的に精製した受容体に対して実施した；AR-m23(三角)及びAR<sub>34-424</sub>(四角)。 [ $^3\text{H}$ ] - DHAは部分的に精製した受容体のK<sub>D</sub>の三倍大きい濃度で使用した(方法参照)。 [ $^3\text{H}$ ] - DHA結合は、アゴニストであるノルエピネフリン(a)及びイソプレナリン(b)又はアンタゴニストであるアルプレノロール(c)の濃度の増大とともに競争的であった。異なるリガンドについてのLog EC<sub>50</sub>及び対応するEC<sub>50</sub>値は、Graph Pad Prismソフトウェアを使用して非線形回帰によって算出し、Log EC<sub>50</sub>の誤差は10%未満であった。AR<sub>34-424</sub>及びAR-m23に対するリガンド結合のEC<sub>50</sub>は、ノルエピネフリン、AR<sub>34-424</sub>1.5 μM、AR-m23 3.7 mM; イソプレナリン、AR<sub>34-424</sub>330 nM、AR-m23 20 μM; アルプレノロール、AR 78 nM、AR-m23 112 nM。

【図6】5種の異なる界面活性剤におけるAR-m23及びAR<sub>34-424</sub>の安定性。DDM中で可溶化したAR-m23(a)及びAR<sub>34-424</sub>(b)のサンプルは、各種の異なる界面活性剤：DDM(四角)、DM(三角)、OG(逆三角)、LDAO(菱形)、及びNG(丸)に交換することが可能なNi-NTAアガロースカラムで部分的に精製した。ARはOG、NG、及びLDAO中で非常に不安定であるため、6で精製した後に任意の活性を測定することが不可能であった。アッセイは方法に記載のように実施し、曲線及び破線の間の交差下部分でTmを示している。結果は、平行に実施した代表的な実験の二回重複した試験によるものである。(c) AR-m23変異体の結晶の顕微鏡写真であり、X線回折による良好な秩序を示した。

【図7】AR<sub>34-424</sub>の熱安定性曲線(Tm)。結合アッセイを、「方法」に記載したように放射リガンドである [ $^3\text{H}$ ] - ジヒドロアルプレノロール(DHA)を使用して実施した。サンプルをアッセイの前に異なる温度で30分間に亘って加熱した。Tmは結合が50%まで低減する温度を表わし、その値を破線で示す。データポイントは、単独の試験の二回重複によるものである。この実験を数回繰り返し、同様の結果であった。

【図8】AR<sub>34-424</sub>及びAR-m23の膜の飽和結合アッセイ。結合アッセイは、放射リガンドとして [ $^3\text{H}$ ] - ジヒドロアルプレノロール(DHA)を使用する「方法」に記載のように実施した；AR<sub>34-424</sub>(a)及びAR-m23(b)。スカッチャードプロットは、B<sub>max</sub>及びK<sub>D</sub>についての対応する値とともに差込図として示した。データポイントは、各タンパク質の2つの独立した実験の二回重複によるものである。データは、Prismソフトウェア(Graph Pad)を使用して非線形回帰によって分析した。

【図9A】ヒト1、2、及び3受容体とシチメンチョウ-アドレナリン受容体とのアラインメント。

【図9B】ヒト1、2、及び3受容体とシチメンチョウ-アドレナリン受容体とのアラインメント。

【図10A】ヒトアデノシン受容体のアラインメント。

【図10B】ヒトアデノシン受容体のアラインメント。

【図11A】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図11B】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

10

20

30

40

50

【図12】受容体熱安定性を測定するために使用するリガンド(+)及びリガンド(-)の2つの異なるアッセイ様式を示すフローチャート。

【図13A】熱安定性アデノシンA2a受容体変異体であるRant21の薬理学的プロフィール。(A)アンタゴニスト及び(B)アゴニストの可溶化受容体に対する飽和結合。(C-F)アンタゴニストである(C)XAC及び(D)テオフィリン並びにアゴニストである(E)NECA及び(F)R-PIAの濃度の増大による[<sup>3</sup>H]ZM241385結合の阻害；未標識リガンドの不在下における[<sup>3</sup>H]ZM241385(10nM)の結合は100%に設定した。各可溶化受容体は、400mM NaClを含有する結合緩衝液(50mM Tris pH 7.5及び0.025% DDM)中で氷上において1時間に亘ってリガンドとインキュベートした(A、C-F)。示されているデータは、三回重複して測定した各データポイントで、2つの独立した実験によるものである。K<sub>D</sub>及びK<sub>i</sub>値は表(iii)に示す。

【図13B】熱安定性アデノシンA2a受容体変異体であるRant21の薬理学的プロフィール。(A)アンタゴニスト及び(B)アゴニストの可溶化受容体に対する飽和結合。(C-F)アンタゴニストである(C)XAC及び(D)テオフィリン並びにアゴニストである(E)NECA及び(F)R-PIAの濃度の増大による[<sup>3</sup>H]ZM241385結合の阻害；未標識リガンドの不在下における[<sup>3</sup>H]ZM241385(10nM)の結合は100%に設定した。各可溶化受容体は、400mM NaClを含有する結合緩衝液(50mM Tris pH 7.5及び0.025% DDM)中で氷上において1時間に亘ってリガンドとインキュベートした(A、C-F)。示されているデータは、三回重複して測定した各データポイントで、2つの独立した実験によるものである。K<sub>D</sub>及びK<sub>i</sub>値は表(iii)に示す。

【図14】熱安定変異体は、野生型受容体と比較した際の加熱に対する、脂質(A)依存性の低減及びDDM(B)のより高い濃度における増大された生存を示す。受容体は、1% DDM(50mM Tris pH 7.5及び400mM NaCl)で可溶化し、IMAC工程についてNi-NTAアガロースに固定化した。DDM及び/又は脂質の適当な濃度を含有する緩衝液の交換を、Ni-NTAビーズからの洗浄及び溶出の間に実施した。

【図15】ヒト2アドレナリン受容体構造における相同残基(M82、Y219、C265、及びA321)に対する、シチメンチョウ1アドレナリン受容体におけるM90V、Y227A、A282L、及びF338M m23変異のマッピング(Rasmussen et al (2007) Nature 15;383-387; pdb accession codes 2R4R and 2R4S)が、ヘリックス界面及びヘリックスの折れ曲がり(キンク)の各々に位置することを明らかにする。シチメンチョウ1アドレナリン受容体における熱安定変異に対応する位置におけるアミノ酸残基を、標識空間充填モデルとして示している。

【図16】ヒト2アドレナリン受容体構造における相同残基に対する、シチメンチョウ1アドレナリン受容体におけるm23のマッピング(Cherezov et al (2007) Science, 318:1258-65; pdb accession code 2RH1)。2ARのCトレースが、除去された誘導部分(T4リソザイム)で示される。AR-m23における6つの変異(R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M)は、ヒト2ARにおけるアミノ酸残基K60, M82, Y219, C265, L310, F321と対応する。Lys60は、ヘリックス1の細胞内末端上に位置し、脂質-水界面を向いている。Met82はヘリックス2の中央部付近に存在し、リガンド結合ポケットを向いている；基質であるカラゾロールとMet側鎖との最も近接した間隔は5.7である。Tyr219はヘリックス5の細胞内末端に対し、ヘリックス5-ヘリックス6界面に存在する。Cys265はヘリックス5と6の間のループ領域の末端に存在し、膜貫通領域の反対の方向に向いている。Leu310及びPhe321の双方はヘリックス7に存在し、双方が脂質二重層を向いている。

【図17】ヒト-2AR、ラットNTTR、シチメンチョウ-1AR、ヒトアデノシンA2aR、及びヒトムスカリンM1受容体の多重配列アラインメント。各配列において、熱安定化変異が四角で囲って印を付けている。2以上の配列に生じている変異を星で示す

。

【図18】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異155Aのマッピング(ヒト 2ARI47)。変異は、3ヘリックス(H1、H2折れ曲がり(キンク)、H7折れ曲がり(キンク))の間の界面に存在する。左：側面図；右：平面図である。

【図19】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異V89Lのマッピング(ヒト 2ARV81)。変異は、ヘリックス2の折れ曲がり(キンク)に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基は空間充填モデルとして示しており、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。

【図20】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異M90Vのマッピング(ヒト 2ARM82)。変異は、結合ポケットに対して向いているヘリックス2の折れ曲がり(キンク)に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストを空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基は、空間充填モデルとして示しており、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図であった。

【図21】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異I129Vのマッピング(ヒト 2ARI121)。変異はヘリックス5の折れ曲がり(キンク)の逆に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストを空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：底面図である。

【図22】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異F338Mのマッピング(ヒト 2ARF321)。変異はヘリックス7の折れ曲がり(キンク)に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。

【図23】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異Y227Aのマッピング(ヒト 2ARY219)。変異はヘリックス-ヘリックス界面に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：底面図である。

【図24】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異A282Lのマッピング(ヒト 2ARC265)。変異はループ領域に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。

【図25】ヒト 2AR構造(pdb登録コード2RH1)に対する、シチメンチョウ1AR変異R68Sのマッピング(ヒト 2ARK60)。変異は脂質-水境界に存在し、溶媒に向いている。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウ 1アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：斜視図である。

【図26】3つのアドレナリン受容体(シチメンチョウ 1( )、ヒト 1( )、及びヒト 2( ))並びに2つの熱安定化受容体(シチメンチョウ 1-m23( )及びヒト 2-m23( ))の熱安定性の比較。1-m23における6つの熱安定化

10

20

30

40

50

変異 (R 6 8 S、M 9 0 V、Y 2 2 7 A、A 2 8 2 L、F 3 2 7 A、F 3 3 8 M) を、図 9 におけるアラインメントに基づいて、ヒト 2 受容体 (K 6 0 S、M 8 2 V、Y 2 1 9 A、C 2 6 5 L、L 3 1 0 A、F 3 2 1 M) に直接転用して、2 - m 2 3 を作製した。結果として得られる変異体は、哺乳動物細胞において一過的に発現させて、0 . 1 % ドデシルマルトシドに可溶化して、マイナスリガンドフォーマット (apo 状態で加熱し、氷上で停止させ、3 H - D H A を添加する) で熱安定性を評価した。シチメンチョウ 1 及び 2 - m 2 3 の見かけの Tm は、2 3 及び 4 5 の各々であり、大腸菌で発現させた受容体において過去に認められているように 2 2 の Tm を示した。ヒト 2 及び 2 - m 2 3 の Tm は、2 9 及び 4 1 の各々であり、apo 受容体は 1 2 で安定化されることが示された。このことは、1 つの受容体から他の受容体に熱安定化変異を転用することが可能であるという概念を例示するものであり、この場合には 5 9 % の配列同一性を有する。ヒト 1 受容体 (Tm ~ 1 2 ) は、シチメンチョウ 1 受容体よりも非常に低い安定性を示す。

【図 27】シチメンチョウ 1 アドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、及びラットニューロテンシン受容体の、ヒト アドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、及びヒトニューロテンシン受容体の各々に対する同一性の割合。

【図 28 A】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図 28 B】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図 29】阻害性 s c F v 結合物質の同定のための典型的なリード化合物単離工程の概略図。

【図 30 A】ポリクローナルファージ E L I S A の結果。

【図 30 B】モノクローナルファージ E L I S A の結果。(B) 9 6 穴 E L I S A プレートの横列 A ~ H の縦列 1 ~ 9 を使用して 6 9 の抗 - A R ファージクローンをスクリーニングした。

【図 31 A】 - アドレナリン受容体及び 3 つの無関係な対照タンパク質 (CD 8 6 - C D 4、Notch 1 - Fc 及び Notch 1 の NRR 領域) を使用した特異性ファージ E L I S A。2 つの E L I S A プレート、アミノプレート (A) 及び His プレート (B) に被覆したタンパク質を示す。左から右の (C 1、E 2、A 3、G 3、C 4、D 4、F 4、H 4、D 5、F 5、G 5、C 6、D 6、C 7、F 7、B 8 及び C 8) - A R ファージクローン (影を付けた (ハシュ) バー) の名称は、図 30 に示すスクリーニングに由来する。グラフにおいて、粘着性抗 - A R クローンを対応するバーの上方にクローン名によって指示している。対照タンパク質、抗 - CD 8 6 (灰色のバー)、抗 - N 1 EGF (白色のバー) 及び抗 - N 1 NRR (点々を付けたバー) に特異的な対照ファージ集団の結合も示す。

【図 31 B】 - アドレナリン受容体及び 3 つの無関係な対照タンパク質 (CD 8 6 - C D 4、Notch 1 - Fc 及び Notch 1 の NRR 領域) を使用した特異性ファージ E L I S A。2 つの E L I S A プレート、アミノプレート (A) 及び His プレート (B) に被覆したタンパク質を示す。左から右の (C 1、E 2、A 3、G 3、C 4、D 4、F 4、H 4、D 5、F 5、G 5、C 6、D 6、C 7、F 7、B 8 及び C 8) - A R ファージクローン (影を付けた (ハシュ) バー) の名称は、図 30 に示すスクリーニングに由来する。グラフにおいて、粘着性抗 - A R クローンを対応するバーの上方にクローン名によって指示している。対照タンパク質、抗 - CD 8 6 (灰色のバー)、抗 - N 1 EGF (白色のバー) 及び抗 - N 1 NRR (点々を付けたバー) に特異的な対照ファージ集団の結合も示す。

【図 32】抗 - - A R 抗体クローン (白色のバー) 及び陽性対照抗体 (黒色のバー) 及び抗体なしの陰性対照 (黒色のバー) を示す。

【図 33】ストレプトアビジン被覆フローセルへのビオチニル化 1 A R の 2 つの捕捉段階。A ~ 1 2 0 0 R U 捕捉；B ~ 4 0 0 0 R U 捕捉。

【図 34】アルプレノールに対する Biacore 応答。最高濃度は 6 6 6 nM であり、各々の濃度を 3 倍希釈系列において 3 回試験した。応答は濃度依存性であり、極めて再現

性がある。線は、簡単な 1 : 1 相互作用モデルのフィットを表示し、このフィットから決定したパラメータを挿入図に列挙する（括弧内の数字は最後の桁の誤差である）。

【図 35】アルプレノールに対する標準化された応答。応答は、各々の曲線について決定した（フィッティングから）R<sub>max</sub>に対して標準化されている。

【図 36】プロプラノロールに対する Biacore 応答。最高濃度は 111 nM であり、各々の濃度を 3 倍希釀系列において 2 回又は 3 回試験した。

【図 37】プロプラノロールに対する標準化された応答。応答は、各々の曲線について決定した（フィッティングから）R<sub>max</sub>に対して標準化されている。

【図 38】ほぼ 3 日齢の 1 AR 表面上のアルプレノロールに対する Biacore 応答。  
10

【図 39】8000 RU の密度に対する 1 AR の捕捉。

【図 40】8000 RU の 1 AR 表面上に結合しているアルプレノロールに対する Biacore 応答。

【図 41】2つの異なる表面を使用したサルメテロールに対する Biacore 応答。サルメテロールを 1.67 μM の最高濃度を用いて試験し、各々の濃度を 2 回又は 3 回試験した。A. 4200 RU 表面；B. 8000 RU 表面。8000 RU 表面でより大きな応答が認められる。

【図 42】標準化された応答として示す、サルメテロールに対する Biacore 応答。A. 4200 RU 表面；B. 8000 RU 表面。

【図 43】イソプロテレノールに対する Biacore 応答。イソプロテレノールを 2 μM の最高濃度を用いて試験した。A. 4200 RU 表面；B. 8000 RU 表面。  
20

【図 44】カルベジロールに対する Biacore 応答。A. 5200 RU 表面；B. 8000 RU 表面。

【図 45】[<sup>3</sup>H]ZM241385 を使用して安定化アデノシン A<sub>2a</sub>受容体 (Rant22) における活性について試験した一連の化合物に対する競争的結合曲線。

#### 【実施例】

#### 【0323】

#### (実施例 1)

界面活性剤耐性形態における - アドレナリン受容体の立体構造安定化  
要約

ヒトゲノムによってコードされる 500 超の非嗅覚 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が存在し、その多くが潜在的な治療標的であると予測されているが、ファミリーの全てを代表するものとしてウシロドプシンのみの構造が利用可能である。GPCR 構造決定における進歩の欠落には多数の理由が存在するが、本発明者は、これらの受容体の界面活性剤安定性を改善すること、及び同時にそれらを 1 つの好ましい立体構造に固定化することが、結晶化の可能性を大幅に改善するであろうと仮説を立てた。GPCR、すなわち - アドレナリン受容体の界面活性剤可溶化熱安定化変異体の単離のための一般的な戦略は、アラニンスキャニング変異誘発、それに続く受容体安定性のアッセイに基づいて開発した。試験した 318 の変異体のうち、15 が安定性における測定可能な増大を示した。最初の変異部位の各々におけるアミノ酸の最適化の後に、最適に安定化した受容体を特定の変異を組み合わせることによって構築した。最も安定な受容体変異体である AR-m23 は、6 つの点変異を有し、天然のタンパク質よりも結合したアンタゴニストの存在下で 21 高い Tm を生じさせ、AR-m23 はウシロドプシンと同程度に安定であった。加えて、AR-m23 は広範な界面活性剤において顕著により安定で、結晶化に理想的であり、リガンドの不在下においてアンタゴニスト立体構造で好適に存在した。  
40

#### 【0324】

#### 結果

1 アドレナリン受容体の熱安定性を増大する单一変異の選択

シチメンチョウ赤血球由来の AR はよく特性決定されており、バキュロウイルス発現系を使用して昆虫細胞において高レベルで発現されるため、構造研究に理想的な対象であ  
50

る（非特許文献 10、11）。AR の最も良好な過剰発現は、残基 34 - 424 を含有する受容体の切断型を使用して得られ（AR<sub>34 - 424</sub>）（非特許文献 9）、これが本研究の出発点として使用された。アラニンスキャニング変異誘発を使用して、変異した際に、受容体の熱安定性を変化させる AR<sub>34 - 424</sub> におけるアミノ酸を規定した；アラニンが配列中に存在する場合には、ロイシン残基に変異させた。全部で 318 の変異をアミノ酸残基 37 - 369、7 つの膜貫通ドメインを含む領域、及び C 末端の 23 アミノ酸残基に作製した；15 アミノ酸残基における変異は、DNA 鑄型における強力な二次構造によって得られなかった。各変異体の配列決定をして所望の変異のみが存在することを確認した後に、受容体を大腸菌において機能的に発現させ、安定性についてアッセイした。

10

### 【0325】

熱安定性についてのアッセイは、受容体を 30 分間に亘って 32° で加熱し、氷上で反応を停止させ、次いで、アンタゴニストである [<sup>3</sup>H] - ジヒドロアルプレノロールを使用して放射リガンド結合アッセイを実施して未処理の対象と比較して残存する機能的な AR<sub>34 - 424</sub> 分子の数を測定することによって、未精製界面活性剤可溶化受容体に対して実施した。非変異 AR<sub>34 - 424</sub> をアッセイ前に 30 分間に亘って 32° で加熱することで、未加熱の対照の約 50%まで結合が低減した（図 7）；変異体についての全てのデータは、実施した全てのアッセイにおいて非変異 AR<sub>34 - 424</sub> を対照として含めることによって標準化した。一巡目のスクリーニングにおいて、18 の変異が安定性における明らかな増大を示し、加熱後に 75% 超のアゴニスト結合を保持し、天然の AR<sub>34 - 424</sub> の少なくとも 50% のレベルで大腸菌において発現した。これらの変異の更なる安定性の増大の可能性の観点から、18 残基の各々を 2 - 5 の異なるサイズ又は電荷の代替的なアミノ酸残基に変異させた（図 1）。これら 18 の変異体のうち、12 が更なる変化によって改善し、5 が他のアミノ酸が存在する場合に更に良好な熱安定性を有し、第一のスクリーニングに由来する 1 つの変異が擬陽性であったことが明らかになった。加えて、アラニンへの変異では安定化されなかった 3 つの残基（V89、S151、L221）を広範な他のアミノ酸残基に変異させた；アラニンに変異させた際に熱安定性に影響しなかった 2 つの位置は、他の変化によっても影響を受けなかった。対照的に、V89 はアラニンに変異させた際により低い熱安定性を示したが、Leu に変異させた際は熱安定性が増大した。かくして、最初のアラニンスキャニングは、任意の所定の位置について試験したものの中最も良好なアミノ酸残基の三分の一を示した。

20

### 【0326】

変異された際に熱安定性の最も良好な増大を示した 16 のアミノ酸残基の各々について予測される位置及び環境を、構造が既知のロドプシンの配列と AR 配列とのアラインメントによって決定した（図 2）。これらの残基の 14 は、膜貫通 - ヘリックスに存在すると予測され、そのうち 5 つの残基は脂質に向いていると予測され、4 つは深く埋め込まれており、残部の残基はヘリックスの間の界面に存在すると予測された。連続的なアミノ酸である G67 及び R68（ロドプシンにおける V63 及び Q64）またはヘリックス 5 におけるクラスター Y227、R229、V230、及び A234（ロドプシンにおける Y223、Q225、L226、及び V230）などの、これらの残基の幾つかは、AR 構造において互いに相互作用していると予測されるだろう。AR 中で相互作用し得る他のアミノ酸残基は、外側のループ 2 の Q194A 及び外側のループ 3 の D322A であった（ロドプシンにおける G182 及び P285 の各々）。

30

### 【0327】

個々の変異の各々が AR<sub>34 - 424</sub> に与えた安定性の増大は、各変異体の Tm を測定することによって決定した（結果示さず）；ここで Tm は 30 分間に亘って受容体を加熱した後の機能的な結合における 50% の低減を与える温度である。8° まで Tm を増大させた M90A 及び Y227A を除いて、各変異は 1 から 3° で AR<sub>34 - 424</sub> の Tm を増大させた。

40

### 【0328】

50

### 最適な安定受容体を作製するための変異の組み合わせ

最初に、A R の一次アミノ酸配列において互いに隣接する、熱安定性を改善した変異を組み合わせた。G 6 7 A 及び R 6 8 S という変異又はヘリックス 5 の末端の変異の異なる組み合わせ (Y 2 2 7 A、R 2 2 9 Q、V 2 3 0 A、及び A 2 3 4 L) を含有する構築物を発現させて、アッセイした；Tm 値（結果示さず）は、A R<sub>3 4 - 4 2 4</sub> の Tm よりも 1 から 3 のみ高く、1 つの変異は実際には僅かにより安定でないものであり、一次アミノ酸配列において互いに隣接する変異の組み合わせは大きく熱安定性を改善するものではないことが示唆された。続いて、構造において互いに離れていると予測された変異を組み合わせた。各種のプライマー混合物を使用して PCR 反応を実施し、無作為な様式で 5 つの異なる変異を組み合わせ、次いで、熱安定性について試験した（表 1）。これらの組み合わせの最も良好なものは、A R<sub>3 4 - 4 2 4</sub> の Tm と比較して 10 より大きく Tm を増大させた。幾つかの場合では、個々の変異の連続的な包含で Tm に対しては相加的な効果が明らかに存在した。これは一連の 3 つの変異体、m 4 - 1、m 4 - 7、及び m 4 - 2 において認められ、m 4 - 1 に対する V 2 3 0 A の付加は Tm を 2 増大させ、m 4 - 7 における D 3 3 2 A という付加的な変異は Tm をさらに 3 增大させる。Y 2 2 7 A 及び M 9 0 A を含有する変異体の全ては、10 以上の Tm の増大を示した。これらの 2 つの変異が共に、A R<sub>3 4 - 4 2 4</sub> の Tm を 13 まで増大させたが（m 7 - 5）、アンタゴニスト結合全体は A R<sub>3 4 - 4 2 4</sub> の 50 % であり、これらの変異体の発現低下が示唆された。m 7 - 5 に対する F 3 3 8 M の添加は熱安定性を増大しなかったが、大腸菌における機能的な発現のレベルを増大させた。

10

20

30

40

50

### 【0 3 2 9】

#### 【表 1】

表 1 PCR による変異の組み合わせ。選択した変異を含有する異なるペアのプライマーを組み合わせて、10 の PCR 反応を実施した。成功した PCR 反応を表に示す。これらの新規変異体の安定性を図 7 に記載したようにアッセイし、Tm を算出した。結果は重複試験による平均±S.E. として示す。

PCR	受容体	変異	T <sub>m</sub> (°C)
4	βAR <sub>34-424</sub>		31.7±0.1
	m4-1	G67A, G98A	35.5±0.9
	m4-2	G67A, G98A, V230A, D322A	40.9±0.9
	m4-6	G98A, D322A	35.0±0.2
6	m4-7	G67A, G98A, V230A	38.0±1.2
	m6-1	Y227A, A234L, A282L, A334L	41.6±0.9
	m6-4	R68S, Y227A, A234L, A282L	41.6±0.1
	m6-5	R68S, A234L, A282L, A334L	41.9±0.5
	m6-9	R68S, Y227A, A234L, A282L,	43.7±0.4
	m6-10	A334L	47.4±1.1
7	m6-11	R68S, Y227A, A282L, A334L	39.1±0.5
		R68S, A282L, A334L	
	m7-1	M90V, A282L, F338M	43.0±0.8
	m7-2	M90V, A282L	38.9±0.6
	m7-5	M90V, Y227A	45.2±1.0
10	m7-6	M90V, I129V	40.0±0.6
	m7-7	M90V, Y227A, F338M	45.2±2.0
	m10-4	R68S, M90V, V230A, A334L	46.9±1.0
	m10-8	R68S, M90V, V230A, F327A, A334L	47.3±1.4

### 【0 3 3 0】

大腸菌において依然として高レベルで発現した、最も熱安定である得られた変異体は、m 6 - 1 0、m 7 - 7、及び m 1 0 - 8 であった。これらの変異体は合計して全部で 1 0 の異なる変異を含有し、8 つの変異はそれらの変異体の少なくとも 2 種に存在していた。m 1 0 - 8 を鋳型として使用し、m 6 - 1 0 及び m 7 - 7 に存在する変異を添加又は置換することによって、変異誘発の二順目を実施した（図 3）；これらの変異の幾つかは A R

の一次アミノ酸配列において非常に近接していたため、上述のように付加的でなかったが、多数の変異は  $T_m$  をさらに改善した（表2）。例えば、m10-8における2つの変異を交換して、m18を作製すると、49.6まで  $T_m$  を上昇させ、A282Lを添加してm23を作製すると、 $T_m$  をさらに3増大させ52.8とした。これによって、これまで最も熱安定である  $AR_{34-424}$  が生産され、 $AR-m23$ と称する。

## 【0331】

## 【表2】

表2 変異の最も良好な組み合わせの改善。m6-10、m7-7、及びm10-8といった変異体に存在する変化をPCRによって混合して、これらの新規変異体を得た。これらの新規変異体の安定性を図7に記載のようにアッセイし、 $T_m$ を算出した。結果は重複試験による平均±S.E.として示す。

	変異						$T_m$ (°C)	
m17	R68S	M90V	Y227A	V230A	-	F327A	A334L	48.2±1.4
m18	R68S	M90V	Y227A	V230A	A282L	F327A	-	49.6±0.9
m19	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	49.0±0.8
m20	R68S	M90V	-	-	-	F327A	A334L	48.4±0.7
m21	R68S	M90V	Y227A	-	-	F327A	A334L	47.0±1.3
m22	R68S	M90V	Y227A	-	-	F327A	A334L	47.4±0.5
m23	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	52.8±1.4

10

20

30

40

50

## 【0332】

$AR_{34-424}$  変異体を開発するために使用する熱安定性アッセイは、アンタゴニストの不在下において受容体を加熱することによって実施したが、結合したリガンドが受容体を安定化することがよく知られている。したがって、 $AR_{34-424}$  及び  $AR-m23$ についての安定性アッセイは、加熱工程の間に受容体に結合したアンタゴニストを用いて繰り返した（図4）。予測されるように、インキュベーションの間に結合したアンタゴニストを含有する受容体の  $T_m$  は、アンタゴニストの不在下における受容体の  $T_m$  よりも高いものであった。 $AR_{34-424}$  については、結合したアンタゴニストを用いて6高く、 $AR-m23$  については、 $T_m$  が2増えて55となった；アンタゴニストが結合した際に  $AR-m23$  について観察された熱安定性のより小さな増大は、当該受容体は既に、 $AR_{34-424}$  よりも、アンタゴニストが結合した状態に類似するより安定な立体構造にあることを示唆する（下記参照）。アンタゴニストが結合した  $AR-m23$  の  $T_m$  は、2つの独立した研究所によってその構造が解析された（非特許文献12及び13）、ドデシルマルトシド（DDM）中の暗状態のロドプシンの  $T_m$  に非常に似ている（非特許文献12）。このことは、 $AR-m23$  が結晶化について十分に安定であることを示唆する。

## 【0333】

 $AR-m23$  の特性決定

6種の変異の効果を同定するために  $AR-m23$  及び  $AR_{34-424}$  について測定した3種の特徴的な活性は、アンタゴニスト結合の親和性、アゴニスト結合の相対的な効果、 $AR-m23$  のGタンパク質への結合能であった。アンタゴニストである [ $^3H$ ] -ジヒドロアルプレノロール（図8）を使用した膜への飽和結合実験は、 $AR-m23$  に対する結合の親和性 ( $K_D = 6.5 \pm 0.2 \text{ nM}$ ,  $n = 2$ ) が  $AR_{34-424}$  ( $K_D = 2.8 \pm 0.1 \text{ nM}$ ,  $n = 2$ ) よりも僅かに低いことを示し、アンタゴニスト結合立体構造では  $AR-m23$  の構造に大きなゆらぎが存在することを示唆している。このことは、 $AR-m23$  における変異のいずれも、リガンド結合に関与すると解されているアミノ酸に相当するものではないことと一致する。アンタゴニスト結合と対照的に、A

R - m 2 3 によるアゴニスト結合の効果は、AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>よりも3桁弱いものである(図5)。アゴニストであるイソプレナリンの有効性は、天然のアゴニストであるノルエピネフリンよりも、AR - m 2 3 及び AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>において一貫して低く、当該2つの受容体のアゴニスト結合立体構造は類似している可能性を示唆する。しかしながら、AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>と比較した際のAR - m 2 3 におけるアゴニストの効力における大きな低減は、AR - m 2 3 における6種の変異が、アンタゴニストが結合した立体構造に選択的に固定化されていることを示唆する。立体構造の予測からすると、このことは、回折に使用し得る品質の結晶の生産のために立体構造が均一なタンパク質集団を有することが重要であるため、熱安定性に予期せぬ利点を加える。

## 【0334】

10

AR - m 2 3 に用いた熱安定性アッセイの全ては、DDMに可溶化した受容体に対して実施した。熱安定化プロセスの目的は、DDMのみではなく各種の異なる界面活性剤中で安定である結晶学的に理想的な受容体を生産することであった。したがって、本発明者は、内在性膜タンパク質の結晶化において選択的に使用される小さな界面活性剤に集中して、各種の異なる界面活性剤中において AR - m 2 3 及び AR の安定性を試験した。

AR - m 2 3 又は AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>を発現する大腸菌から調製した膜を DDM 中で可溶化し、Ni - NTAアガロースに結合させ、次いで、DDM、デシルマルトシド(DM)、オクチルグルコシド(OG)、ラウリルジメチルアミンオキシド(LDAO)、又はノニルグルコシド(NG)のいずれかを用いて洗浄した。安定性アッセイを異なる界面活性剤の各々中の受容体に対して実施した(図6)。AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>は DDM 及び DM においてのみ安定であり、OG、NG、又は LDAO で洗浄した樹脂から溶出した活性受容体は存在しなかった。対照的に、機能的な AR - m 2 3 は全ての界面活性剤中に依然として存在し、Tmを測定し得た。予測されるように、より小さな界面活性剤が、DDM(Tm 52)又は DM(Tm 48)のいずれかよりも顕著に変性させ、25(NG)、23(LDAO)、及び 17(OG)のTmであった。受容体を DDM 又は DM のいずれに可溶化したかにかかわらず、AR - 2 3 及び AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>の間のTmの差は約 20 である；したがって、予測される Tm は約 5 であり、かくして、精製に使用した条件下で受容体が迅速に不活性化したため、活性 AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>は NG 中においてさえ認められることは驚くべきことではない。厳しさを増している界面活性剤中における安定性に関して選択するよりも利用するのがかなり単純であるため、AR - m 2 3 の生産に使用した所定の戦略は、熱安定性に基づいて意図的に選択した。しかしながら、AR<sub>3 4 - 4 2 4</sub>の熱安定性の増大は、内在性膜タンパク質の結晶化に理想的な小さな界面活性剤に対する耐性の増大をもたらす。

20

30

30

## 【0335】

## GPCR変異体の結晶化

シチメンチョウ - アドレナリン受容体の幾つかの異なる構築物を結晶化する以前の試みは失敗した。各種の条件で実験したにもかかわらず、天然の配列並びに幾つかの切断型及びループ欠失構築物の双方の使用によっては、長年に亘って、結晶が得られなかった。

## 【0336】

40

しかしながら、AR - m 2 3 に由来する安定化変異を前記構築物に転用すると、幾つかの異なる結晶が、異なる界面活性剤及び異なる条件において得られた。

## 【0337】

これまで最も研究された結晶は、バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞において発現させた精製 - 3 6 構築物(以下の変化：点変異 C 1 1 6 L 及び C 3 5 8 A を含有するシチメンチョウ受容体のアミノ酸残基 3 4 - 3 6 7 ; m 2 3 の 6 つの熱安定化点変異；配列 A S K R K を用いたアミノ酸残基 2 4 4 - 2 7 8 の置換；C 末端 H i s 6 タグ)を使用して、当該受容体を界面活性剤であるオクチルチオグルコシドに移した後に得られた。使用した沈殿剤は、PEG 600 又は PEG 1000 であり、得られた結晶は細長いブレート状であった。

50

## 【0338】

実験を実施して、安定化受容体を使用した結晶化条件を規定して、本来の非安定化構築物を使用して結晶が得ることが可能であったか否かを確認した。同様に又はおそらく非常に小さな結晶を得ることが可能であるかもしれないが、実際には、「野生型」（すなわち、変異誘発させる出発構造）は結晶を生じなかった。

## 【0339】

前記結晶は、空間群 C 2 及び良好に回折するプレート状であり、使用した凍結条件に依存してセル寸法が変化する。

## 【0340】

一般的には、G P C R が安定化されると、各種のよく知られた各種の構造決定技術に供してよい。最も一般的な膜タンパク質結晶化技術は、多くの場合には市販の機械装置を使用して設定した数千の結晶化条件をまず使用する（非特許文献 22）、蒸気拡散（非特許文献 20 及び 21）によるものである。しかしながら、蒸気拡散によって形成される結晶は小さく且つ不規則である場合があるため、次いで付加的な技術を使用してよい。1つの技術は、タンパク質表面の立体構造エピトープに特異的に結合する抗体と膜タンパク質との共結晶化（蒸気拡散による）を伴う（非特許文献 23 及び 24）；このことによって、タンパク質の親水性表面を増やし、且つ、強力な結晶接触を形成し得る。第二の代替的方法は、脂質立方相又は脂質中間相のいずれかと一般的に称される結晶化マトリックスを使用することであり（非特許文献 25 及び 26）、機械的なプラットホームにも開発されている（非特許文献 27）。このことは、小さな親水性表面のみを有するタンパク質、例えば、細菌ロドプシンの高品質な結晶の生産に関して成功を確実なものとする（非特許文献 28）。膜タンパク質構造は、電子線結晶学によって高分解能で測定されてもよい（非特許文献 29）。

10

20

30

40

## 【0341】

アラニンスキャニング変異誘発及び熱安定変異体の選択の併用による A R <sub>3 4 - 4 2</sub><sub>4</sub> から A R - m 2 3 への進化は、結晶学に理想的な G P C R をもたらした。A R - m 2 3 の T m は、アンタゴニストの存在下において A R <sub>3 4 - 4 2 4</sub> よりも 21 高く、A R - m 2 3 はロドプシンと同様の安定性を有している。A R - m 2 3 の T m の増大は、A R <sub>3 4 - 4 2 4</sub> を不活化する各種の小さな界面活性剤における安定性の増大をもたらす。加えて、使用した選択戦略は、受容体の立体構造の集団は野生型の A R <sub>3 4 - 4 2 4</sub> よりも均一であるため、結晶を得る可能性を改善する選択的にアンタゴニストが結合した立体構造にある受容体をもたらした。かくして、本発明者は、単独の選択法において立体構造を安定化する方法を完成した。

30

## 【0342】

本発明者が導入した特定の変異が受容体の熱安定化をもたらす原因は全く明らかではない。ロドプシンにおける対応する位置は、変異したアミノ酸残基は脂質二重層を向いているか、受容体の中心を向いているか、又は2つの環境の間の界面に存在する。複雑な可溶性タンパク質の熱安定化を理解する試みにおける困難性を考慮すると（非特許文献 15）、膜タンパク質はより容易に理解されるようではない；本発明者は、変異した際に熱安定性をもたらす A R におけるアミノ酸残基に特定のパターンは存在しないことを確認した。しかしながら、生産した約 5 % の変異体は天然の受容体より安定であったため、アラニンスキャニング変異誘発は、迅速に熱安定性変異体を同定する効率的な戦略であることが示される。

40

## 【0343】

A R - m 2 3 の生産に本発明者が使用した手法は、界面活性剤可溶化形態における活性を検出するための簡便なアッセイを有する任意の膜タンパク質に等しく適用可能である。本発明者は、最も簡便な主要なパラメータとして、温度の関数としての安定性を選択したが、該手法は、主に安定性、例えば、厳しい界面活性剤、極端な pH、又はカオトロピック塩の存在下における安定性についての試験に容易に拡張可能である。各種のヒト受容体、チャンネル、及びトランスポーターの立体構造安定化は、それらを結晶学により適し

50

たものとし、既に結晶化されている膜タンパク質についての分解能も改善するであろう。立体構造安定化が、膜タンパク質結晶化を、現在よりも迅速に成功する可能性が大きい、より扱いやすい問題とすることを可能にすることが望まれる。これによって、製薬業界におけるヒト膜タンパク質の日常的な結晶化を可能にし、薬剤開発への価値のある立体構造の洞察を可能にするはずである。

#### 【0344】

##### 方法

##### 材料

シチメンチョウ由来の切断型の 1アドレナリン受容体 (AR<sub>34-424</sub>) (非特許文献9)は、Dr Tony Warne (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK)によって快く提供された。<sup>10</sup> 34-424残基をコードする AR構築物は、C116L変異を含有して発現を改善し(非特許文献11)、精製のために10ヒスチジンのC末端タグを含有している。1-[4,6-プロピル-<sup>3</sup>H]-ジヒドロアルプレノロール([<sup>3</sup>H]-DHA)はAmersham Bioscienceによって提供され、(+)-L-ノルエピネフリン酒石酸水素塩、(-)イソプレナリン塩酸、(-)アルプレノロール酒石酸塩、及びs-プロプラノロール塩酸はSigmaからのものである。

#### 【0345】

##### ARの変異誘発

AR cDNAは、pRGIIIにライゲートし、MalE融合タンパク質としての大腸菌におけるARの機能的な発現を可能にした(非特許文献16)。変異体は、QuickChange II方法(Stratagene)を用いて、発現プラスミドを鑄型として使用してPCRによって産生した。PCR反応物は、XL10-Gold ultracompetent cell(Stratagene)に形質転換し、個々のクローンを完全に配列決定して、所望の変異のみが存在していることを調べた。異なる変異は、以下の変異: Mut 4、G67A、G068A、V230A、D322A、及びF327A; Mut 6、R068S、Y227A、A234L、A282L、及びA334L; Mut 7、M90V、I129V、Y227A、A282L、及びF338M; Mut 10、R68S、M90V、V230A、F327A、及びA334Lを導入する全てのペアのプライマーを含めることによって、PCRによって無作為に組み合わせた。PCR混合物を形質転換して、クローンは配列決定して変異が確かに導入されていることを測定した。<sup>20</sup>

#### 【0346】

##### タンパク質発現及び膜調製物

AR及び変異体の発現は、XL10細胞(Stratagene)において実施した。50mlのアンピシリン含有(100μg/ml)2×TY培地の培養物を、OD<sub>600</sub>=3まで浸透しながら37℃で増殖させ、次いで、0.4mM IPTGを用いて誘導した。誘導した培養物は、4時間に亘って25℃でインキュベートし、次いで、細胞を13,000×gで1分に亘って遠心分離することによって回収し(2mlの一定分量)、-20℃で保存した。アッセイに関しては、細胞を凍結融解(5サイクル)によって破碎し、500μlの緩衝液[20mM Tris pH 8、0.4M NaCl、1mM EDTA、及びプロテアーゼインヒビター(Complete(商標)、Roche)]に再懸濁した。100μg/mlリソザイム及びDNアーゼI(Sigma)を用いて4で1時間に亘ってインキュベートした後に、氷上で30分に亘ってサンプルを2%DDMに可溶化した。不溶性物質を遠心分離(15,000×g、2分、4℃)によって除去し、上清を放射リガンド結合アッセイに直接使用した。<sup>30</sup>

#### 【0347】

大規模膜調製のために、AR及びMut23各々の2L及び6Lの大腸菌培養物を上述のように増殖させた。20分間に亘る5,000×gの遠心分離によって細胞を回収し<sup>40</sup>

10

20

30

40

50

、液体窒素で凍結させ、-80°で保存した。1×プロテアーゼインヒビタークテル(Complete(商標)EDTA-free、Roche)を含有する10mlの20mM Tris pH 7.5にペレットを再懸濁した。1mgのDNアーゼI(Sigma)を添加して、終容量を100mlとした。細胞をFrench press(2passages、20,000psi)によって破碎し、12,000×gで45分間に亘って4°で遠心分離して細胞残屑を除去した。上清(膜)を200,000×gで30分間に亘って4°で遠心分離した;膜ペレットは15mlの20mM Tris pH 7.5に再懸濁して、液体窒素で迅速に凍結した後に1mlの一定分量で-80°において保存した。タンパク質濃度はアミノブラック法によって測定した(非特許文献17)。これらのサンプルは、融解後に放射リガンド結合アッセイにおいて使用し、上述の2%DDMに可溶化した。

10

## 【0348】

競争アッセイに関しては、異なる界面活性剤を試験することと共に、DDM可溶化ARをNi-NTAアガロース(Qiagen)で部分的に精製した。200μlのNi-NTAアガロースを、20mM Tris pH 8、0.4M NaCl、20mMイミダゾールpH 8中の2mlの可溶化サンプル(10mg/mlの膜タンパク質)に添加し、1時間に亘って4°でインキュベートした。インキュベート後に、サンプルを13,000×gで30秒間に亘って遠心分離し、界面活性剤(0.1%DDM、0.1%DM、0.1%LDAO、0.3%NG、又は0.7%OGのいずれか)を含有する250μlの緩衝液(20mM Tris pH 8、0.4M NaCl、20mMイミダゾール)で二回洗浄した。

20

## 【0349】

受容体は、2×100μlの緩衝液(0.4M NaCl、1mM EDTA、250mMイミダゾールpH 8、及び関連の界面活性剤)に溶出した。半精製したAR<sub>34-424</sub>及びAR-m23に対する[<sup>3</sup>H]-DHA結合についてのK<sub>D</sub>は、各々3.7nM及び12.5nMであり、競争アッセイにおいて使用した[<sup>3</sup>H]の終濃度は3倍のK<sub>D</sub>でありAR<sub>34-424</sub>については12nMでありAR-m23については40nMであった。

30

## 【0350】

放射リガンド結合及び熱安定性アッセイ 単独の点の結合アッセイは、120μlの終濃度において、20mM Tris pH 8、0.4M NaCl、1mM EDTA、0.1%DDM(又は対応する界面活性剤)を50nM [<sup>3</sup>H]-DHA及び20から100μgの膜タンパク質と共に含有した;平衡化は1時間、4°であった。30分間に亘って特定の温度で[<sup>3</sup>H]-DHAを使用して又は使用せずに、結合アッセイ混合物をインキュベートすることによって、熱安定性を評価した;反応は氷上で実施し、必要であれば[<sup>3</sup>H]-DHAを添加して、さらに1時間平衡化した。受容体結合放射リガンド及び遊離の放射リガンドは、以前に開示されているようにゲルfiltrationによって分離した(非特許文献18)。非特異的結合は、1μMのs-プロプラノロールの存在下で測定した。飽和曲線は、0.4nMから100nMの広範な[<sup>3</sup>H]-DHA濃度を使用して得られた。競争アッセイは、AR<sub>34-424</sub>については12nMの濃度の[<sup>3</sup>H]-DHAを使用して実施し、AR-m23については40nMの濃度の[<sup>3</sup>H]-DHAを使用して実施し(すなわち、3倍のK<sub>D</sub>)、各種の濃度の未標識のリガンド(0から100mM)を用いて実施した。放射活性はBeckman LS 6000液体シンチレーションカウンターで計測し、Prismソフトウェア(GraphPad)を使用して非線形回帰によってデータを分析した。

40

## 【0351】

ロドブシン構造におけるAR-m23熱安定変異の位置

登録コードが1GZM[14]であるロドブシン構造のpdbファイルは、Protein Data Bankウェブサイト([www.pdb.org](http://www.pdb.org))からダウンロードし、PyMOL X11 Hybrid(DeLano Scientific)プログラムに表示した。A

50

Rにおける熱安定変異についての、ロドプシンの対応するアミノ酸残基は、本発明者によく知っている4つのG P C R、すなわち、ロドプシン、 $\alpha$ アドレナリン受容体、ニューロテンシン受容体、及びアデノシンA<sub>2a</sub>受容体の間のアラインメントに基づいてロドプシン構造に配置した(非特許文献19)。

【0352】

(実施例2)

増大した熱安定性を有するアデノシンA<sub>2a</sub>受容体(A<sub>2a</sub>R)の変異体

1. 315の部位特異的変異体を、A<sub>2a</sub>Rの2から316残基の間に作製した。

2. これらの変異体の全てを、加熱工程後のアゴニスト及びアンタゴニスト結合測定アッセイを使用して熱安定性についてアッセイした(図12に記載のリガンド(-)フォーマット)。

a. <sup>3</sup>H-N E C A(アゴニスト)と共に測定した際に、26の変異体が改善された熱安定性を示した: G114A, G118A, L167A, A184L, R199A, A203L, L208A, Q210A, S213A, E219A, R220A, S223A, T224A, Q226A, K227A, H230A, L241A, P260A, S263A, L267A, L272A, T279A, N284A, Q311A, P313A, K315A。

b. <sup>3</sup>H-Z M 2 4 1 3 8 5(アンタゴニスト)と共にアッセイした際に、18の変異体が改善された熱安定性を示した: A54L, V57A, H75A, T88A, G114A, G118A, T119A, K122A, G123A, P149A, E151A, G152A, A203L, A204L, A231L, L235A, V239A。

3. 変異を組み合わせて、推定上のアンタゴニストの立体構造において変異体を產生した。野生型A<sub>2a</sub>RはZ M 2 4 1 3 8 5が結合した状態で31のTmを有する。

a. Rant17 A54L+K122A+L235A Tm 48 °C (ZM241385 bound)

b. Rant19 A54L, T88A, V239A+A204L Tm 47 °C (ZM241385 bound)

c. Rant21 A54L, T88A, V239A+K122A Tm 49 °C (ZM241385 bound)

4. アゴニストスクリーニングによる変異を組み合わせたが、+2のTmという非常に低レベルの改善のみをもたらした。

【0353】

10

20

【表3】

表(i). A2aR安定化変異の一覧。変異体を大腸菌において発現させ、2%DDM+1%グリセロールにおいて可溶化し、アゴニストである [<sup>3</sup>H]-NECA(右)及びアンタゴニストである [<sup>3</sup>H]-ZM241385(左)を使用してリガンド結合について試験した。放射リガンドの濃度は、野生型の受容体について測定したそれらのK<sub>D</sub>の6から10倍であった。活性受容体の発現を4°Cでリガンド結合によって評価した。安定性は、可溶化した受容体をそのapo状態で30°Cにおいて30分間に亘って加熱し、次いで、残存する結合活性を測定することによってアッセイした。これらの条件下において、野生型の活性は50%まで衰える(S.D.=15%)。発現及び安定性について得られたデータは、野生型の値に対して標準化した。変異誘発の後の回において含めた変異は、野生型と比較して、発現が30から40%以上であり、かつ、安定性が130から140%以上であった。太線は変異のクラスターを示す。

10

アゴニスト			アンタゴニスト		
変異	発現 (%)	安定性 (%)	変異	発現 (%)	安定性 (%)
wt	100	100	wt	100	100
S090A	151	151	A054L	90	140
G114A	62	143	V057A	44	144
G118A	71	151	H075A	82	152
L167A	41	174	T088A	67	230
A184L	140	150	G114A	73	153
R199A	73	202	G118A	84	148
A203L	42	172	T119A	90	148
L208A	276	215	K122A	52	153
Q210A	46	155	G123A	90	158
S213A	40	140	P149A	54	215
E219A	96	221	E151A	63	173
R220A	84	250	G152A	70	156
S223A	57	146	A203L	111	132
T224A	142	276	A204L	40	181
Q226A	119	217	A231L	90	148
K227A	87	222	L235A	85	140
H230A	57	154	V239A	91	134
L241A	139	156			
P260A	70	169			
S263A	60	158			
L267A	40	187			
L272A	34	157			
T279A	125	158			
N284A	64	151			
Q311A	49	164			
P313A	44	148			
K315A	64	186			

20

30

40

【0354】

## 【表4】

表(iii). 最も良好な組み合わせの安定性。受容体は1%D D M (グリセロールを含まない)に可溶化した。リガンドの存在下(リガンド占拠状態)又は非存在下(apo状態)において各種の異なる温度において可溶化した受容体を加熱することによって、融解プロフィールを得た。以下に示すデータは、少なくとも3回の独立した実験の代表例である。S.D.は1°C未満である。

	Tm (°C)		Tm (°C)		10
	-	+	-	+	
	アゴニスト	アゴニスト	アンタゴニスト	アンタゴニスト	
Wt	21	29	wt	31	32
Rag 1 (A184L/R199A/L272A)	26	34	Rant 5 (A54L/T88A/V239A)	42	46
Rag 23 (Rag 1+F79A/L208A)	22	38	Rant 21 (Rant 5+K122A)	41	49

## 【0355】

## 【表5】

表(iii). 界面活性剤で可溶化した野生型のA2aR及び熱安定性変異体Rant 21の競争アッセイについての結果のまとめ。値は2回の独立した実験の代表例である。各データの点は三回重複してアッセイしたものであり、平均±SDとしてプロットした。各可溶化受容体は、1時間に亘って氷上で400 mM NaClを含有する結合緩衝液(50 mM Tris中ににおいてリガンドと共にインキュベートした。未標識リガンドの非存在下における[3H]ZM241385(10 nM)の結合を100%と設定した。以下に示すデータは、三回重複して測定した各データ点を用いて二回の独立した実験によるものである。サンプルのリガンドとのインキュベートは、1時間に亘って氷上で10 nMの濃度で[3H]ZM241385を用いて実施した。Ki値は、Prismソフトウェアの非線形回帰式を使用して Cheng and Prusoff式にしたがって計算し、野生型については12 nM及びRant 21については15 nMという[3H]ZM241385についてのKDを適用した。Rant 21は正確なKi測定について十分にNECAに結合しなかった(したがって、>1×10<sup>-1</sup>と示される)。アゴニスト結合についてのRant 21の親和性は、R-PIAについて232倍弱められ、NECAについて少なくとも1900倍まで弱められた。

20

30

競争相手	Ki (M)	
	wt	Rant 21
XAC	2.3 × 10 <sup>-6</sup>	2.3 × 10 <sup>-6</sup>
テオフィリン	1.5 × 10 <sup>-3</sup>	0.9 × 10 <sup>-3</sup>
NECA	7.0 × 10 <sup>-6</sup>	>1 × 10 <sup>-1</sup>
R-PIA	1.6 × 10 <sup>-5</sup>	3.6 × 10 <sup>-3</sup>

## 【0356】

## 【表6】

表(iv). 界面活性剤に可溶化した野生型A2aR及び熱安定性変異体の飽和アッセイについての結果のまとめ。値は3回の独立した実験の代表例である。各データ点は三回重複してアッセイしたものであり、平均±SDとしてプロットした。Prismソフトウェアの非線形回帰式を使用して、データをミカエリスーメンテン式に適合させた。

40

受容体	KD (nM)	
	[ <sup>3</sup> H]NECA (アゴニスト)	[ <sup>3</sup> H]ZM241385 (アンタゴニスト)
wt	32 ± 1	12 ± 3
Rag 1	26 ± 0.4	26 ± 0.5
Rag 23	21 ± 1	62 ± 1
Rant 21	>450	15 ± 3

## 【0357】

50

## 【表7】

表(v). 異なる界面活性剤における野生型受容体及び受容体変異体の安定性のまとめ。受容体の可溶化及び界面活性剤交換は、IMAC工程の間に実施した。S.D.は1°C未満であった。受容体は非常に不安定であったため(†)、幾つかの受容体-界面活性剤の組み合せについてはTmを測定することが不可能であった。

	Tm (°C)			
	アゴニスト 結合		アンタゴニスト 結合	
	wt	Rag 23	wt	Rant 21
0.01% DDM	27	84	25	39
0.1% DM	28	29	10	28
0.3% NM	22	28	< 4	25
0.3% NG	†	†	†	22
0.6% OG	<9	16	†	23
0.003% LDAO	28	38	32	42
0.006% FC12	37	39	43	49

10

20

30

40

50

## 【0358】

## (実施例3)

増大した熱安定性を有するニューロテンシン受容体(NTR)の変異体

1. 340部位特異的変異体を、NTRの61から400残基の間に作製した。

2. まず、これらの変異体の全てを、加熱工程後に<sup>3</sup>H-ニューロテンシン(アゴニスト)結合を測定するアッセイを使用して熱安定性についてアッセイした。24の変異体は、熱安定性における小さいが顕著な増大をもたらした:A356L, H103A, D345A, A86L, A385L, Y349A, C386A, K397A, H393A, I116A, F358A, S108A, M181A, R392A, D113A, G209A, L205A, L72A, A120L, P399A, Y351A, V268A, T207A, A155L, S362A, F189A, N262A, L109A, W391A, T179A, S182A, M293A, L256A, F147A, D139A, S100A, K176A, L111A, A90L, N270A。

3. アゴニストの非存在下における加熱によって熱安定性について試験した変異体を、変異体を<sup>3</sup>H-ニューロテンシンの存在下で加熱する僅かに異なるアッセイを使用して再試験した(図12におけるリガンド(+)フォーマット)。改善された熱安定性を有する変異体は:A69L, A73L, A86L, A90L, H103A, V165A, E166A, G215A, V229A, M250A, I253A, A177L, R183A, I260A, T279A, T294A, G306A, L308A, V309A, L310A, V313A, F342A, F358A, V360A, S362A, N370A, S373A, F380A, A385L, P389A, G390A, R395A。

4. 野生型の受容体と比較して顕著に向上了した発現レベルを有する変異体も存在し、結晶化のための受容体生産レベルを促進するために使用し得る:A86L, H103A, F358A, S362A, N370A, A385L, G390A。これら全てが熱安定性を増大させた。

5. 好ましい組み合わせは、

- a. Nag7m F358A+A86L+I260A+F342A Tm 51 °C (ニューロテンシン結合)
- b. Nag7n F358A+H103A+I260A+F342A Tm 51 °C (ニューロテンシン結合)

野生型のNTRは、ニューロテンシンが結合した状態で35のTmを有する。

## 【0359】

## (実施例4)

安定化GPCR変異が存在する構造モチーフの同定

50

2 アドレナリン受容体の構造を決定した（非特許文献 20 及び 21）。それはシチメンチョウ 1 受容体と 59% 同一であったが、はっきりと異なる薬理学的プロフィールを有していた（非特許文献 22 及び 23）。シチメンチョウ 1 受容体の安定化変異が存在する構造モチーフを決定するために、本発明者は、ヒト 2 構造に変異をマッピングした（非特許文献 21）。

【0360】

MacVector パッケージにおいて ClustalW を使用して、アドレナリン受容体を最初に整列（アライン）した；シチメンチョウ 1 における熱安定化変異を、ヒト 2 配列における対応する残基と同様にハイライトした。ヒト 2 モデル（pdbs 登録コード 2RH1）は Pymol で可視化し、所望のアミノ酸を、当該技術分野において既知の標準的な手法によって空間充填モデルとして示した。安定化変異が存在する構造モチーフは、目視検査によって決定した。10

【0361】

表（vi）は、AR-m23 の熱安定化変異に対応する 2 受容体における対応する位置及びそれらが存在する構造モチーフの一覧である。

【0362】

表（vi）から認められるように、変異体は、多数の異なる位置に存在している。3つの変異は、水性溶媒に接近可能であることが予測されるループ領域に存在する（ループ）。8の変異は、膜貫通 - ヘリックスに存在し、脂質二重層を示す（脂質）；これらの変異の3つはヘリックスの末端付近に存在し、親水性境界層に存在していると解されてよい（脂質境界）。8の変異は膜貫通 - ヘリックスの間の界面に存在することが認められ（ヘリックス - ヘリックス界面）、そのうち3つはヘリックスの折れ曲がった又はゆがんだ領域内のいずれかに存在し（折れ曲がり（キンク））、他の2つの変異は一つのヘリックスで生じているが、変異した残基に対して空間を開けて近接する折れ曲がり（キンク）を含有する1つ又は複数の他のヘリックスと近接している（反対側の折れ曲がり（キンク））。これらの後者の変異は、折れ曲がり（キンク）領域内のアミノ酸のパッケージングに影響を与え、熱安定化をもたらし得る。他の変異は、基質結合ポケットに存在する（ポケット）。20

【0363】

【表8】

	シチメン チョウ $\beta$ 1	ヒト $\beta$ 2	記載	
ヘリックス 1	I55A	I47	S-ヘリックスキング界面	図 18
ヘリックス 1	G67A	A59	脂質境界	
ヘリックス 1	R68S	K60	脂質境界	図 25
ヘリックス 2	V89L	V81	キング	図 19
ヘリックス 2	M90V	M82	キング	図 20
ヘリックス 2	G98A	G90	ポケット	
ヘリックス 3	I129V S151E	I121 S143	反対側のキング ループ	図 21
ヘリックス 4	V160A Q194A	V152 A186	脂質 ループ	
ヘリックス 5	L221V	V213	脂質	
ヘリックス 5	Y227A	Y219	ヘリックス・ヘリックス界面	図 23
ヘリックス 5	R229Q	R221	脂質	
ヘリックス 5	V230A	V222	ヘリックス・ヘリックス界面	
ヘリックス 5	A234L	A226	ヘリックス・ヘリックス界面	
ヘリックス 6	A282L D322A	C265 K305	ループ 脂質境界	図 24
ヘリックス 7	F327A	L310	脂質	
ヘリックス 7	A334L	V317	脂質	
ヘリックス 7	F338M	F321	キング	図 22

10

20

30

表(vi) シチメンチョウ  $\beta$ 1受容体において認められる熱安定化変異に対応するアミノ酸残基のヒト  $\beta$ 2構造における位置並びにそれらが存在する構造モチーフ

## 【0364】

その様な構造モチーフは、それらが安定化変異を含有するために、タンパク質安定性の測定において重要である。したがって、これらのモチーフを変異の標的とすることは、安定化したG P C R 変異体の產生を容易にする。事実、2以上の変異を同一の構造モチーフにマッピングした幾つかの例が存在する。例えば、Y227A、V230A、及びA234Lといったシチメンチョウ 1アドレナリン受容体における変異は全て、同一のヘリックス界面にマッピングされ、V89L及びM90Vといった変異は同一のヘリックスの折れ曲がり(キング)にマッピングされ、F327A及びA334Lといった変異は脂質二重層を示す同一のヘリックス表面にマッピングされた(表(vi))。かくして、1つの安定化変異が同定された際ににおける、変異が存在する構造モチーフの決定は、更なる安定化変異の同定を可能にするであろう。

40

## 【0365】

(実施例5)

G P C R の立体構造特異的結合パートナーの作製

親G P C Rと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有するG P C R 変異体の作製は、結合パートナーのスクリーニングのために多くの利点を提供する。例えば、本発明の方法はスクリーニングに必要とされる物質の量を低減する。標準的なスクリーニングでは、G P C Rは全細胞中又は全細胞からの膜中に存在し、これらは通常、化合物のライブラ

50

リーではなく隔離室における個々の化合物とのインキュベーションによってスクリーニングされる。かくして本発明は、化合物のスクリーニングを実施するために必要とされる時間に関する利点を提供する。G P C R を特定の立体構造に固定できることは、必要な薬理学的特性を有するリガンドを同定する可能性を高めるという利点を提供する。標準的な結合スクリーニングでは、G P C R は多くの異なる立体構造をとることが可能であり、結合化合物は各種の薬理学的タイプに亘って同定されるであろう。アッセイ形式を小型化できるため試薬の費用を低減でき、これは本発明の方法によって促進される。

## 【 0 3 6 6 】

## 方法

10

## 化合物のスクリーニング

特定の立体構造で増大した安定性を有する G P C R 変異体を固体表面に固定化し、コードされる化合物のライブラリーを含む緩衝液と共にインキュベートする。G P C R 変異体と G P C R 変異体に選択的に結合するライブラリーからの化合物との間の結合を可能にする適切な時間後、緩衝液を除去する。次に、G P C R 変異体に特異的に結合しなかった化合物を除去するために数回の洗浄工程を実施する。読み取りコード、タグ又は空間的位置 (D N A 又は R N A など) を使用して、依然として G P C R 変異体に結合している又は G P C R から溶出した後の、結合低分子を同定する。その後立体構造特異的結合パートナーを単離する。

## 【 0 3 6 7 】

20

## 固定化 G P C R を使用した抗体の選択

固定化した安定化 G P C R を使用して、安定化 G P C R 、天然受容体又は受容体からのペプチドで免疫した動物からの血漿中に存在するような抗体の混合物から受容体に対する抗体を選択することが可能である。抗体は、免疫動物から採取した B 細胞から得られる上清中から、又は免疫動物からの B 細胞の不死化後に得られるハイブリドーマから、又はファージ粒子上で若しくはリボソームディスプレイなどのインビトロ発現系を介して発現されてよい組換え抗体ライブラリーから同定できるであろう。前記方法は、受容体の特定立体構造に対する抗体を選択するという利点を有する。受容体のアンタゴニスト又は基底状態に固定された安定化 G P C R は、アンタゴニスト抗体を選択する確率を高め、一方、活性又は R \* 状態に固定された安定化 G P C R は、活性化抗体を選択する確率を高めるであろう。標準的なスクリーニングでは、抗体は、多くの場合、受容体のペプチドエピトープに結合するが、アンタゴニスト又はアゴニスト特性を有さず、したがって治療薬としては有用でない G P C R に対するものが選択される。

30

## 【 0 3 6 8 】

## ( 実施例 6 )

## - アドレナリン受容体に対する抗体ファージ選択

## 要約

本発明者らは、ファージディスプレイを使用して抗体を作製するために安定化 - アドレナリン受容体 ( - A R ) を使用した。陽性ファージクローニングは - A R に対する特異性を示し、選択した抗体遺伝子のサブクローニングは、抗 - - A R 特異的 s c F v 抗体の生産の成功をもたらした。

40

## 【 0 3 6 9 】

## 緒言

受容体 - リガンド系の領域における抗体の治療適用は大きな潜在的可能性を有する。しかしながら、G タンパク質共役受容体 ( G P C R ) に対する抗体を作製する ( インビトロ又はインビトロ法のいずれかによって ) 際の主要な問題は、不均一な製剤における多数の立体構造の精製抗原を認識する抗体結合物質のプールを作製することよりもむしろ、均一な抗原製剤における特定の立体構造、すなわちアゴニスト立体構造又はアンタゴニスト立体構造の免疫原性認識に關係する。加えて、組換え受容体抗原は通常、細胞外ドメイン形態でのみ入手可能であり、このことは、受容体の他の部分に関与する任意の三次構造を排除

50

する。この問題に対して提案される解決法は、標的抗原としての安定化 G P C R の適用である。

#### 【 0 3 7 0 】

本発明者らは、アンタゴニスト立体構造において安定化された アドレナリン受容体に結合する抗体が単離され得る、ファージディスプレイのインビトロ法によって組換え抗体を作製する際の安定化 G P C R ( S t a R s ( 商標 ) ) の有用性を明らかにした。そのような抗体は機能的アッセイ、例えばリガンド結合アッセイに供してよい。

#### 【 0 3 7 1 】

##### 工程の概要

典型的なファージディスプレイ戦略は、阻害性 s c F v クローンを同定するための工程においていくつかの段階を含む（図 29）。最初の部分は、各種の方法（例えば、パニング選択、可溶性選択等）を使用してファージ抗体結合物質の集団を単離するための抗原に対するファージライブラリーの選択である。生じるこのファージ抗体結合物質の集団は、選択アウトプットと称される。特異的抗原結合物質を富化するためにこの工程を 2 から 4 回反復する。

#### 【 0 3 7 2 】

選択アウトプットであるクローンのプール（ポリクローナルファージ E L I S A ）を、ファージ E L I S A によって抗原の認識に関して評価する。個々のクローンをモノクローナルファージ E L I S A によって、及び配列分析によって多様性を評価してもよいが、好みしい方法は、選択した集団を組換え抗体発現ベクター（ p S A N G 1 0 - 3 F ）にサブクローニングし、モノクローナル s c F v E L I S A 及び D N A 塩基配列決定法による評価を実施することである。これは、その後 s c F v 断片として低い発現を示すファージ抗体結合物質を同定するという問題を回避する。多様な E L I S A 陽性クローンを生じる選択アウトプットは、ファージ抗体のより大きなパネルの機能的スクリーニングのために優先順位を決定されてよい。

#### 【 0 3 7 3 】

s c F v インヒビターの集団を同定するため、選択アウトプットを、機能的ハイスループットアッセイを使用したペリプラズム抽出物のスクリーニングキャンペーンに供する。最後に、スクリーニングキャンペーンからのヒットを、更なる機能的アッセイ並びにそれらの阻害作用の効率を評価する I C 5 0 分析により s c F v としてプロファイリングする。

#### 【 0 3 7 4 】

##### 方法及び結果

安定化 - A R を抗原として使用し、且つ S c h o f i e l d e t a l . , 2 0 0 7 ( 2 4 ) に記載されている「 M c C a f f e r t y 」抗体ファージディスプレイライブラリーを使用して、2 から 3 回の抗体選択を実施した。選択は、結合及び洗浄工程において 2 0 n M のリガンド（ - ） - アルブレノロールの存在下（ A ）又は不在下（ B ）に P B S 中で実施した。さらに、 - A R タンパク質の取り扱いに関しては、全ての被覆、洗浄及びブロッキング緩衝液に 0 . 1 % の界面活性剤デシルマルトシド（ A n a t r a c e , A n a g r a d e ）を添加した。選択抗体の相対的な成功を、ポリクローナルファージ E L I S A 及びモノクローナルファージ E L I S A を使用して測定した。

#### 【 0 3 7 5 】

##### 抗原を固定化するための最適化

固定化戦略は H i s タグ抗原を利用することに基づいた。第一の場合には、 A R - m 2 3 ではなく対照タンパク質を使用して固定化を行った。 N i - N T A プレートを含む各種の表面を最初の評価において使用した。すべてを N u n c プレートへの標準的な受動吸収に対して比較した。すべての場合に、2 回の選択後にポリクローナルファージ E L I S A を使用して結果を評価した。

#### 【 0 3 7 6 】

##### 抗体選択

10

20

30

40

50

ライプラリーの選択、溶出及び回収は、Schofield et al (2007)に記載されているとおりとした。150 μl の 20 μg / ml 濃度の - AR をニッケルキレートプレート (Nunc) の 2 つの (24) ウエルにおいて + 4 で一晩被覆した。受容体を被覆緩衝液に希釈し、被覆緩衝液は、20 mM Tris pH 8、100 mM NaCl、0.1% デシルマルトシド (dec-M) であり、選択 A については 20 nM リガンドも含むものとした。

翌日、ウエルを PBS で洗浄し、0.1% dec-M を添加した PBS (PBS-M) 中の 3% Marvel 乳タンパク質により室温で 1 時間ブロックした。被覆後、ウエルを PBS で洗浄し、2% Marvel / PBS 中であらかじめブロックした 100 μl のファージライプラリーを添加して、室温で 1 時間インキュベートした。結合後、試料を、0.1% dec-M を添加した PBS / 0.1% Tween 中で 6 回及び 0.1% dec-M を添加した PBS 中で 6 回洗浄した。結合ファージをトリプシンで溶出した (24)。  
10

#### 【0377】

溶出したファージを対数増殖期の TG1 細胞 ( $OD_{600} = 0.5$ ) に添加し、37 で 1 時間増殖させた。感染した細胞を、100 μg / ml アンピシリン、2% グルコースを添加した TY プレートに塗布し、30 で一晩増殖させた。翌日、プレートを保存のために 100 μg / ml アンピシリン、15% グリセロールを添加した TY 培地に収集した。この 1 回目の選択からの集団をヘルパー ファージで回収し、PEG で沈殿させて、これらの 100 μl を、1 回目で述べたのと同じ条件及び手順を使用して 2 回目の選択において使用した。  
20

#### 【0378】

##### ポリクローナルファージ E L I S A

E L I S A のために、AR をアミノプレート (Nunc カタログ番号 : 436008) に共有結合的に固定化した。被覆及び洗浄緩衝液には 20 nM リガンド及び 0.1% dec-M を添加した。E L I S A プレートを 24 μg / ml の - AR 及び 5 μg / ml の 2 つの対照タンパク質 (CD86 及び Notch1) で一晩被覆した。翌日、ウエルを PBS-M で洗浄し、ブロックした。2 回の選択からのポリクローナルファージ 50 μl / ウエルを添加し (PBS-M 中に最初の培養容積に対して 0.1 × の濃度で)、- M 13 抗体 (GE Health care、製品番号 : 27-9421-01) と共に室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ユウロピウム標識抗マウス抗体 (Perkin Elmer、製品番号 : AD 0207) と共に室温で 1 時間インキュベートした。ウエルを洗浄し、50 μl / ウエルの増強溶液 (Perkin Elmer、製品番号 : 4001-0010) を添加して、10 分間インキュベートした。結果を図 30A に示しており、2 回の選択後の実験 A 及び B における - AR 結合ファージの特異的富化を示唆する。シグナルはファージ選択 A (緩衝液中にリガンドが存在する) からの方が高かった。  
30

#### 【0379】

##### モノクローナルファージ E L I S A

このアッセイのために、選択 A からの 2 回目のファージの個々のクローンを採取し、回収して、PEG で沈殿させた。やはり、被覆、洗浄、ブロッキング及び抗体検出緩衝液に 20 nM リガンドと 0.1% 界面活性剤を添加した。Nunc アミノプレートのウエルは、- AR により室温で 1 時間半に亘って被覆した。被覆したウエルを PBS-T で 3 回、PBS で 3 回洗浄し、PBS-M でブロックして、50 μl / ウエルの 0.1 × ファージを添加し、室温で 1 時間インキュベートした。ウエルを PBS で 6 回洗浄し、- M 13 抗体と共に室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 6 回洗浄した後、ウエルを抗マウス Eu 抗体と共に室温で 1 時間インキュベートした。次に、ウエルを洗浄し、増強溶液と共に 10 分間インキュベートした。69 のスクリーニングしたクローンのうちで、20 のクローンが陽性と検出された (図 30B)。  
40

#### 【0380】

##### 特異性ファージ E L I S A

10

20

30

40

50

モノクローナル E L I S A からの陽性ファージクローンのうちの 17 を - A R 及び 3 つの無関係なタンパク質に対する結合特異性に関して試験した。これは、 N1 - E G F ( R & D Systems からの、ヒト F c ドメインに融合したマウス Notch 1 の E G F ドメイン 1 ~ 12 、カタログ番号 1057 - T K ) を含む。その他の対照タンパク質は、 Chapple et al 2006 ( 25 ) に記載されている一過性発現系において C D 4 融合体として発現される、マウス C D 8 6 の細胞外ドメイン及びマウス Notch 1 の負の調節領域 ( それぞれ C D 8 6 及び N1 ( NRR ) ) を含む。この E L I S A では、ニッケルキレートとアミノプレートの両方を比較のために使用した。やはり、 - A R タンパク質を含むウエルに関しては、被覆、洗浄、ブロッキング及び抗体検出緩衝液に 20 nM リガンドと 0.1 % 界面活性剤を添加した。前の章でモノクローナル E L I S A に関して述べたようにウエルを洗浄し、抗体と共にインキュベートした。アッセイは、 H i s 及びアミノプレートの両方が使用可能であること、及び抗 - A R クローンの大部分が無関係なタンパク質とは交差反応しないことを示した ( 図 31 ) 。

10

20

30

40

50

### 【 0381 】

#### モノクローナル s c F v の発現とスクリーニング

サブクローニング、抗体一本鎖 F v ( s c F v ) の発現及び精製は、 Schoolfield et al ( 2007 ) に記載されているとおりとした。2回目のファージ集団の中の選択した抗体遺伝子 ( 選択 A ) を pSANG10 - 3F ベクター ( 26 ) にサブクローニングし、 BL21 ( DE3 ) 細胞に形質転換した。96 のコロニーを採取し、当該技術分野における標準的な方法を使用して 96 穴フォーマットで s c F v 抗体のペリプラズム発現を誘導した。 s c F v をペリプラズムから回収し、アミノプレート ( Nunclon ) での E L I S A のために使用した。洗浄し、ブロックしたウエルを 50 μl / ウエルの s c F v と共に 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ユウロピウム標識抗 F L A G 抗体と共に室温で 1 時間インキュベートした。12 のクローンが 1000 単位を超えるシグナルを生じ、陰性クローンについては 50 未満のバックグラウンドレベルであった ( 図 32 ) 。

### 【 0382 】

陽性クローンを結合によって選択し、二次 E L I S A において特異的に確認して、対象とするクローンを配列決定する。単離されたユニーク結合クローンの数を同定するために抗体配列を分析する。

### 【 0383 】

単離抗体によるリガンドの結合のブロッキングを試験するため、ペリプラズム抽出及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを使用したより大規模な製造 ( 50 ~ 500 ml ) のためにユニーク陽性抗体クローンを選択する。この物質を、強固なレポーターアッセイを使用して受容体へのリガンド結合を妨げる能力 ( 例えば、 cAMP 産生の阻害又はトランسفェクト細胞へのリガンド結合の阻害 ) に関して評価する。

### 【 0384 】

#### ( 実施例 7 )

##### 1 - A R と化合物の相互作用の評価

###### 方法及び結果

ストレプトアビシン被覆 CM5 チップを備え、作業緩衝液 ( 20 mM tris-HCl 、 150 mM NaCl 、 1 mM EDTA 、 1 % DMSO 、 0.1 % デシルマルトシド、 pH 7.8 ) で平衡化させた Biacore S51 光学バイオセンサーを使用して 10 で結合試験を実施した。

### 【 0385 】

#### 1 A R の固定化

1 A R 36 - M23 を、 EZ 結合スルホ - N H S - L C - L C ビオチン ( Pierce 、 No. 21338 ) を使用して最小限にビオチニル化した：前記ビオチンを受容体製剤に添加し、 ( 100 μM アルブレノロールでスパイクして ) 、 4 で 3 時間反応させた後、遊離ビオチンをカラムクロマトグラフィーによって除去した。

## 【0386】

図33は、ストレプトアビジン被覆フローセルへのビオチニル化1A Rの2つの捕捉段階を示す。第一段階で~1200RUを捕捉し、第二段階では~4000RUを捕捉した。

## 【0387】

安定化受容体で被覆したBia coreセンサーチップを使用して、受容体において活性を有する薬剤の結合を特徴づけることが可能であった。化合物のフロースルーによりオンレートを測定することが可能であった。その後の洗浄により、オフレートの測定が可能となった。これらのパラメータは動的親和性値( $K_d$ )を測定するために使用してよいであろう。

10

## 【0388】

図34は、受容体表面への結合に関して3倍希釀系列において反復して試験したアルプレノールに対する応答を示す。最高濃度は666nMであり、各々の濃度を3回試験した。応答は濃度依存性であり、再現性がある。灰色の線は、簡単な1:1相互作用モデルのフィットを表示し、このフィットから決定したパラメータを挿入図に列挙する(括弧内の数字は最後の桁の誤差である)。

## 【0389】

図35は、図34に示すデータの代替的な表現である。応答は、各々の曲線について決定した(フィッティングから)Rmaxに対して標準化されている。

20

## 【0390】

アルプレノールデータは、ビオチニル化b1A Rが活性であり、このバイオセンサープローチが化合物/受容体相互作用を特徴づけるために使用可能であることを明らかにする。

## 【0391】

図36は、1A Rへのプロプラノロール結合に対する応答を示す。111nMが最高濃度であり、各々の濃度を2回又は3回試験した。プロプラノロールのデータを、図37において標準化された応答として表示する。

30

## 【0392】

1A R表面がほぼ3日齢である場合、本発明者らは、受容体が経時的にどの程度活性を喪失していたかを測定するためにアルプレノロール結合を再試験した。図38は、333nMを最高濃度としたアルプレノロール結合応答を示す。受容体は、最初に捕捉された場合とほぼ同程度に活性であると思われた。

## 【0393】

他のスポット上の1A R捕捉

S51バイオセンサーは2つの反応スポットを同時に観測する能力を有するので、本発明者らは、他のストレプトアビジン被覆スポット上で8000RUの密度に受容体を捕捉した(図39)。

30

## 【0394】

8000RUの1A Rスポットへのアルプレノロール結合の試行試験からのデータを図40に示す。

40

## 【0395】

受容体アゴニスト、サルメテロールを、1.67 $\mu$ Mの最高濃度を使用して試験し、各々の濃度を2回又は3回試験した(図41A及びB)。応答は濃度依存的であり、大部分は再現可能である。また、予測されたように、8000RU表面からの応答(図41B)は4200RU表面(図41A)より大きかった。

## 【0396】

サルメテロールは、アルプレノロール又はプロプラノロールよりもはるかに速く解離し、はるかに弱く受容体に結合した。サルメテロールは1-A Rに対して低い親和性を有し、特に本明細書で使用するアンタゴニスト安定化形態の受容体に対して低い親和性を有するので、これは当然予想される。加えて、本発明者らは、解離期( $t > 60$ 秒)の間の

50

応答へのモデルの低いフィット性によって示されるように、相互作用における幾分かの複雑さを検出した。図42A及びBは、標準化した応答として表示したデータを示す。

### 【0397】

非選択的 - アドレナリンアゴニストであるイソプロテレノールを、 $2 \mu M$ の最高濃度を使用して試験した(図43A及びB)。この分析において、イソプロテレノールはその他の化合物よりもはるかに緩やかな会合速度を示した。化合物は90秒間注入した。

### 【0398】

図44A及びBは、2つの1AR表面への $111 \mu M$ 及び $333 nM$ のカルベジロール結合に対する応答を示す。カルベジロールは、これまでに検討した他の化合物よりもはるかに緩やかな解離速度を示す。

10

### 【0399】

#### 結論

1. 最小限のビオチニル化及びストレプトアビシンによる捕捉は、化合物の結合を測定するために使用可能である活性な1AR表面を生じた。

2. 10で、1AR表面は数日間に亘って活性なままであった。

3. アゴニスト及びアンタゴニストを含む試験した化合物に関して、会合及び解離速度の両方、並びに親和性における相違を認めた。これは、バイオセンサーアッセイがこのb1AR製剤に結合する化合物のパネルを特徴づけるために実行可能なアプローチであることを明らかにする。

4. 以下の表Aに示すように結合パラメータを幾つかの化合物について測定し、その全てを10で測定した。

20

### 【0400】

#### 【表A】

	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
アルプレノロール	$(1.453 \pm 0.007) \times 10^5$	$(6.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$44 \pm 1$
プロプラノロール	$(5.94 \pm 0.02) \times 10^5$	$(2.17 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	$3.64 \pm 0.07$
サルメテロール <sup>1</sup>	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^4$	$(9.5 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	$2500 \pm 300$
イソプロテレノール <sup>1,2</sup>	$(6 \pm 2) \times 10^3$	$(4.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$800 \pm 300$
カルベジロール <sup>1,2</sup>	$(2.3 \pm 0.9) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$5 \pm 3$

30

<sup>1</sup> 2つのb1AR表面から平均した

<sup>2</sup> 予備的結果

### 【0401】

#### (実施例8)

40

薬剤探索における化合物のスクリーニングのためのアデノシンA2a STARの使用方法

A2a受容体において活性を有する化合物を同定するため、アンタゴニスト形態(Rant22と呼ぶ)で立体構造的に選択した熱安定化アデノシンA2a受容体(A2aSTAR)を使用して、ライブラリーからの化合物をスクリーニングした。STARは以前に開示されているように作製した(Magnani et al., Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 5; 105(31):10744-9)。Rant22 A2a受容体でトランスクレクトしたHEK2

50

93T細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中、37°C、5%CO<sub>2</sub>にてT-175フラスコの単層で増殖させた。T-175表面から細胞を削り取って採取し、遠心分離によって収集した。

#### 【0402】

##### 膜の調製

細胞ペレットを10mlの20mM HEPES、pH7.4プラスプロテアーゼインヒビターカクテル錠(Roche)に再懸濁し、Tissue mizerを使用して20,500rpmで30秒間に亘ってホモジナイズした。ホモジネートを200×gで15分間に亘って4°Cで遠心分離した。

#### 【0403】

上清を取り出し、氷上に保存した。この手順をさらに2回反復し、プールした上清を40,000×gで45分間に亘って4°Cで遠心分離した。膜を20mM HEPES、pH7.4プラスプロテアーゼインヒビターカクテル錠の1ml分量に再懸濁した。タンパク質濃度をBCAプロテインアッセイ(Pierce)によって測定した。

#### 【0404】

##### スクリーニングアッセイ

調製した膜の10μg分量を、[<sup>3</sup>H]ZM241385(3.7nM)及び適切な量の非標識リガンドと共に室温で60分間インキュベートした。10mMから1μMの範囲の連続希釈を96穴フォーマットでスクリーニングした。フィルターGFCプレートを0.1%PEI中で60分間予浸した。Microbeta counterを3分/ウェルで使用した液体シンチレーション計数によって放射能を測定した。

##### 結果

濃度応答曲線にフィットさせるためにGraphPadプリズムを使用してデータを解析した。化合物のIC<sub>50</sub>を、[<sup>3</sup>H]ZM241385の特異的結合の50%阻害を生じさせる濃度として計算した。図45及び以下の表Bに提示するデータは、試験した化合物がA2a受容体StaRへの結合を阻害することができ、このアッセイにおいて一連の活性を有していたことを明らかにする。このデータは、化合物スクリーニングのためのStaRの有用性を明らかにする。

#### 【0405】

【表B】

TableB

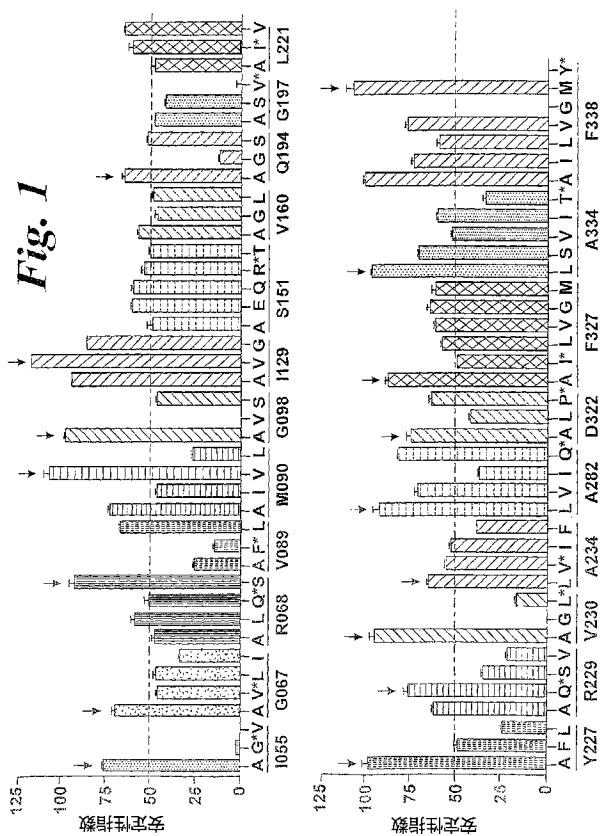
	<b>HTL0245</b>	<b>HTL0246</b>	<b>HTL0247</b>	<b>HTL0248</b>	<b>HTL0249</b>	<b>HTL0250</b>	<b>HTL0251</b>	<b>HTL0252</b>	<b>CGS15943</b>
<b>ベストフィット値</b>									
基部	105.2	151.2	47.23	44.21	25.74	13.98	-5.831	176.4	22.40
上部	1428	1414	1406	1519	1527	1382	1446	1257	1530
LogIC50	-6.795	-6.442	-7.552	-8.098	-8.431	-4.112	-2.874	-4.658	-8.661
IC50	1.605e-007	3.614e-007	2.804e-008	7.985e-009	3.709e-009	7.735e-005	0.001337	2.199e-005	2.183e-009
<b>標準誤差</b>									
基部	29.07	70.00	40.67	18.05	7.115	104.4	79.15	154.9	29.97
上部	44.68	83.73	96.91	50.84	20.46	38.13	26.10	74.89	40.93
LogIC50	0.07888	0.1886	0.1338	0.05205	0.02427	0.1202	0.2821	0.2878	0.08677

参照

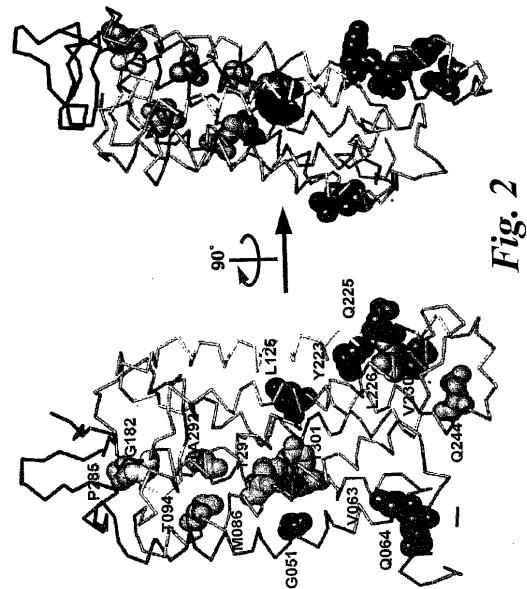
1. S. H. White (2004) *Protein Sci* **13**, 1948-1949.
2. C. G. Tate (2001) *FEBS Lett* **504**, 94-98.
3. R. Grisshammer, C. G. Tate (1995) *Q Rev Biophys* **28**, 315-422.
4. J. U. Bowie (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**, 397-402.
5. F. W. Lau, S. Nauli, Y. Zhou, J. U. Bowie (1999) *J Mol Biol* **290**, 559-564.
6. Y. Zhou, J. U. Bowie (2000) *J Biol Chem* **275**, 6975-6979.  
10
7. S. Faham, D. Yang, E. Bare, S. Yohannan, J. P. Whitelegge, J. U. Bowie (2004) *J Mol Biol* **335**, 297-305.
8. Y. Yarden, H. Rodriguez, S. K. Wong, D. R. Brandt, D. C. May, J. Burnier, R. N. Harkins, E. Y. Chen, J. Ramachandran, A. Ullrich, *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6795-6799.
9. T. Warne, J. Chirnside, G. F. Schertler (2003) *Biochim Biophys Acta* **1610**, 133-140.
10. E. M. Parker, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 9987-9996.  
20
11. E. M. Parker, K. Kameyama, T. Higashijima, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 519-527.
12. W. J. Degrip (1982) *Methods in Enzymology* **81**, 256-265.
13. K. Palczewski, T. Kumazaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, *et al* (2000) *Science* **289**, 739-745.
14. J. Li, P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa, G. F. Schertler (2004) *J Mol Biol* **343**, 1409-1438.  
30
15. R. Jaenicke, G. Bohm (1998) *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 738-748.
16. J. Tucker, R. Grisshammer (1996) *Biochem J* **317** ( Pt 3), 891-899.
17. W. Schaffner, C. Weissmann (1973) *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
18. C. G. Tate (1998) *Methods Enzymol* **296**, 443-455.
19. H. M. Weiss, R. Grisshammer (2002) *Eur J Biochem* **269**, 82-92.
20. 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., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. and Kobilka, B. K. (2007)  
40  
*Nature* **15**, 383-387.

21. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. and Stevens, R. C. (2007) *Science* 318:1258-1265.
22. Minneman, K. P., Weiland, G. A. and Molinoff, P. B. (1980) *Mol Pharmacol* 17:1-7.
23. Parker, E. M., Swigart, P., Nunnally, M. H., Perkins, J. P. and Ross, E. M. (1995) *J Biol Chem* 270:6482-6487. 10
24. Schofield DJ, Pope A, Clementel V, Buckell J, Chapple SDJ,, Clarke KF, Conquer JS, Crofts AM, Crowther SRE, Dyson MR, Flack G, Griffin GJ, Hooks Y, Howat WJ, Kolb-Kokocinski A,, Kunze S, Martin CD, Maslen GL,, Mitchell JM, O'Sullivan M, Perera RL, Roake W, Shadbolt SP, Vincent KJ, Warford A, Wilson WE, Xie J, Young JL, McCafferty J (2007) Application of phage display to high throughput antibody generation and characterisation. *Genome Biology*. 8 (11) R254 20
25. Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. (2006) Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol*. 2006 Dec 22;6:49. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/49>
26. Martin C, Rojas G, Mitchell JN, Vincent KJ, Wu J, McCafferty J, Schofield DJ (2006) A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnology* 6:46 doi:10.1186/1472-6750-6-46 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/46/abstract> 30
27. Warne et al (2008) Structure of a  $\beta$  adrenergic G protein coupled receptor *Nature* 454: 486-491

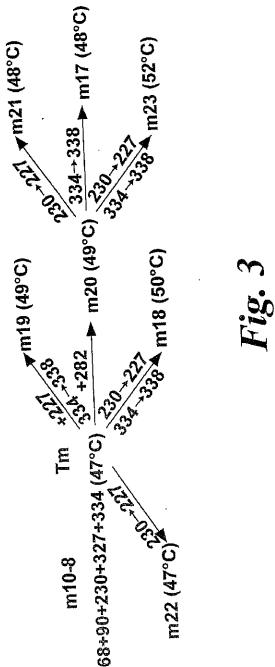
【図1】



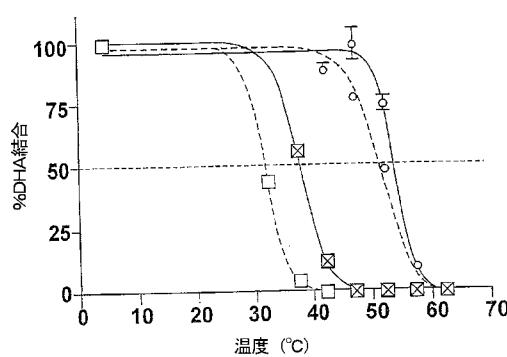
【図2】

**Fig. 2**

【図3】



【図4】



【図5】

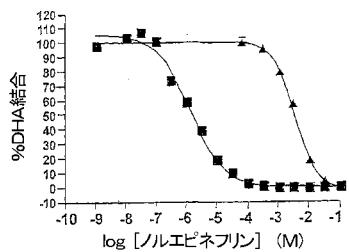


Fig. 5a

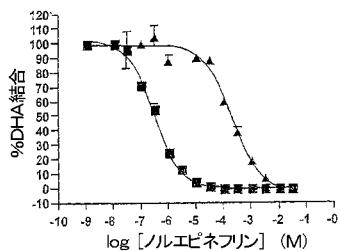


Fig. 5b

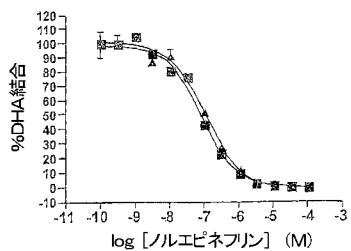


Fig. 5c

【図6】

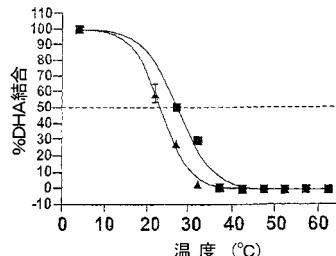


Fig. 6a

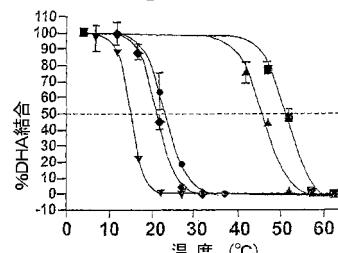


Fig. 6b

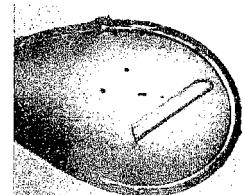


Fig. 6c

【図7】

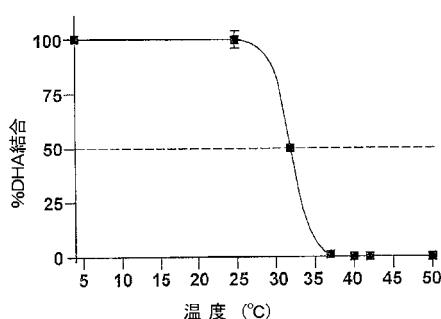


Fig. 7

【図8】

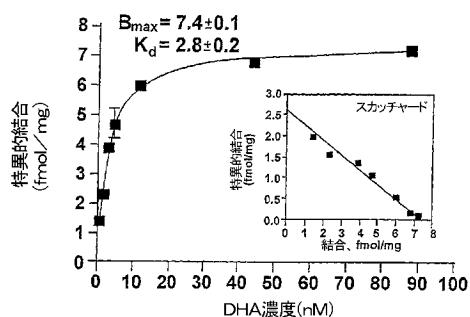


Fig. 8a

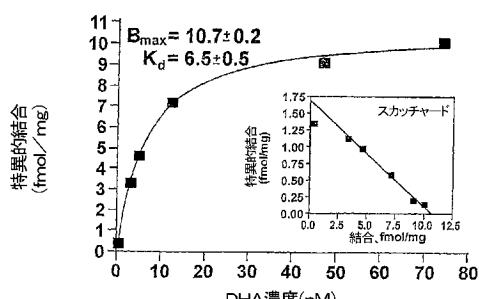


Fig. 8b

【図 9 A】

ヒト $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、及び $\beta_3$ ビンチメンチオウ $\beta$ -アドレナリン受容体とのアラインメント

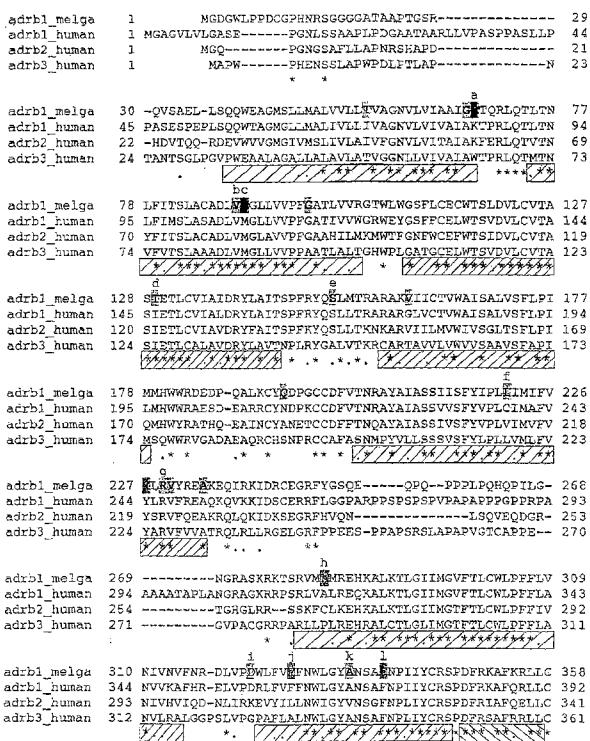


Fig. 9 (Page 1 of 2)

【図 9 B】

adrb1\_melga 359 PPRKADRLHAGGQPAPLPGGFISTLGSPERHSPGGTWSDCNGGTRGGSES 408  
adrb1\_human 393 CARRAARRRHATHGDPRR-----ASGCLARPQPPS 423  
adrb2\_human 342 LRRSSLLKAYNG-----YS-----SNGNTGEQSG--- 365  
adrb3\_human 362 RCGRRNLP-----PEP-----CAAARALFPS 382

adrb1\_melga 409 SLEERHSKTSRSESKMEREKNILATTRFYCTFLGNGDKAVFCTVLRIVKL 458  
adrb1\_human 424 PGAAASDDD-----DDVUGATPPARLLEPWACCN3GAAADSDS,DE 465  
adrb2\_human 366 ---YHVEQ-----EKENK-----LICEDLPGTEDFVHGQTVPSDN 398  
adrb3\_human 383 GVPAARS-----SPAQPRLCQRLDGAWSGVG 408

adrb1\_melga 459 PEDATCTCPHTWKLKMKWRFQHQQA 483  
adrb1\_human 466 CRCPGFASESKV 477  
adrb2\_human 399 IDSQGRNCSTNDSSL 413  
adrb3\_human 409 408

SEE BELOW FOR KEY

m23における変異の位置  
他の熱安定化変異の位置  
膜貫通ドメインの位置  
ヘリックス8の位置

他のアミノの置き換えが頭著な熱安定性を与えた位置は小文字で記され、その変異は熱安定性が低下する順番で以下のように挙げられる。

- a. R68S
- b. V93L
- c. M90V, A
- d. I129V, A, G
- e. S151E, Q
- f. L221V, I
- g. R229Q, A
- h. A282L, V, Q
- i. D322A, P
- j. F327A, G, M, V
- k. A334L, S, I
- l. F338M, A, V, I

Fig. 9 (Page 2 of 2)

【図 10 A】

ヒトアデノシン受容体のアラインメント

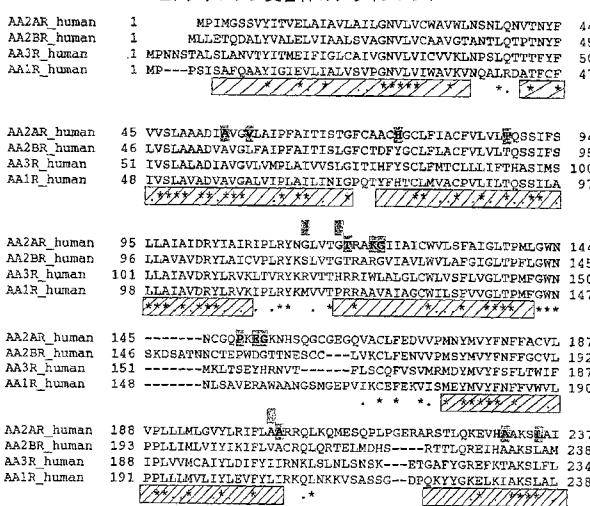


Fig. 10 (Page 1 of 2)

【図 10 B】

AA2AR\_human 238 IEGLFALCWPLPHIINCFTFFCPDCS-HAPLWLMLYLAIVLSHNTSVNNPF 286  
AA2BR\_human 239 IVGIFALCWLPVHAVNCVTLFQPAQGKKNPKWAMMMAILSHANSVVNP 288  
AA3R\_human 235 VLFPLFALSWLPLSNCINCIYFNG----EVQLVLYMGILLSHANSMMNP 280  
AA1R\_human 239 IFLFLFALSWLPLHILNCIITLFCPSC--HKPSILTYIAIFLTGNSAMNP 286

AA2AR\_human 287 IYAYRIREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAHHGSDGEQVSL 336  
AA2BR\_human 289 VYAYRNDRDFRIFTFHIIISRYLLCQ-----ADVKSQNGQAGVQPL 328  
AA3R\_human 281 VYAKLKKFKETYLILKACVVCVCP-----SDSLDTSTEKNSE 318  
AA1R\_human 287 VYAFRIOQPERVTIILK1WHDHFRCP-----APPIDEELPPEERPD 325

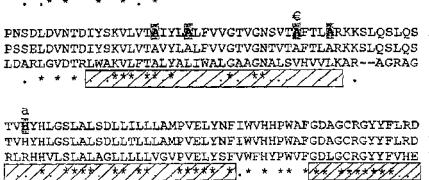
AA2AR\_human 337 RLNCHPGFWANGSAPHPERPRTNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELL 386  
AA2BR\_human 329 GVGL 332  
AA3R\_human 319 318  
AA1R\_human 327 326

A アゴニスト結合によって決定された変異  
▲アンタゴニスト結合によって決定された変異  
■膜貫通ドメインの位置  
◆ヘリックス8の位置

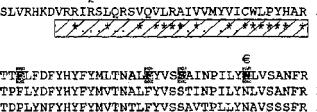
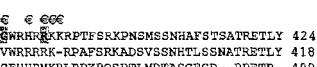
Fig. 10 (Page 2 of 2)

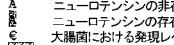
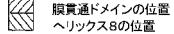
【図 11 A】

ニューロテンシン受容体のアラインメント

NTR1_rat	1 MHLNSSPVQGTPGEPPDAQPFGPQSEMEATFLALSLSNGSGNTSESPTAG	50
NTR1_human	1 MRLNSAP--GVPGTAAADPQFRAQAGLEEALLA/GFGNASGNASERVLAA	49
NTR2_human	1 METSSP--RPDRPSSNPG-----L8	18
* * * * *		
NTR1_rat	51 PNSDLVNTDLYSKVLVITIYIPLFVGVTCVGSVTFPLAKKSLQSLQS	100
NTR1_human	50 TVHYHGLSIALSLLVLLAMPVELYNFIWVWHFWAFGDAACRGYYFLRD	99
NTR2_human	19 LDARLGVDTRLNWAKVLFATYALVALNALGAAGNALSVHVVLKAR--AGRAG	66
* * * * *		
		
a		
NTR1_rat	101 TVHYHGLSIALSLLVLLAMPVELYNFIWVWHFWAFGDAACRGYYFLRD	150
NTR1_human	100 TVHYHGLSIALSLLVLLAMPVELYNFIWVWHFWAFGDAACRGYYFLRD	149
NTR2_human	67 RLRLHVTLSLALAGLLLIVGVPEVELYSEWHEHYPWWFSDLGCRCGYVFVHE	116
* * * * *		
NTR1_rat	151 ACTYATAALNVASLSLSEVERYLAIChPFKAKLMSRPTKKPSISA1WLASALL	200
NTR1_human	150 ACTYATAALNVASLSLSEVERYLAIChPFKAKWLMSSRPTKKFISAIWLASALL	199
NTR2_human	117 LCATATVLSVAGLSEAFRCLAVCOPLNRARSLLTFRKRNVLVLSWAASIGL	166
* * * * *		
NTR1_rat	201 AIPMLFTMQLNQR--SCDG--THGGCLVCTPIVDTATVKVVIQVNTEFMSFL	247
NTR1_human	200 AVPMLEFTMGEQNR--SADG--QHAGLVLCTPIVDTATVKVVIQVNTEFMSFI	246
NTR2_human	167 ALPMAVIMGQKHELETADEPEPASRVCTVLSRALTALCVICUNVLVSEV	216
* * * * *		
NTR1_rat	248 FPMLVISILNTVIEANKLTVMVHQAAEQ---G----RVCEVGTHNGLEHS	289
NTR1_human	247 FPMVVISLNLTIIANKLTVMRVQAAEQ---G----QVCTVGG---EHS	284
NTR2_human	217 LFLALATAFINGVTVSHLLALLCSCQVSTSTPGSTPSRLELLSEEGLLSFI	266
* * * * *		

【図 11 B】

NTR1_rat	290 TEFNMLIE-----PGRVQALRHGVYEVLRRAVIAFVVVCLWPYHVR	327
NTR1_human	285 TFSMAIE-----PGRVQALRHGVYEVLRRAVIAFVVVCLWPYHVR	322
NTR2_human	267 VWKKTIFIQGGQSVLSVRLHKDVERIRSLSQRSVQVLRAIVVMMVICWLWYHAR	316
		
NTR1_rat	328 RLMFCYISDEQWTTEDFDYHYYFYLMTNAIAYVSRAINPILWVLSANFR	377
NTR1_human	323 RLMFCYISDEQWTFPLYDFYHYYFYLMTNAIYVSSTINPILYNLVLSANFR	372
NTR2_human	317 RLMYCYYVPPDAWTDPYLPNFYHYYFYMVTNTLFYVSSAVTPLLYNAVSSSF	366
* * * * *		
		

**A** ニューロテンシンの非存在下における加熱によって決定された変異  
ニューロテンシンの存在下における加熱によって決定された変異  
**B** 大腸菌における発現レベルを改善する変異  
  


(a) H103: A, N, S, V, L, Mで熱安定性が得られた  
H103N及びH103Sのみが発現のwtレベルを与えた

Fig. 11 (Page 2 of 2)

Fig. 11 (Page 1 of 2)

【図 12】

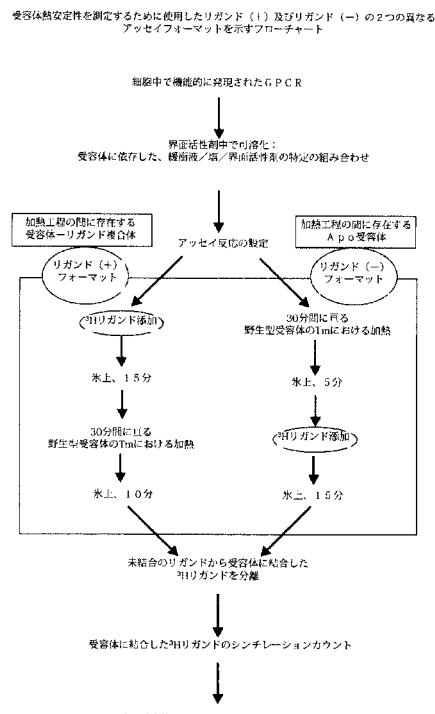


Fig. 12

【図 13 A】

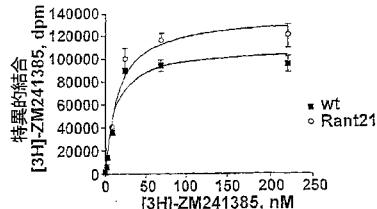


Fig. 13A

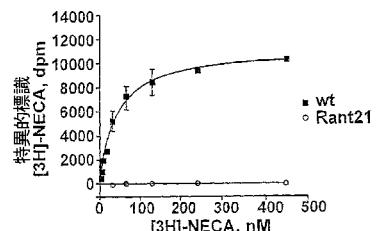


Fig. 13B

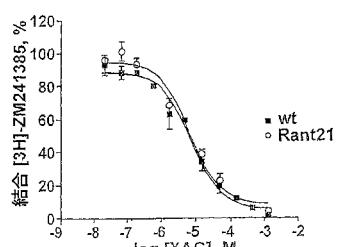


Fig. 13C

【図 13B】

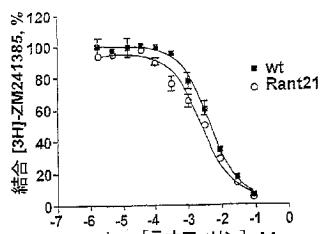


Fig. 13D

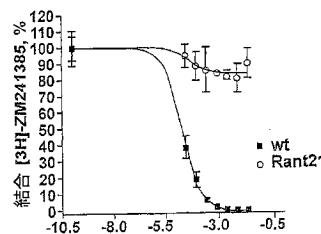


Fig. 13E

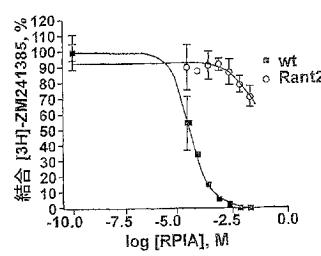


Fig. 13F

【図 15】

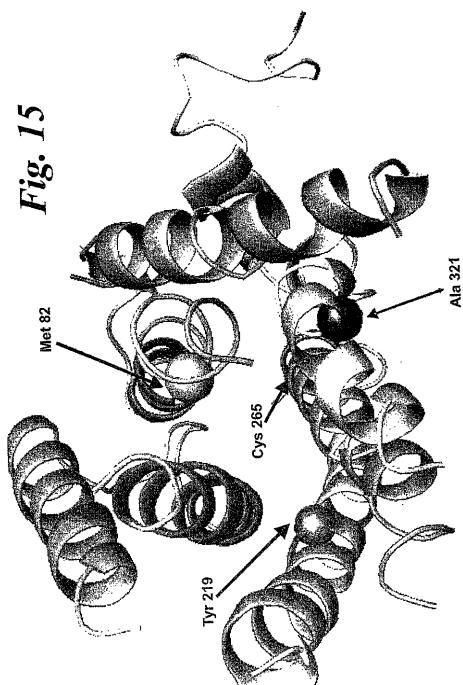


Fig. 15

【図 14】

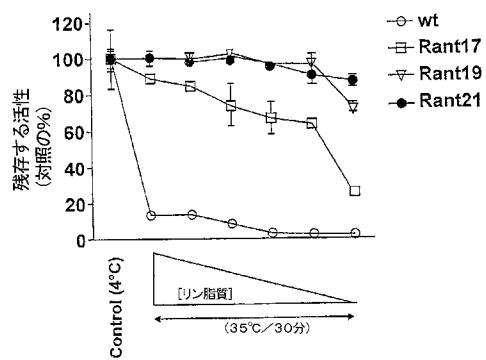


Fig. 14A

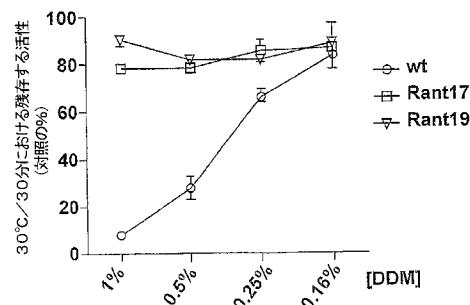


Fig. 14B

【図 16】

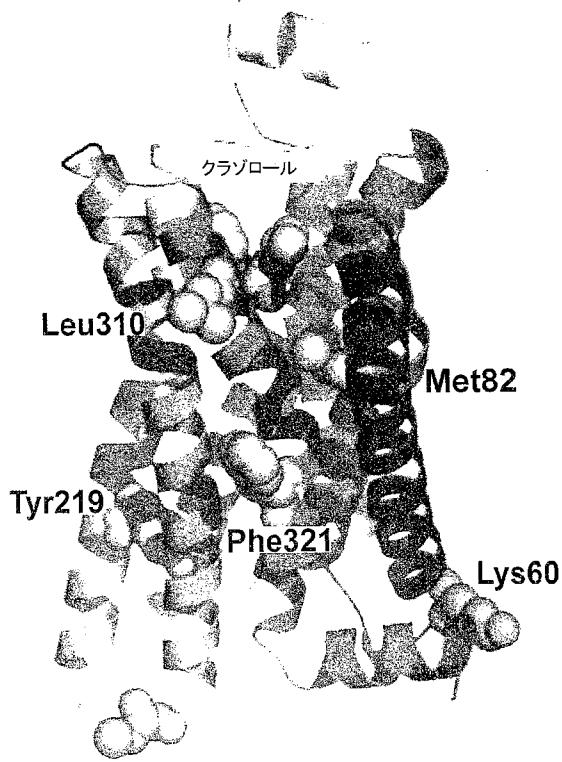


Fig. 16

【図 17 A】

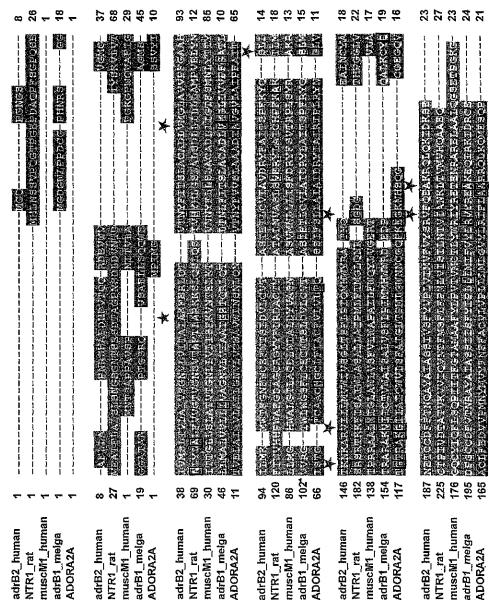


Fig. 17 (Page 1 of 3)

【図 17 B】

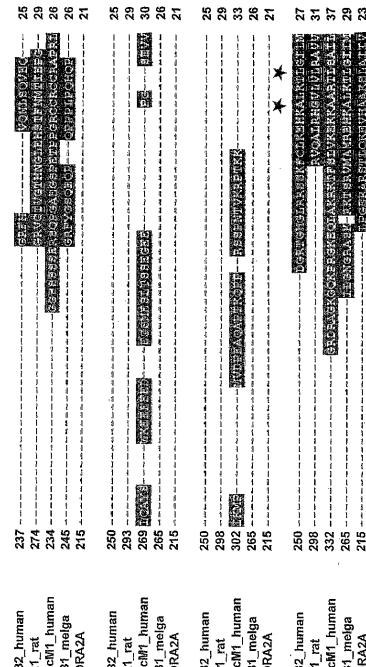


Fig. 17 (Page 2 of 3)

【図 18】

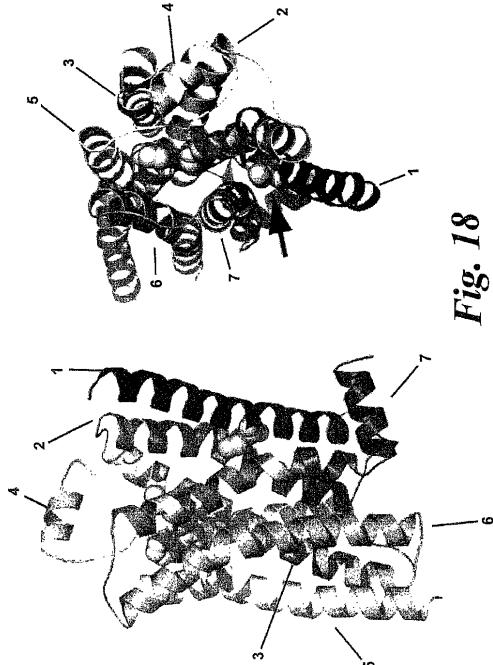


Fig. 18

【図 19】

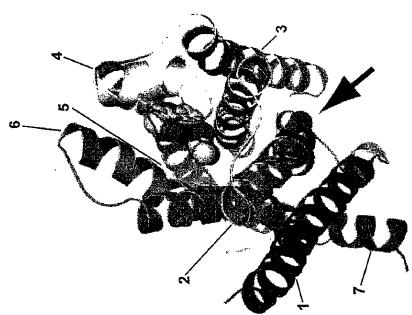
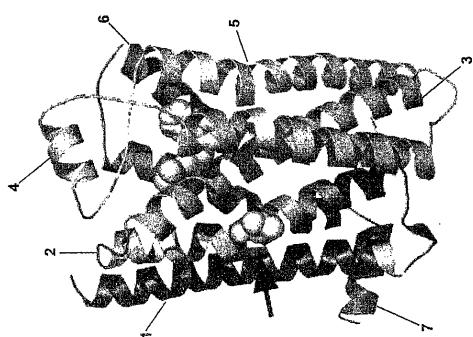
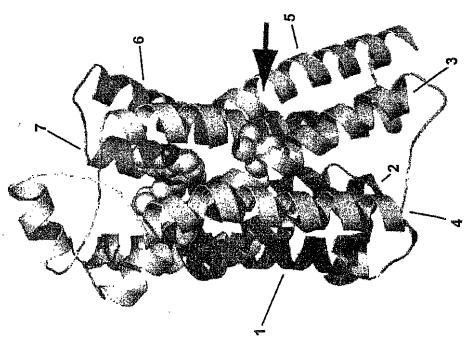


Fig. 19



【図 21】

Fig. 21



【図 20】

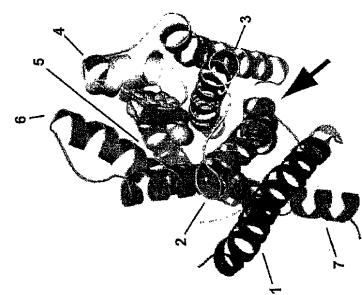
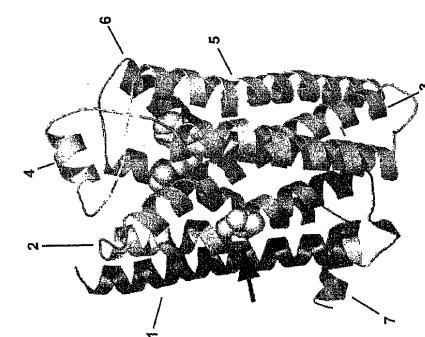


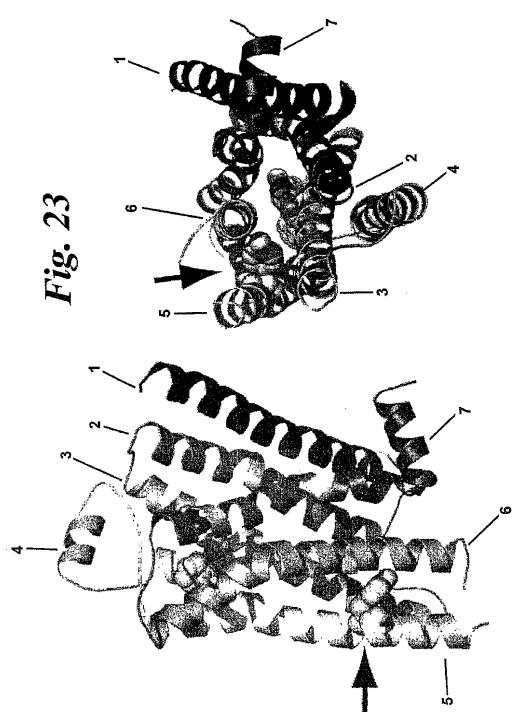
Fig. 20



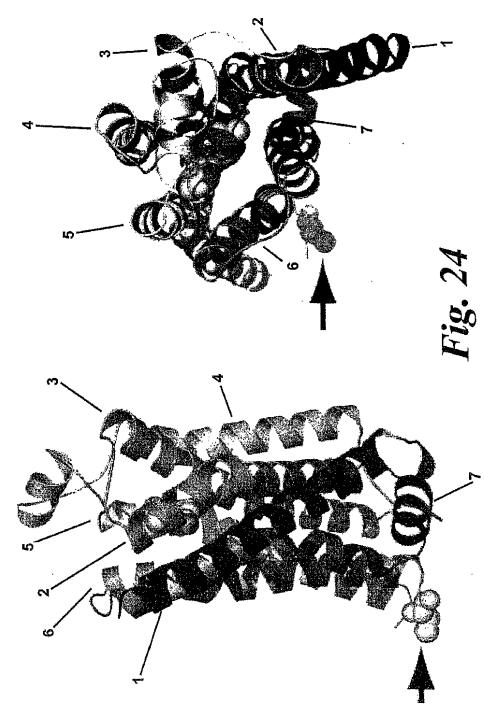
【図 22】

Fig. 22

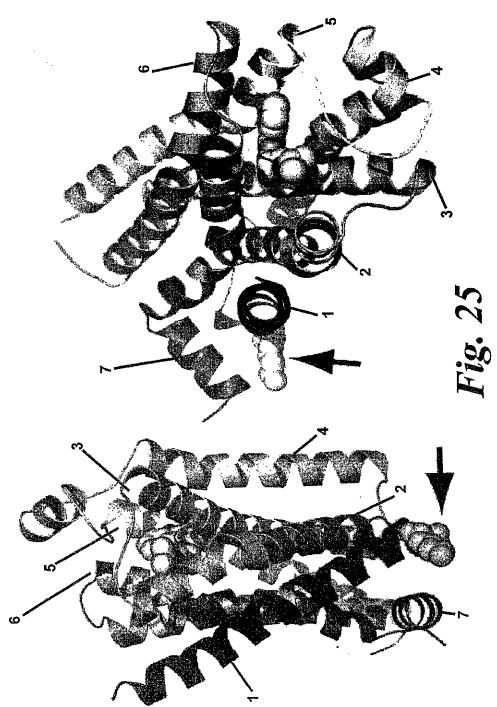
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】

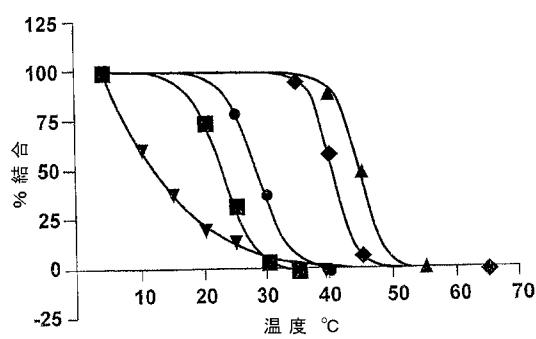


Fig. 26

【 図 27 】

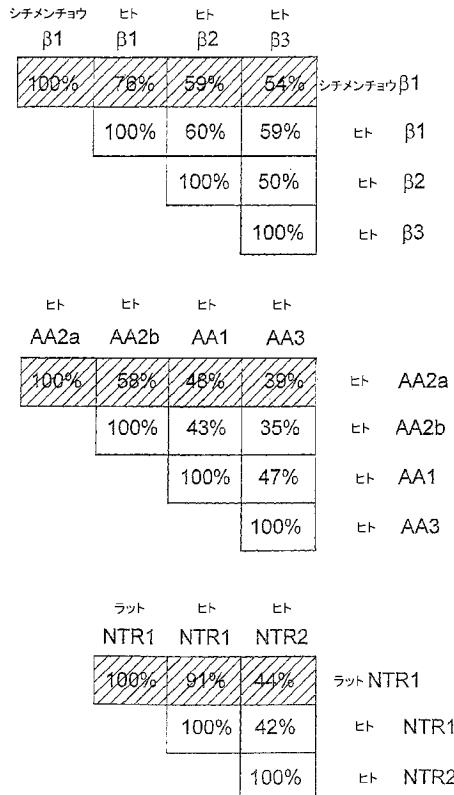


Fig. 27

【 2 8 B 】

Fig. 28 (Page 2 of 2)

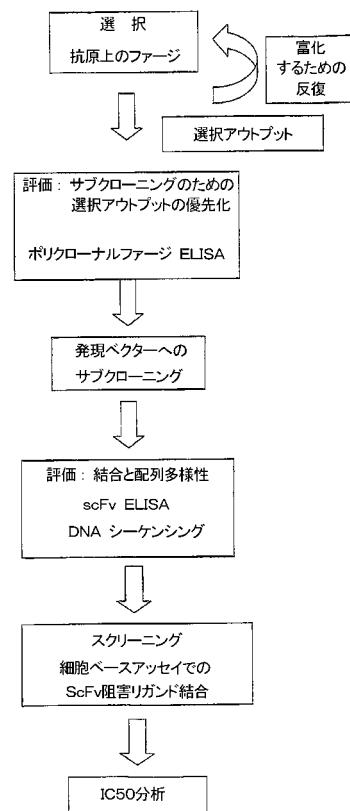
【 図 2 8 A 】



【 义 2 9 】

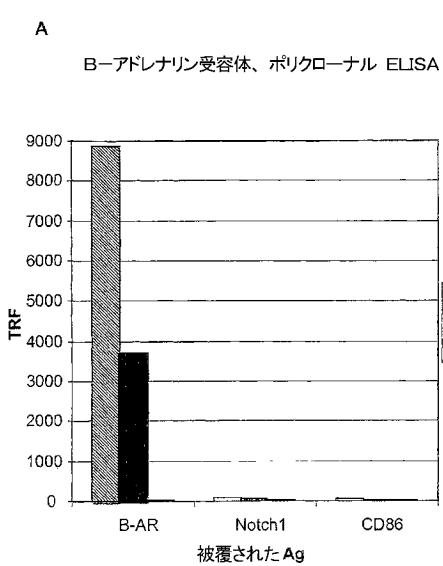
**Figure 29**

## 阻害性scFv結合物質の同定のための典型的なリード化合物単離工程の概略図



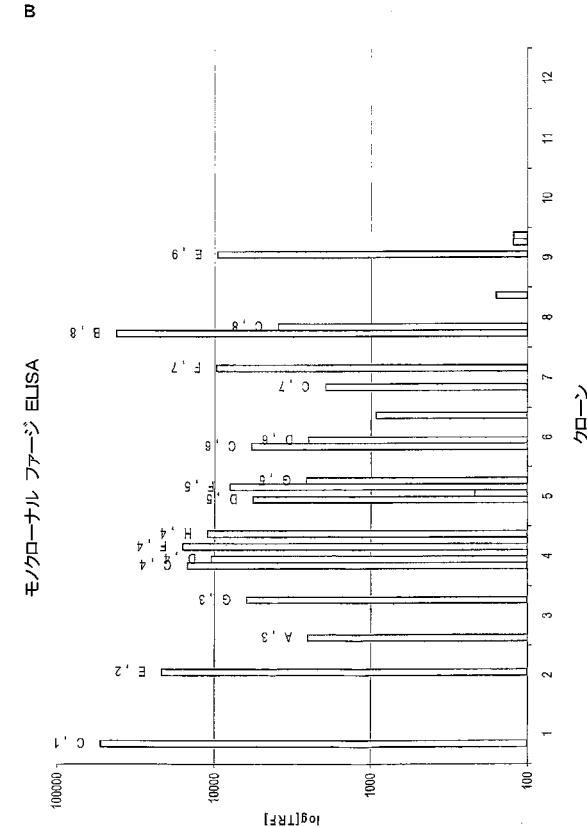
【図 3 0 A】

Figure 30 (Page 1 of 2)

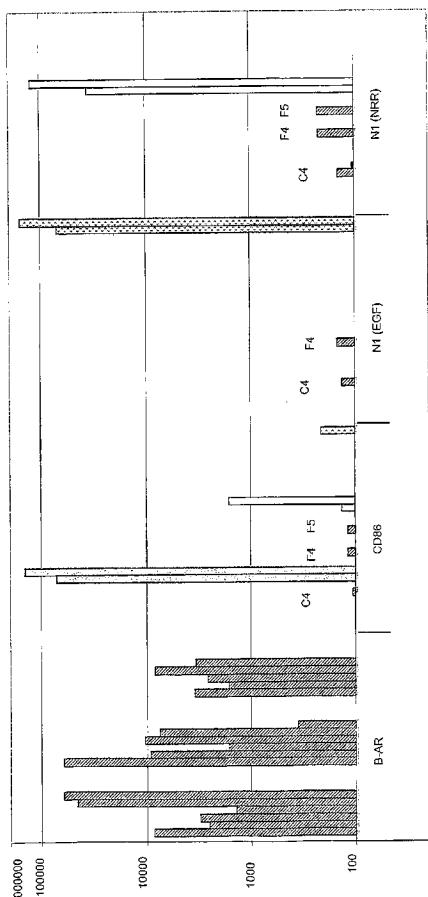


【図 3 0 B】

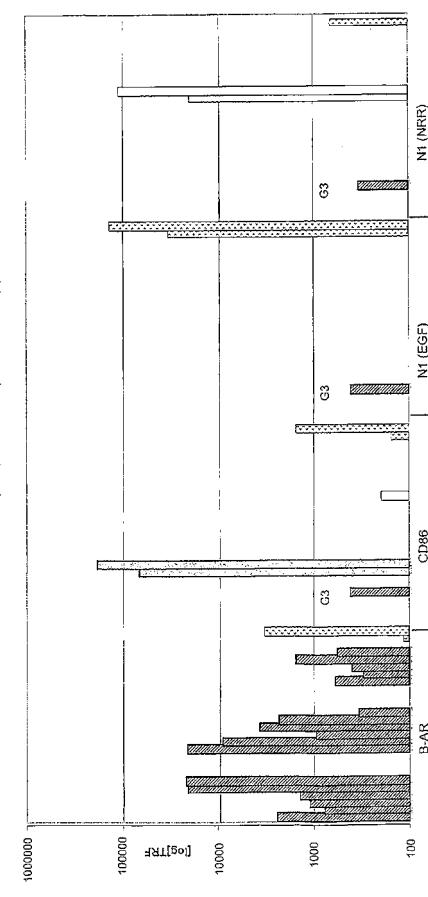
Figure 30 (Page 2 of 2)



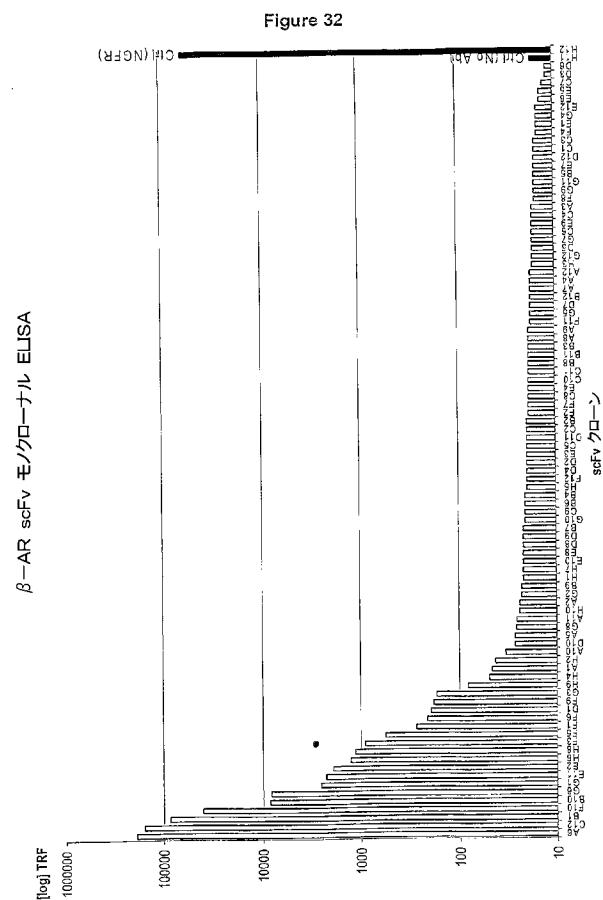
【図 3 1 A】

Figure 31 (Page 1 of 2)  
26/9/8 B-AR モノクローン (アミノープレート)

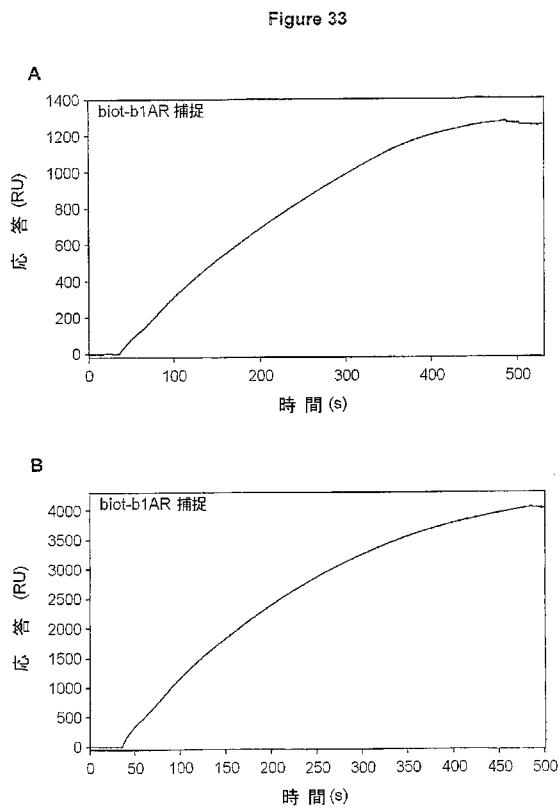
【図 3 1 B】

Figure 31 (Page 2 of 2)  
26/9/8 B-AR モノクローン (His-プレート)

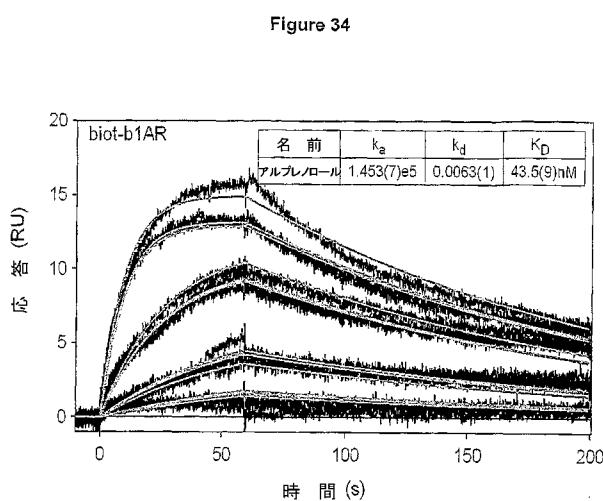
【図 3 2】



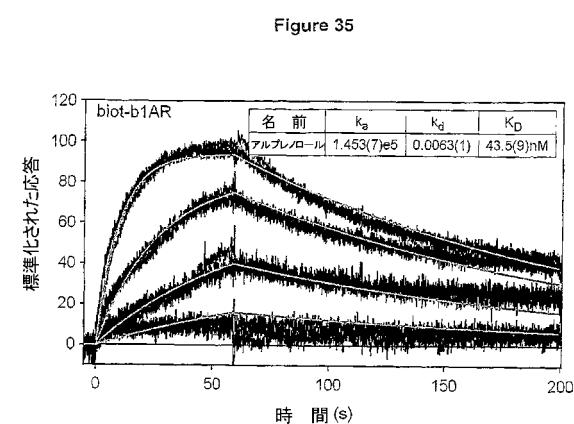
【図 3 3】



【図 3 4】

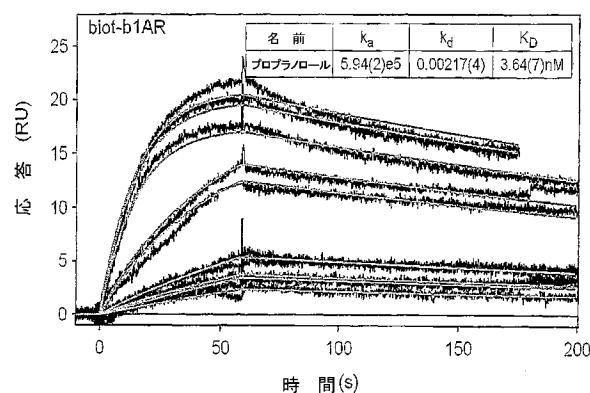


【図 3 5】



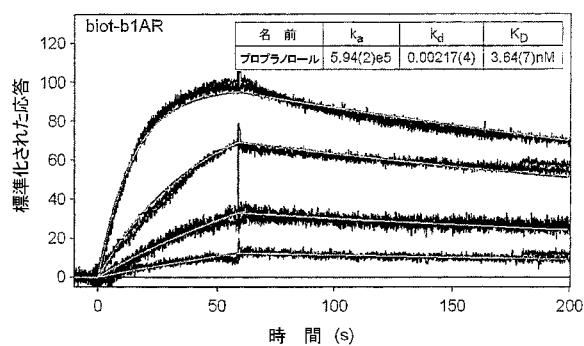
【図 3 6】

Figure 36



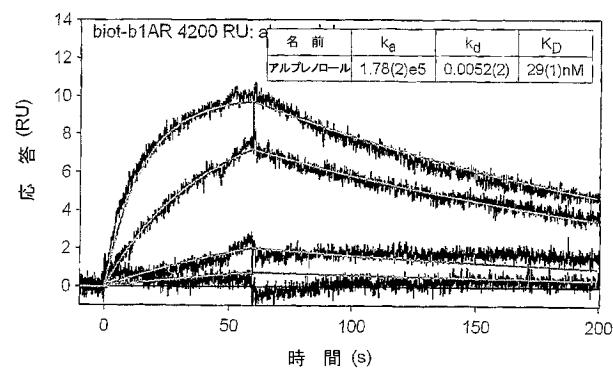
【図 3 7】

Figure 37



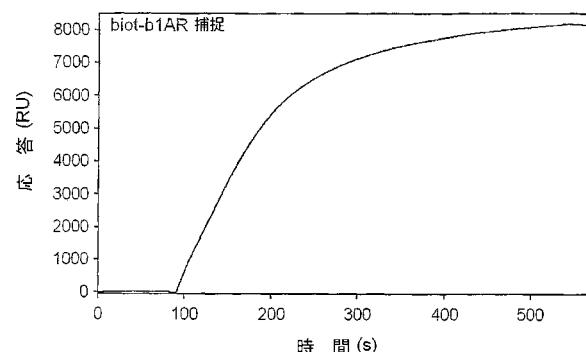
【図 3 8】

Figure 38



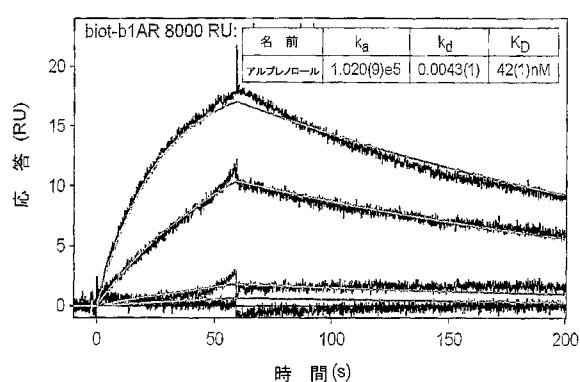
【図 3 9】

Figure 39



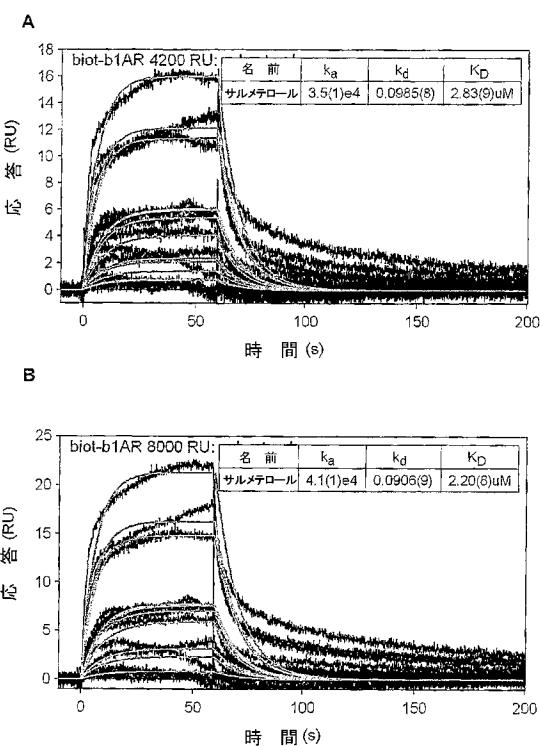
【図 4 0】

Figure 40



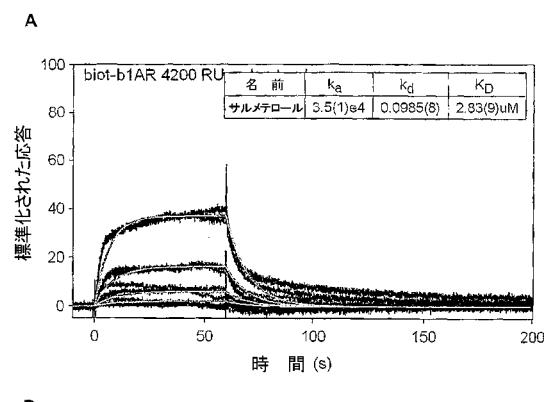
【図 4 1】

Figure 41



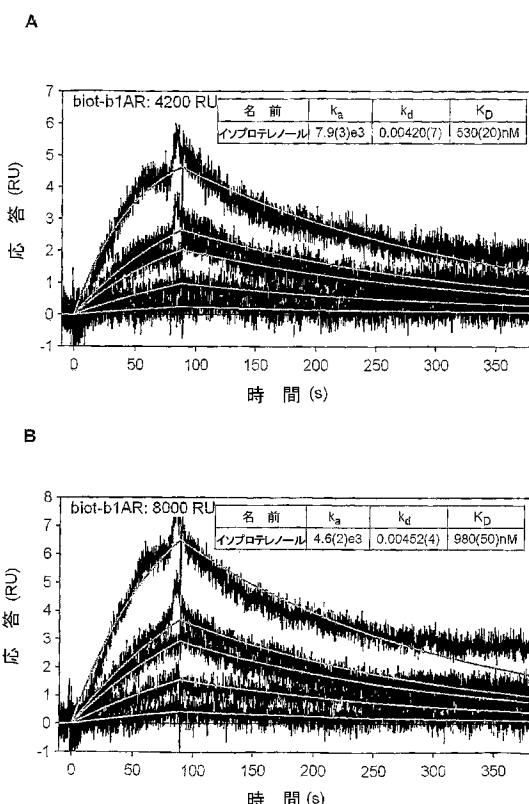
【図 4 2】

Figure 42



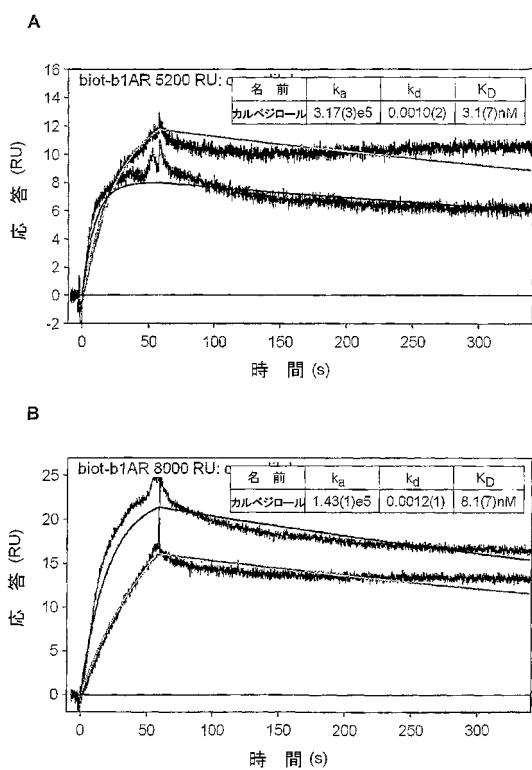
【図 4 3】

Figure 43



【図 4 4】

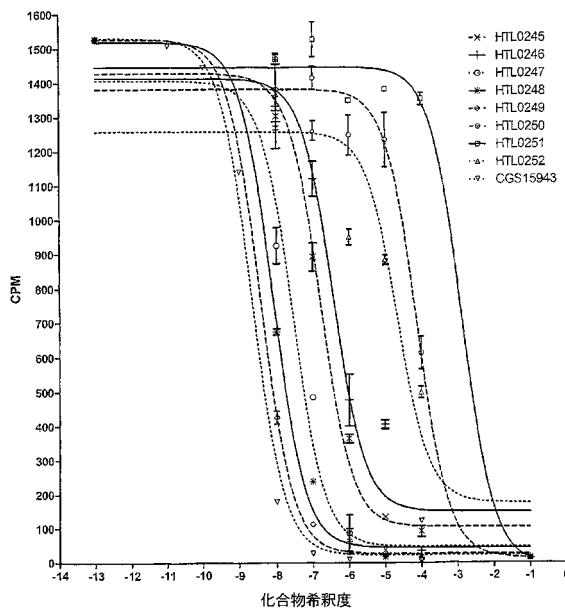
Figure 44



【図 4 5】

Figure 45

HTL0245-HTL0252のRant22試験スクリーニング 17/11/08



【配列表】

2011508875000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2008/004223
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/566 C07K14/72 C12N15/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D'ANTONA A M ET AL: "A cannabinoid receptor 1 mutation proximal to the DRY motif results in constitutive activity and reveals intramolecular interactions involved in receptor activation" BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1108, no. 1, 7 September 2006 (2006-09-07), pages 1-11, XP025101414 ISSN: 0006-8993 [retrieved on 2006-09-07] the whole document  -/-	1-23, 32-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12 March 2009	19/08/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bayer, Martin	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2008/004223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STANDFUSS ET AL: "Crystal Structure of a Thermally Stable Rhodopsin Mutant" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 372, no. 5, 11 September 2007 (2007-09-11), pages 1179-1188, XP022242879 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-23, 32-44
A	LEE N H ET AL: "ALANINE SCANNING MUTAGENESIS OF CONSERVED ARGININE/LYSINE-ARGININE/LYSINE G PROTEIN/ACTIVATING MOTIFS ON M1 MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 50, no. 1, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 140-148, XP000901009 ISSN: 0026-895X the whole document	1-23, 32-44
A	SAMAMA P ET AL: "A mutation-induced activated state of the beta2-adrenergic receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 268, no. 7, 5 March 1993 (1993-03-05), pages 4625-4636, XP002135769 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-23, 32-44
A	LATTION A-L ET AL: "Constitutively active mutants of the betal-adrenergic receptor" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 457, no. 3, 3 September 1999 (1999-09-03), pages 302-306, XP004260170 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-23, 32-44
P,X	WO 2008/114020 A (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; HENDERSON RICHARD [GB]; TATE CHRISTOPHER GOR) 25 September 2008 (2008-09-25) cited in the application the whole document	1-23, 32-44
		-/-

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/GB2008/004223
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SERRANO-VEGA MARIA J ET AL:          "Conformational thermostabilization of the          betal-adrenergic receptor in a          detergent-resistant form"          PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF          SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF          SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US,          vol. 105, no. 3,          22 January 2008 (2008-01-22), pages          877-882, XP002487473          ISSN: 0027-8424          the whole document          _____</p>	1-23, 32-44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.	PCT/GB2008/004223
-------------------------------	-------------------

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23, 32-44

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2008 /004223

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-23, 32-44

The claims concern methods of producing a binding partner to a mutant GPCR that has increased stability in a particular conformation relative to the cognate wildtype (parent) GPCR.

2. claims: 24-31

The claims concern methods of producing an antibody for a mutant GPCR that has increased stability in a particular conformation relative to the parent GPCR.

3. claims: 45-66, 78

The claims concern methods for providing a mutant GPCR wherein the binding of a selected ligand has increased stability compared to a parent GPCR.

4. claims: 67-77, 79-92, 94-96

The claims concern methods for providing a mutant GPCRs wherein said mutant has increased stability compared to parent GPCRs.

5. claims: 93, 103-108

The claims concern mutant GPCR and products comprising said GPCR with increased stability compared to parent GPCR.

6. claims: 97-102

The claims concern binding partners to mutant GPCRs with increased stability compared to parent GPCRs and synthesis of said binding partners.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2008/004223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008114020	A 25-09-2008	GB	2447786 A	24-09-2008
		GB	2456235 A	15-07-2009
		GB	2456236 A	15-07-2009
		GB	2456237 A	15-07-2009

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	Z
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100087468

弁理士 村瀬 一美

(72) 発明者 ウィア, マルカム ピーター

イギリス国 ハーフォードシャー エイエル7 3エイエックス, ウェリンガーデンシティー,  
ブロードウォーターロード, バイオパーク (番地なし), ヘブテアズ セラピューティク  
ス リミテッド

(72) 発明者 マーシャル, フィオナ ハミルトン

イギリス国 ハーフォードシャー エイエル7 3エイエックス, ウェリンガーデンシティー,  
ブロードウォーターロード, バイオパーク (番地なし), ヘブテアズ セラピューティク  
ス リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA13 DA30 DA36 DA60

4B064 AG20 CA19 CC24 CE09 DA13

4H045 AA10 BA05 BA10 CA40 DA50 EA50 FA74 GA20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011508875A5</a>	公开(公告)日	2012-09-13
申请号	JP2010538902	申请日	2008-12-19
申请(专利权)人(译)	Heputeazu治疗有限公司		
[标]发明人	ウィアマルカムピーター マーシャルフィオナハミルトン		
发明人	ウィア, マルカム ピーター マーシャル, フィオナ ハミルトン		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C40B20/04 G01N33/543 C12P21/02 C07K14/705		
CPC分类号	G01N33/74 C07K14/705 C07K14/70571 C07K14/723 G01N33/54366 G01N33/566 G01N2333/726 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/50.ZNA.Z G01N33/53.U G01N33/15.Z C40B20/04 G01N33/543.595 C12P21/02.Z C07K14 /705		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA13 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA60 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064 /CC24 4B064/CE09 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/BA05 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20		
优先权	2007024860 2007-12-20 GB		
其他公开文献	JP5763343B2 JP2011508875A		

**摘要(译)**

一种产生GPCR的构象特异性结合配偶体的方法， a ) 提供所述亲本GPCR的突变体GPCR，与亲本GPCR相比，在特定构象下具有增加的稳定性， b ) 提供测试化合物， c ) 当所述测试化合物包含特定构象时，测量所述测试化合物是否与所述突变GPCR结合;和 d ) 当提供所述特定构象时，分离与所述突变GPCR结合的测试化合物 该方法包括。还公开了与亲本GPCR相比产生具有增加的稳定性的GPCR的方法。