

(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2019-527065  
(P2019-527065A)

(43) 公表日 令和1年9月26日(2019.9.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02 ZNA	2G045
<b>C07K 14/705 (2006.01)</b>	C07K 14/705	4B029
<b>C12N 15/12 (2006.01)</b>	C12N 15/12	4B063
<b>C12N 15/63 (2006.01)</b>	C12N 15/63	4B064
<b>C12N 15/65 (2006.01)</b>	C12N 15/65	4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-510562 (P2019-510562)  
 (86) (22) 出願日 平成29年5月3日 (2017.5.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月26日 (2018.12.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/030874  
 (87) 国際公開番号 WO2017/192743  
 (87) 国際公開日 平成29年11月9日 (2017.11.9)  
 (31) 優先権主張番号 62/331, 628  
 (32) 優先日 平成28年5月4日 (2016.5.4)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 518391018  
 アビリタ バイオ, インク.  
 アメリカ合衆国 92117 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ ベイ・サミット・  
 プレイス 4626  
 (74) 代理人 100082072  
 弁理士 清原 義博  
 (72) 発明者 ミレニ, マウロ  
 アメリカ合衆国 92117 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ ベイ・サミット・  
 プレイス 4626  
 (72) 発明者 ビレッタ, ロサリオ  
 アメリカ合衆国 92014 カリフォル  
 ニア州 デル・マー レカード・ドライブ  
 14090

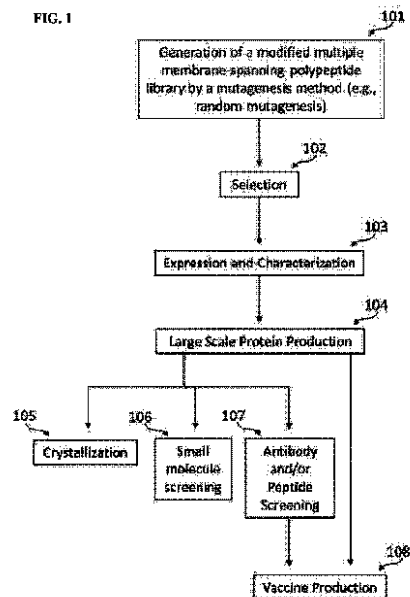
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数膜貫通型タンパク質を調製する方法とプラットフォーム

(57) 【要約】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成するための方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットが本明細書で開示されている。いくつかの例では、修飾されたイオンチャネルポリペプチドを生成するための方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットが本明細書で開示されている。場合によっては、GPCRを生成するための方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットも本明細書で開示されている。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して治療薬をスクリーニングする方法であって、

(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；

(b) 発現ベクターの第 1 のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 (a) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドと、

ポリヌクレオチドの C 末端に動作可能に連結された第 1 の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドの N 末端に動作可能に連結された第 2 の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；

(c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも 1 つの選択剤の存在または不在で第 1 の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第 1 のセットを発現させる工程；

(d) 工程 (c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；

(e) 第 2 の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；

(f) 治療薬を用いて、工程 (e) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、

(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物と治療薬との間の結合を検知する工程、を含む、方法。

## 【請求項 2】

治療薬は小分子またはポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

小分子は薬物または小分子フラグメントである、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ポリペプチドは抗体またはその結合フラグメントである、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 Fab'、二価 Fab<sub>2</sub>、単鎖可変フラグメント (scFv)、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 (sdAb)、あるいはラクダ科抗体、またはこれらの結合フラグメントを含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイ法または酵母ディスプレイ法によって生成される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

工程 f) のインキュベートする工程は、治療薬を用いてインキュベートする前に、ナノ粒子上の複数膜貫通型ポリペプチド生成物を固定する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ナノ粒子は常磁性のナノ粒子、超常磁性のナノ粒子、金属ナノ粒子、または無機のナノチューブを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

第 1 の選択マーカー遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの早熟な切断を防ぐように選択され、および/または複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを容易にする、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 10】

第2の選択マーカ-遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを促す、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 11】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である、請求項11に記載の方法。

10

## 【請求項 13】

修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 14】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 15】

修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む、請求項14に記載の方法。

20

## 【請求項 17】

修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 18】

修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む、請求項1、または11-17のいずれか1つに記載の方法。

30

## 【請求項 19】

突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 20】

修飾はN末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む、請求項1、または11-19のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 21】

修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである、請求項1、または14-20のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 22】

修飾されたGPCRはヒトのGPCRである、請求項1、または14-21のいずれか1つに記載の方法。

40

## 【請求項 23】

第1の選択マーカ-遺伝子と第2の選択マーカ-遺伝子は、同じである、請求項1、9、または10のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 24】

第1の選択マーカ-遺伝子と第2の選択マーカ-遺伝子は異なる、請求項1、9、または10のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 25】

第1の選択マーカ-遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活

50

性化因子あるいは転写抑制因子を含む、請求項 1、9、23、または 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 26】

第 1 の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない、請求項 1、9、23、または 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 27】

第 1 の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE 遺伝子、pyrF 遺伝子、HIS3 遺伝子、URA3 遺伝子、LYS2 遺伝子、ADE1-2 遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む、請求項 1、9、または 23-26 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 28】

第 2 の選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子を含む、請求項 1、10、23、または 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 29】

第 2 の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない、請求項 1、10、23、または 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 30】

第 2 の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE 遺伝子、pyrF 遺伝子、HIS3 遺伝子、URA3 遺伝子、LYS2 遺伝子、ADE1-2 遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む、請求項 1、10、23、24、28、または 29 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 31】

第 1 の選択マーカー遺伝子は第 1 の選択ポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 32】

第 2 の選択マーカー遺伝子は第 2 の選択ポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

第 1 の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの C 末端部分に適切に表示され、随意に、第 2 の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの N 末端部分に適切に表示されるときに、少なくとも 1 つの選択剤は、第 1 の選択ポリペプチドと随意に第 2 の選択ポリペプチドとの相互作用によって第 1 の複数の宿主細胞に対して無毒化される、請求項 1、31、または 32 に記載の方法。

40

【請求項 34】

少なくとも 1 つの選択剤は第 1 の選択剤と第 2 の選択剤を含む、請求項 1 または 33 に記載の方法。

【請求項 35】

第 1 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

第 2 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

抗生物質はアンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラ

50

サイクリンを含む、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

毒性の代謝産物は、5 - フルオロオロチン酸または 3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾールを含む、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 39】

第 1 の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 40】

第 2 の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む、請求項 34 に記載の方法。

10

【請求項 41】

工程 d) の産生ベクターは、第 1 の選択マーカー遺伝子または第 2 の選択マーカー遺伝子を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】

発現ベクターの第 1 のセットと産生ベクターはさらに、タグをコードするポリヌクレオチドを独立して含む、請求項 1 または 41 に記載の方法。

【請求項 43】

タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの N 末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの C 末端、またはこれらの組み合わせに連結している、請求項 42 に記載の方法。

20

【請求項 44】

タグは、MBP、TrxA、FLAG タグ、AVI タグ、または His Tag を含む、請求項 42 または 43 に記載の方法。

【請求項 45】

さらに、

(a) 産生ベクターの第 2 のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、請求項 1 の工程 c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 3 のポリヌクレオチドを含む、工程；

(b) 第 3 の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第 2 のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、

(c) 請求項 1 の工程 f) の治療薬に対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程 (b) の複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 46】

物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む、請求項 45 に記載の方法。

40

【請求項 47】

対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

工程 (g) の結合は、フローサイトメトリー方法、あるいは酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA) によって検知される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 49】

フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別 (MACS) あるいは蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

50

宿主細胞は、原核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、または昆虫宿主細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 1】

第 1 の複数の宿主細胞は、原核生物宿主細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

原核生物宿主細胞は大腸菌細胞である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

第 2 の複数の宿主細胞は哺乳動物宿主細胞または昆虫宿主細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングする方法であって、

(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；

(b) 発現ベクターの第 1 のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 (a) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドと、

ポリヌクレオチドの C 末端に動作可能に連結された第 1 の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドの N 末端に動作可能に連結された第 2 の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；

(c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも 1 つの選択剤の存在または不在で第 1 の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第 1 のセットを発現させる工程；

(d) 工程 (c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；

(e) 第 2 の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；

(f) 抗体またはその結合フラグメントを用いて、工程 (e) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、

(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物と抗体またはその結合フラグメントとの間の結合を検知する工程、を含む、方法。

【請求項 5 5】

抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイによって生成される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 Fab'、二価 Fab<sub>2</sub>、単鎖可変フラグメント (scFv)、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 (sdAb)、あるいはラクダ科抗体、またはこれらの結合フラグメントを含む、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された TRPV3、KCa3.1、または TRPC6 である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 (GPCR) である、請求項 5 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 6 0】**

修飾された G P C R は、修飾された C C R 7、C C R 1 0、G P R 5 5、N T R 1、E P 2、または E P 4 の受容体である、請求項 5 9 に記載の方法。

**【請求項 6 1】**

重鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 の配列と、軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列とを含む、単離および精製された抗体またはその結合フラグメントであって、

ここで、重鎖と軽鎖の C D R は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと相互作用し、および、ここで、抗体またはその結合フラグメントは以下のプロセス：

( a ) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；

( b ) 発現ベクターの第 1 のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 ( a ) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドと、

ポリヌクレオチドの C 末端に動作可能に連結された第 1 の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドの N 末端に動作可能に連結された第 2 の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；

( c ) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも 1 つの選択剤の存在または不在で第 1 の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第 1 のセットを発現させる工程；

( d ) 工程 ( c ) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；

( e ) 第 2 の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；

( f ) 抗体のセットまたはその結合フラグメントを用いて、工程 ( e ) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、

( g ) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物に特異的に結合する抗体またはその結合フラグメントを選択する工程、

によって生成される、単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

**【請求項 6 2】**

抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される、請求項 6 1 に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

**【請求項 6 3】**

抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F a b '、二価 F a b 2、単鎖可変フラグメント ( s c F v )、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 ( s d A b )、あるいはラクダ科抗体、またはこれらの結合フラグメントを含む、請求項 6 1 または 6 2 に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

**【請求項 6 4】**

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である、請求項 6 1 に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

**【請求項 6 5】**

修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された T R P V 3、K C a 3 . 1、または T R P C 6 である、請求項 6 4 に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

**【請求項 6 6】**

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 ( G P C

10

20

30

40

50

R)である、請求項61に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

【請求項67】

修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である、請求項66に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメント。

【請求項68】

請求項61-67に記載の単離および精製された抗体またはその結合フラグメントを含むワクチン。

【請求項69】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチド、または、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンであって、

ここで、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、以下のプロセス：

(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；

(b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、

ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ遺伝子と、

随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ遺伝子とを含む、工程；

(c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；

(d) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；

(e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、

(f) ワクチンの生成のために物理化学的性質が増強または改善した安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドを決定するための分析方法によって工程(e)の発現ベクターの第2のセットから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程、  
によって生成される、ワクチン。

【請求項70】

物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む、請求項69に記載のワクチン。

【請求項71】

対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む、請求項69に記載のワクチン。

【請求項72】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である、請求項69に記載のワクチン。

【請求項73】

修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である、請求項72に記載のワクチン。

【請求項74】

10

20

30

40

50

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 (GPCR) である、請求項 69 に記載のワクチン。

【請求項 75】

修飾された GPCR は、修飾された CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、または EP4 の受容体である、請求項 74 に記載のワクチン。

【請求項 76】

アジュバントをさらに含む、請求項 68 - 75 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【請求項 77】

アジュバントは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を含む、請求項 76 に記載のワクチン。

【請求項 78】

式 (I) の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドであって、

【化 1】



### 式 I

式中、

MSMP は少なくとも 1 つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、

SP1 は MSMP の C 末端に連結された第 1 の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1 は第 1 の選択剤に対して耐性を有し、

SP2 は MSMP の N 末端に連結された第 2 の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2 は第 2 の選択剤に対して耐性を有し、

L1 は第 1 のリンカーであり、

L2 は第 2 のリンカーであり、

x は独立して 0 - 3 であり、

y は独立して 1 - 5 であり、

z は独立して 1 - 3 であり、および、

m と n は各々独立して 0 - 60 のアミノ酸残基である、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド。

【請求項 79】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む、請求項 78 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 80】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である、請求項 78 または 79 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 81】

修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された TRPV3、KCa3.1、または TRPC6 である、請求項 80 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 82】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 (GPCR) である、請求項 78 または 79 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 83】

修飾された GPCR は、修飾された CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、または EP4 の受容体である、請求項 82 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 84】

10

20

30

40

50

修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む、請求項82に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項85】

修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む、請求項82に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項86】

少なくとも1つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される、請求項78 - 85のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

10

【請求項87】

少なくとも1つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む、請求項78 - 86のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項88】

突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む、請求項87に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項89】

少なくとも1つの修飾は、N末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む、請求項78 - 88のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

20

【請求項90】

修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである、請求項82 - 89のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項91】

修飾されたGPCRはヒトのGPCRである、請求項82 - 90のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項92】

SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項93】

SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

30

【請求項94】

SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある、請求項78または92に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項95】

SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある、請求項78または93に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項96】

SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある、請求項78または92 - 95のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

40

【請求項97】

第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子によってコードされる、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項98】

第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項99】

50

第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである、請求項78、97、または98のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項100】

第2の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子によってコードされる、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

10

【請求項101】

第2の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項102】

第2の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである、請求項78、100、または101に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

20

【請求項103】

SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>2-3</sub>であり、各SP1は他とは異なる、請求項78、92、94、または96-99のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項104】

SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>2-3</sub>であり、各SP2は他とは異なる、請求項78、93、95、96、または100-102のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項105】

第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

30

【請求項106】

第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項107】

抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む、請求項78、105、または106のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

40

【請求項108】

毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む、請求項78、105、または106のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項109】

第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項110】

第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む、請求項78に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

50

## 【請求項 1 1 1】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む、請求項 7 8 - 1 1 0 のいずれか 1 つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

## 【請求項 1 1 2】

タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの N 末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの C 末端、またはこれらの組み合わせに連結している、請求項 1 1 1 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

## 【請求項 1 1 3】

タグは、M B P、T r x A、F L A G タグ、A V I タグ、または H i s T a g を含む、請求項 1 1 1 または 1 1 2 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

10

## 【請求項 1 1 4】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式 ( I a ) の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含み、

## 【化 2】



## 式 Ia

式中、

20

M S M P は少なくとも 1 つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、

S P 1 は M S M P の C 末端に連結された第 1 の選択ポリペプチドであり、ここで、S P 1 は第 1 の選択剤に対して耐性を有し、

S P 2 は M S M P の N 末端に連結された第 2 の選択ポリペプチドであり、ここで、S P 2 は第 2 の選択剤に対して耐性を有し、

L 1 は第 1 のリンカーであり、

L 2 は第 2 のリンカーであり、および、

m と n は各々独立して 0 - 6 0 のアミノ酸残基である、請求項 7 8 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

## 【請求項 1 1 5】

30

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式 ( I I ) の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

## 【化 3】



## 式 II

式中、

40

R P はイオンチャネルポリペプチドまたは G P C R から選択された受容体ポリペプチドであり、ここで、R P は少なくとも 1 つの修飾を含み、

S P 1 は R P の C 末端に連結された第 1 の選択ポリペプチドであり、ここで、S P 1 は第 1 の選択剤に対して耐性を有し、

S P 2 は R P の N 末端に連結された第 2 の選択ポリペプチドであり、ここで、S P 2 は第 2 の選択剤に対して耐性を有し、

L 1 は第 1 のリンカーであり、

L 2 は第 2 のリンカーであり、

x は独立して 0 - 3 であり、

y は独立して 1 - 5 であり、

z は独立して 1 - 3 であり、および、

m と n は各々独立して 0 - 6 0 のアミノ酸残基である、請求項 7 8 に記載の修飾された複

50

数膜貫通型タンパク質。

【請求項 116】

イオンチャネルポリペプチドは、電位依存性イオンチャネルポリペプチドまたは一時的な受容器電位チャネルポリペプチドである、請求項 115 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 117】

イオンチャネルポリペプチドは、TRPV3、KCa3.1、またはTRPC6を含む、請求項 116 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 118】

GPCRは、CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体を含む、請求項 116 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。 10

【請求項 119】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(III)の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

【化 4】



式 III

20

式中、

GPCRは少なくとも1つの修飾を含むGPCRであり、

SP1は、GPCRのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、第1の選択剤に対して耐性を有し、

SP2は、GPCRのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にあり、第2の選択剤に対して耐性を有し、

L1は第1のリンカーであり、

L2は第2のリンカーであり、

xは独立して0-3であり、

yは独立して1-5であり、

zは独立して1-3であり、および、

mとnは各々独立して0-60のアミノ酸残基である、請求項 115 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。 30

【請求項 120】

GPCRは哺乳動物のGPCRである、請求項 119 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 121】

GPCRはヒトのGPCRである、請求項 119 または 120 に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。 40

【請求項 122】

GPCRは、CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体を含む、請求項 119 - 121 のいずれか1つに記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

【請求項 123】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(IV)の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

## 【化5】



## 式 IV

式中、

ICPは少なくとも1つの修飾を含むイオンチャネルポリペプチドであり、  
 SP1はICPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は  
 第1の選択剤に対して耐性を有し、  
 SP2はICPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は  
 第2の選択剤に対して耐性を有し、  
 L1は第1のリンカーであり、  
 L2は第2のリンカーであり、  
 xは独立して0-3であり、  
 yは独立して1-5であり、  
 zは独立して1-3であり、および、  
 mとnは各々独立して0-60のアミノ酸残基である、請求項115に記載の修飾された  
 複数膜貫通型タンパク質。

10

## 【請求項124】

20

イオンチャネルポリペプチドは、TRPV3、KCa3.1、またはTRPC6を含む  
 、請求項123に記載の修飾された複数膜貫通型タンパク質。

## 【請求項125】

請求項78-124の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするベクター。

## 【請求項126】

請求項78-124の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを発現する宿主細胞と細胞  
 培養培地とを含む細胞培養組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

30

本出願は、2016年5月4日に出願された米国仮特許出願第62/331,628号  
 の利益を主張し、該出願は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

## 配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、参照により全体として本明細  
 書に組み込まれる配列表を含んでいる。2017年5月3日に作成された上記のASCII  
 Iのコピーは、50247-702\_\_601\_\_SL.txtのファイル名であり、5,8  
 82バイトのサイズである。

## 【背景技術】

## 【0003】

40

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は複数膜貫通型タンパク質のメンバーであり、  
 GPCRスーパーファミリーは約800のヒトGPCRメンバーを含む。それぞれのリガ  
 ンドによるGPCRの活性化は、細胞内の複数のシグナル伝達プロセスのカスケードを開  
 始し、例えば、細胞の成長、代謝、および他の本質的な細胞の機能を調節する。これらの  
 GPCRの調節異常と異常な発現、およびその後のシグナル伝達カスケードは、様々なタ  
 イプの疾患の病状に関連付けられる。

## 【発明の概要】

## 【0004】

ある実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットが本明細書に開示されている。いくつかの例

50

では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャネルポリペプチドである。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはGPCRである。いくつかの例では、修飾されたイオンチャネルポリペプチドを含む方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットが本明細書に記載される。さらなる例では、修飾されたGPCRを含む方法、プラットフォーム、抗体、ワクチン、構築物、およびキットが本明細書に記載される。

【0005】

ある実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して治療薬をスクリーニングする方法が本明細書に開示され、該方法は、(a)無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b)発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む工程；(c)安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(d)工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；(e)第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；(f)治療薬を用いて、工程(e)の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、(g)複数膜貫通型ポリペプチド生成物と治療薬との間の結合を検知する工程、を含む。いくつかの実施形態において、治療薬は小分子またはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、小分子は薬物または小分子フラグメントである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab2、単鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ(dibody)、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、あるいはラグダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイ法または酵母ディスプレイ法によって生成される。いくつかの実施形態において、工程f)のインキュベートする工程は、治療薬を用いてインキュベートする前に、ナノ粒子上の複数膜貫通型ポリペプチド生成物を固定する工程を含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子、超常磁性のナノ粒子、金属ナノ粒子、または無機のナノチューブを含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの早熟な切断(pre-mature truncations)を防ぐように選択され、および/または複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを容易にする。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを促す。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10

10

20

30

40

50

、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、修飾はN末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子と第2の選択マーカー遺伝子は、同じである。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子と第2の選択マーカー遺伝子は異なる。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は第1の選択ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は第2の選択ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端部分に適切に表示され、随意に、第2の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端部分に適切に表示されるときに、少なくとも1つの選択剤は、第1の選択ポリペプチドと随意に第2の選択ポリペプチドとの相互作用によって第1の複数の宿主細胞に対して無毒化される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの選択剤は第1の選択剤と第2の選択剤を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質はアンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、工程d)の産生ベクターは、第1の選択マーカー遺伝子または第2の選択マーカー遺伝子を含まない。いくつかの実施形態において、発現ベクターの第1のセットと産生ベクターはさらに、タグをコードするポリヌクレオチドを独立して含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに

連結している。いくつかの実施形態において、タグは、M B P、T r x A、F L A Gタグ、A V Iタグ、またはH i s T a gを含む。いくつかの実施形態では、該方法はさらに、( a ) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、上に議論された方法の工程 c ) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；( b ) 第3の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、( c ) 上に議論された方法の工程 f ) の治療薬に対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程 ( b ) の複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの実施形態において、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの実施形態において、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、工程 ( g ) の結合は、フローサイトメトリー方法、あるいは酵素結合免疫吸着定量法 ( E L I S A ) によって検知される。いくつかの実施形態において、フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別 ( M A C S ) あるいは蛍光活性化細胞選別 ( F A C S ) を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、または昆虫宿主細胞である。いくつかの実施形態では、第1の複数の宿主細胞は、原核生物宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、原核生物宿主細胞は大腸菌細胞である。いくつかの実施形態において、第2の複数の宿主細胞は哺乳動物宿主細胞または昆虫宿主細胞を含む。

10

20

#### 【 0 0 0 6 】

ある実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングする方法が本明細書に開示され、該方法は、( a ) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；( b ) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 ( a ) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；( c ) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；( d ) 工程 ( c ) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；( e ) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；( f ) 抗体またはその結合フラグメントを用いて、工程 ( e ) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、( g ) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物と抗体またはその結合フラグメントとの間の結合を検知する工程、を含む。いくつかの実施形態において、工程 f ) のインキュベートする工程は、治療薬を用いてインキュベートする前に、ナノ粒子上の複数膜貫通型ポリペプチド生成物を固定する工程を含む。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子、超常磁性のナノ粒子、金属ナノ粒子、または無機のナノチューブを含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの早熟な切断 ( p r e m a t u r e t r u n c a t i o n s ) を防ぐように選択され、および/または複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを容易にする。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを促す。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンバ

30

40

50

ク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab<sub>2</sub>、単鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ(diabody)、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、修飾はN末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子と第2の選択マーカー遺伝子は、同じである。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子と第2の選択マーカー遺伝子は異なる。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、  
-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質をコードしない。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、  
-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は第1の選択ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、第2の選択マーカー遺伝子は第2の選択ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端部分に適切に表示され、随意に、第2の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端部分に適切に表示されるときに、少なくとも1つの選択剤は、第1の選択ポリペプチドと随意に第2の選択ポリペプチドとの相互作用によって第1の複数の

10

20

30

40

50

宿主細胞に対して無毒化される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの選択剤は第1の選択剤と第2の選択剤を含む。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質はアンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、工程d)の発現ベクターは、第1の選択マーカ-遺伝子または第2の選択マーカ-遺伝子を含まない。いくつかの実施形態において、発現ベクターの第1のセットと発現ベクターはさらに、タグをコードするポリヌクレオチドを独立して含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、MBP、TrxA、FLAGタグ、AVIタグ、またはHisTagを含む。いくつかの実施形態では、該方法はさらに、(a)産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、上に議論された方法の工程c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(b)第3の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(c)上に議論された方法の工程f)の治療薬に対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程(b)の複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの実施形態において、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの実施形態において、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、工程(g)の結合は、フローサイトメトリー方法、あるいは酵素結合免疫吸着定量法(ELISA)によって検知される。いくつかの実施形態において、フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別(MACS)あるいは蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、または昆虫宿主細胞である。いくつかの実施形態では、第1の複数の宿主細胞は、原核生物宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、原核生物宿主細胞は大腸菌細胞である。いくつかの実施形態において、第2の複数の宿主細胞は哺乳動物宿主細胞または昆虫宿主細胞を含む。

#### 【0007】

ある実施形態では、重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3の配列と、軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列とを含む、単離および精製された抗体またはその結合フラグメントが本明細書に開示され、ここで、重鎖と軽鎖のCDRは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと相互作用し、および、ここで、抗体またはその結合フラグメントは以下のプロセスによって生成される：(a)無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b)発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ-遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ-遺伝子とを含む、工程；(c)

) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(d) 工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；(e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；(f) 抗体のセットまたはその結合フラグメントを用いて、工程(e)の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物に特異的に結合する抗体またはその結合フラグメントを選択する工程、を含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab2、単鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ(dibody)、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。

10

20

#### 【0008】

ある実施形態では、上に記載された、単離および精製された抗体またはその結合フラグメントを含むワクチンが本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの実施形態において、アジュバントは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含む。

#### 【0009】

ある実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド、または、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンが本明細書で開示され、ここで、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは以下のプロセスによって生成される：(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ―遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ―遺伝子とを含む、工程；(c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(d) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(f) ワクチンの生成のために物理化学的性質が増強または改善した安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドを決定するための分析方法によって工程(e)の発現ベクターの第2のセットから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの実施形態において、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路

30

40

50

活性化選択性を含む。いくつかの実施形態において、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの実施形態では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの実施形態において、アジュバントは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含む。

【0010】

ある実施形態において、式(I)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドが本明細書で開示され：

【0011】

【化1】



### 式 I

式中、

MSMPは少なくとも1つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、

SP1はMSMPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は第1の選択剤に対して耐性を有し、

SP2はMSMPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は第2の選択剤に対して耐性を有し、

L1は第1のリンカーであり、

L2は第2のリンカーであり、

xは独立して0-3であり、

yは独立して1-5であり、

zは独立して1-3であり、および、

mとnは各々独立して0-60のアミノ酸残基である。

【0012】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス

突然変異を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は、N末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。いくつかの実施形態において、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの実施形態において、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの実施形態において、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある。いくつかの実施形態において、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの実施形態において、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、または転写活性化因子あるいは転写抑制因子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。いくつかの実施形態において、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>2-3</sub>であり、各SP1は他とは異なる。いくつかの実施形態において、SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>2-3</sub>であり、各SP2は他とは異なる。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、MBP、TrxA、FLAGタグ、AVIタグ、またはHisTagを含む。

10

20

30

40

【0013】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(Ia)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含み、

【0014】

## 【化2】

SP2-L2<sub>m</sub>-MSMP-L1<sub>n</sub>-SP1

## 式 Ia

式中、

MSMPは少なくとも1つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、  
 SP1はMSMPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は第1の選択剤に対して耐性を有し、  
 SP2はMSMPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は第2の選択剤に対して耐性を有し、  
 L1は第1のリンカーであり、  
 L2は第2のリンカーであり、および、  
 mとnは各々独立して0 - 60のアミノ酸残基である。

10

## 【0015】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(I I)の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

## 【0016】

## 【化3】

20

SP2<sub>x</sub>-L2<sub>m</sub>-RP<sub>y</sub>-L1<sub>n</sub>-SP1<sub>z</sub>

## 式 II

式中、

RPはイオンチャネルポリペプチドまたはGPCRから選択された受容体ポリペプチドであり、ここで、RPは少なくとも1つの修飾を含み、  
 SP1はRPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は第1の選択剤に対して耐性を有し、  
 SP2はRPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は第2の選択剤に対して耐性を有し、  
 L1は第1のリンカーであり、  
 L2は第2のリンカーであり、  
 xは独立して0 - 3であり、  
 yは独立して1 - 5であり、  
 zは独立して1 - 3であり、および、  
 mとnは各々独立して0 - 60のアミノ酸残基である。

30

## 【0017】

いくつかの実施形態において、イオンチャネルポリペプチドは、電位依存性イオンチャネルポリペプチドまたは一時的な受容器電位チャネルポリペプチドである。いくつかの実施形態において、イオンチャネルポリペプチドは、TRPV3、KCa3.1、またはTRPC6を含む。いくつかの実施形態において、GPCRは、CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体を含む。

40

## 【0018】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(I I I)の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

## 【0019】

## 【化4】



## 式 III

式中、

GPCRは少なくとも1つの修飾を含むGPCRであり、

SP1は、GPCRのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、第1の選択剤に対して耐性を有し、

SP2は、GPCRのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にあり、第2の選択剤に対して耐性を有し、

L1は第1のリンカーであり、

L2は第2のリンカーであり、

xは独立して0 - 3であり、

yは独立して1 - 5であり、

zは独立して1 - 3であり、および、

mとnは各々独立して0 - 60のアミノ酸残基である。

## 【0020】

いくつかの実施形態において、GPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、GPCRはヒトのGPCRである。いくつかの実施形態において、GPCRは、CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体を含む。

## 【0021】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに、式(I V)の修飾された受容体ポリペプチドを含み、

## 【0022】

## 【化5】



## 式 IV

式中、

ICPは少なくとも1つの修飾を含むイオンチャンネルポリペプチドであり、

SP1はICPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は第1の選択剤に対して耐性を有し、

SP2はICPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2は第2の選択剤に対して耐性を有し、

L1は第1のリンカーであり、

L2は第2のリンカーであり、

xは独立して0 - 3であり、

yは独立して1 - 5であり、

zは独立して1 - 3であり、および、

mとnは各々独立して0 - 60のアミノ酸残基である。

## 【0023】

いくつかの実施形態において、イオンチャンネルポリペプチドは、TRPV3、KCa3.1、またはTRPC6を含む。

## 【0024】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、上記の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするベクターが本明細書に開示される。

【0025】

ある実施形態では、上記の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを発現する宿主細胞と細胞培養培地とを含む細胞培養組成物が本明細書に開示される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

本開示の様々な態様はとりわけ添付の請求項で説明されている。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が用いられる実施形態を説明する以下の詳細な説明と、以下の添付図面とを引用することによって得られるであろう。

【図1】物理化学的性質が増強または改善された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成するための本明細書に記載されたプラットフォームの概念的な概略図を例証する。

【図2】野生型の膜受容体とその増強された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのウェスタンブロットを示す（本明細書では「使用可能な膜タンパク質（Enabled Membrane Protein）」または「EMP」とも呼ばれる）。FLAGタグ付けされた融合修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの染色を、抗FLAG HRP結合抗体を用いて行った。タンパク質マーカはkDaでの分子量を示す。

【図3】1ラウンドの突然変異誘発後に複雑なタンパク質-洗浄薬複合体中の精製された膜受容体上で蛍光性のサイズ排除クロマトグラフィー（fSEC）を使用して測定された熱的変性曲線を例証する。野生型の受容体は閉じた円で示され、安定した突然変異体は三角形で示される。

【図4】精製された野生型の（黒い痕跡）膜受容体と5つの突然変異体複数膜貫通型ポリペプチドの正規化されたfSECピークを例証する。分析された複数膜貫通型ポリペプチド（分析されたサンプルの予想されるオリゴマーの状態）の単量体と2量体に対応するピークは、黒い矢で示される。

【図5A】サンプル精製工程の略図を例証する。

【図5B】IMAC精製工程後のGPCRサンプル（WTとEMP 004と005）のHPLCプロファイルを使用して、サンプルの均質性を示す。

【図5C】図5Bで示されるのと同じサンプル、つまり、WTとEMP 004と005の収率を比較する。

【図5D】高い塩緩衝液条件下でのCPMアッセイを使用して得られたGPCRサンプル（WTとEMP 001、002、および003）の正規化された融解プロファイルを例証する。

【図6A】SPRを使用して結合データを示す。両方のセンサーグラム（sensorgrams）は、EMP 005サンプルの結合特性を例証する。

【図6B】SPRを使用して結合データを示す。両方のセンサーグラム（sensorgrams）は、EMP 005サンプルの結合特性を例証する。

【図6C】EMP 005品質と結合動力学を決定するために小分子化合物を使用して動力学データを示す。

【図7】WT受容体でトランスフェクトされたHeLa細胞に対してGPR55 EMP-012 DNAと精製されたタンパク質とで免疫したC57BL/6マウスから得られた蛍光標識されたポリクロナル力価のFACSデータを例証する。矢印で示されるような右のパネルは：陰性対照（a）、DNA免疫化の3週間後（b）、DNAの第1の追加免疫（boosting）（c）、DNAの第2の追加免疫（boosting）（d）、精製されたタンパク質追加免疫（boosting）（e）を示す。免疫処置作業は、In-Cell-Art（Nantes, France）でNanoTaxi（登録商標）を使用して行われた。示されたデータは2匹の代表的な動物由来のものである。無関係なGPCR（左のパネル）またはWT-GPR55（右のパネル）でトランスフェクトされたHeLa細胞を使用する、GPR55 EMP-012で免疫化した動物からの血清のFACS分析。

10

20

30

40

50

【図8】ELISAフォーマットでのWTケモカイン受容体に特異的な抗体の結合を試験するために使用された精製されたケモカイン受容体EMP004を例証する。2つのタイプのEMP受容体捕獲を試験した：凍結融解事象の前( )と後( )であり、それらは同一の信号を示す。EMP004精製受容体はHISタグを使用して捕らえられた。

【図9】GPCR-GPR55 WT (SEQ ID NO: 1)の原発性のアミノ酸配列を示す。

【図10】GPCR-GPR55-EMP-012 (SEQ ID NO: 2)の原発性のアミノ酸配列を示す。強調された残留物は野生型のGPR55配列に関連する突然変異位置を表示する。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

複数膜貫通型タンパク質は、細胞の細胞外環境と細胞内環境との間の結合をもたらすことから、細胞性膜の必須の成分である。いくつかの例では、複数膜貫通型タンパク質は、プロテオームの約30%を構成し、多くの細胞プロセスと生理的なプロセスにとって重要である。いくつかの例では、複数膜貫通型タンパク質は多くの病態(例えば、内分泌疾患または癌)にも関連付けられている。さらに、例えば、市場の現在の医薬品の約60%は複数膜貫通型タンパク質と相互に作用するか、あるいは複数膜貫通型タンパク質を調節する。

【0028】

いくつかの例では、複数膜貫通型タンパク質の脂質相互作用表面は高疎水性であり、膜二重層環境を模倣する洗浄薬または両親媒性分子の使用を必要とするため、複数膜貫通型タンパク質を用いる実験作業には問題がある。さらに、複数膜貫通型タンパク質は、高い配座柔軟性、低い安定性、および/または低い発現レベルを含む。さらに、例えば、実験作業中の複数膜貫通型タンパク質の取り扱いはいくつか、複数膜貫通型タンパク質の変性、不活性化、および/または分解を引き起こす。

20

【0029】

いくつかの実施形態において、実験作業中の取り扱いのために特性(例えば、物理化学的性質)を改善した複数膜貫通型タンパク質(または修飾された複数膜貫通型ポリペプチド)を生成するための方法とプラットフォームが本明細書に記載されている。いくつかの例では、上記の方法とプラットフォームは、無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、上記のライブラリーから修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；および、安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；を含む。

30

【0030】

いくつかの実施形態において、治療薬(例えば、抗体または小分子などのポリペプチド)をスクリーニングする方法が本明細書に記載されている。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して治療薬をスクリーニングする方法は、(a)無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；b)発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーから修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；(c)安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程

40

50

; (d) 工程 (c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程; (e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程; (f) 治療薬を用いて、工程 (e) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程; および、(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物と治療薬との間の結合を検知する工程、を含む。

【0031】

他の実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドから生成されるワクチン (例えば、抗体ベースのワクチン、核酸ベースのワクチン、またはポリペプチドベースのワクチン) が本明細書に記載されている。いくつかの例では、ワクチンは抗体ベースのワクチンである。他の例では、ワクチンはポリペプチドベースのワクチンまたは核酸ベースのワクチンであり、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、以下のプロセスによって生成される: (a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程; (b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 (a) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ-遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ-遺伝子とを含む、工程; (c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在下で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程; (d) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、工程 (c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程; (e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程; および、(f) ワクチンの生成のために物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程 (e) の産生ベクターの第2のセットから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程。

【0032】

さらなる実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して選択された抗体組成物が本明細書に記載される。いくつかの例では、本明細書に記載される単離および精製された抗体またはその結合フラグメントは、重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3の配列と、軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列とを含み、ここで、重鎖と軽鎖のCDRは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと相互作用し、および、ここで、抗体またはその結合フラグメントは以下のプロセスによって生成される: (a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程; (b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 (a) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ-遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ-遺伝子とを含む、工程; (c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在下で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程; (d) 工程 (c) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程; (e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程; (f) 抗体のセットまたはその結合フラグメントを用いて、工程 (e) の産生ベクターから生成された複

数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、(g)複数膜貫通型ポリペプチド生成物に特異的に結合する抗体またはその結合フラグメントを選択する工程。

【0033】

さらなる実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド構築物（例えば、式 I - IV の修飾された複数膜貫通型ポリペプチド）と、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド構築物、精製された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド、本明細書に記載される抗体、あるいは本明細書に記載されるワクチンを含むキットも本明細書に記載されている。

【0034】

複数膜貫通型ポリペプチド

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成するためのプラットフォームが本明細書で開示される。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成する方法も本明細書に含まれている。いくつかの実施形態において、複数膜貫通型ポリペプチドは完全長の膜タンパク質またはそのフラグメントを含む。いくつかの例では、複数膜貫通型ポリペプチドフラグメントは生物学的に活性なポリペプチドフラグメントである。いくつかの例では、生物学的に活性なポリペプチドフラグメントは、機能的に活性なポリペプチドフラグメント、構造上安定した（例えば、熱的に安定したまたは pH の安定した）ポリペプチドフラグメント、あるいはこれらの組み合わせである。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドは、内在性膜タンパク質、表在性膜タンパク質、またはポリペプチド毒素を含む。場合によっては、内在性膜タンパク質は、内在性ポリトピックタンパク質（integral polytopic protein）または膜貫通型タンパク質）、または内在性モノトピックタンパク質にさらに分類される。いくつかの例では、内在性ポリトピックタンパク質は、少なくとも一度膜を貫通し、かつ 2 つの三次構造クラス：ヘリックス束タンパク質またはベータバレルタンパク質に分類される、膜タンパク質である。いくつかの例では、内在性モノトピックタンパク質は、膜の 1 つの側にのみ結合し、脂質二分子膜を貫通しない膜タンパク質である。

【0035】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは原形質膜タンパク質を含む。場合によっては、原形質膜タンパク質は、細胞の原形質膜あるいは最外層に留まる膜タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは核膜タンパク質を含む。場合によっては、核膜タンパク質は、核エンベロープの膜と結合するか、該膜に留められる膜タンパク質を含む。場合によっては、核膜タンパク質はさらに、例えば、ラミン B 受容体（LBR）、ラミナ結合（lamina-associated）ポリペプチド 1（LAP1）、ラミナ結合（lamina-associated）ポリペプチド - 2（LAP2）、エメリン、および MAN1（LEMドメイン含有タンパク質 3 または LEMD3）などの核膜内タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは表在性膜タンパク質を含む。場合によっては、表在性膜タンパク質は、生体膜に一時的にのみ付着する膜タンパク質を含む。例えば、内在性膜タンパク質と相互に作用するか、脂質二重層の末梢領域に浸透する膜タンパク質は、しばしば、表在性膜タンパク質と呼ばれる。加えて、イオンチャネルあるいは膜貫通型受容体の調節サブユニットはしばしば表在性膜タンパク質と呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、細胞内膜タンパク質（例えば、ミトコンドリア膜タンパク質）を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは輸送体を含む。場合によっては、輸送体は、膜貫通性ポンプ、エスコートタンパク質、酸輸送タンパク質、陽イオン輸送タンパク質、あるいは陰イオン輸送タンパク質を含む。場合によっては、輸送体はさらに担体タンパク質と呼ばれる。担体タンパク質は、生体膜にわたってイオン、小分子、または高分子（例えばタンパク質）を渡すタンパク

10

20

30

40

50

質である。いくつかの例では、担体タンパク質は小胞輸送タンパク質である。小胞輸送タンパク質は生体膜全体で小胞輸送を促進する膜貫通型タンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはチャンネルタンパク質を含む。場合によっては、チャンネルタンパク質は、イオンまたは小分子などの溶質が輸送される脂質二重層全体に伸びる水性の気孔を形成するタンパク質を含む。いくつかの例では、チャンネルタンパク質はイオンチャンネルタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはアドヘシンを含む。場合によっては、アドヘシンは、所望の細胞または表面に付着する微生物細胞表面タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはトランスロカーゼを含む。場合によっては、トランスロカーゼは、いくつかの例では、生体膜全体に別の分子を輸送するのを支援するタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは受容体を含む。いくつかの例では、受容体は、4つのカテゴリーへさらに細分される：1型受容体またはイオンチャンネル型受容体；2型受容体またはGタンパク質共役受容体；3型受容体またはキナーゼ結合および関連受容体；ならびに、4型受容体または核受容体。いくつかの例では、受容体は、1型受容体またはイオンチャンネル型受容体（例えば、イオンチャンネルタンパク質のサブグループを含む）である。いくつかの例では、受容体は2型受容体またはGタンパク質共役受容体である。いくつかの例では、受容体は3型受容体またはキナーゼ結合および関連受容体である。いくつかの例では、受容体は4型受容体または核受容体である。

10

#### 【0036】

20

#### Gタンパク質共役受容体

7回膜貫通型ドメイン受容体、7TM受容体、ヘプタヘリカル（heptahelical）受容体、セルペンチン受容体、またはGタンパク質結合受容体（GPLR）としても知られているGタンパク質共役受容体（GPCR）は、輸送体オブシンGタンパク質共役受容体（TOG）スーパーファミリー下の受容体のGPCRファミリーを形成する。GPCRアーキテクチャーは、細胞外のN末端部分と、エキソループ（exoloops）（EL-1~EL-3）とサイトループ（cytoloops）（IL-1~IL-3）の3つのセットによって連続して接続された7回膜貫通型（TM）コアと、細胞内C末端尾部とを含む。場合によっては、C末端尾部がシステイン残留物でさらにバルミトイル化するとき、第4の細胞質のループは形成される。リガンド結合（例えば、イオン、タンパク質、脂質、ホルモン、神経伝達物質、アミン、ヌクレオチド、嗅覚分子、または光子との相互作用）に際して、GPCRは構造変化を受け、その後、これは、Gタンパク質（あるいはグアニンヌクレオチド結合タンパク質）を活性化し、例えば、Gタンパク質のサブユニットのそのとのサブユニットからの解離を引き起こし、それにより下流のシグナル伝達活性化のカスケードを開始する。場合によっては、細胞内シグナル伝達タンパク質および/または標的機能タンパク質は、Gタンパク質のサブユニットタイプ（例えば、Gq/11、G12/13、Gi/o（G抑制的、その他のG）、およびGs（G刺激的）によって調節される。しばしば、GPCRは襟鞭毛虫と酵母を含む真核生物で観察される。

30

#### 【0037】

40

いくつかの実施形態において、GPCRは、配列相同性と機能的な類似性に基づいて6つのクラスにさらに分類される。場合によっては、6つのクラスは、クラスA（または1；ロドプシン様）GPCR、クラスB（または2；セクレチン受容体ファミリー）GPCR、クラスC（または3；代謝型グルタミン酸/フェロモン）GPCR、クラスD（または4；真菌交配型（fungal mating）フェロモン受容体）GPCR、クラスE（または5；環状AMP受容体）GPCR、およびクラスF（または6；Frizzled/Smoothened受容体）GPCRである。

#### 【0038】

クラスAのGPCR（またはクラス1）は、約800のメンバーを含むGPCRの最大のグループである。いくつかの例では、ロドプシン様GPCRは、ホルモン、神経伝達物

50

質、および光受容体を含む。さらなる例では、ロドプシン様GPCRはさらに、19のサブグループ、サブファミリーA1-A19に分類される。典型的なクラスA(ロドプシン様)GPCRとしては、限定されないが、アミン作動性：アセチルコリン(ムスカリン性アセチルコリン受容体M1、M2、M3、M4、およびM5)、アドレナリン作動性(アルファ1A、アルファ1B、アルファ1D、アルファ2A、アルファ2B、アルファ2C-1、ベータ-1、ベータ-2、ベータ-3)、ドーパミン(D(1A)、D(1B)、D(2)、D(3)、D(4))、ヒスタミン(H1、H2、H3、H4)、セロトニン(5-HT-1A、5-HT-1B、5-HT-1D、5-HT-1E、5-HT-1F、5-HT-2A、5-HT-2B、5-HT-2C、5-HT-4、5-HT-5A、5-HT-6、5-HT-7)、カンナビノイド(CB1、CB2)、糖タンパク質ホルモン(濾胞刺激ホルモン受容体(FSH-R)、GPR24メラニン凝集ホルモン受容体、ルトロピン絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体(LSH-R)、GPCR0459メラニン凝集ホルモン受容体2(MCH2)、サイトロロピン受容体(TSH-R))、脂質(エイコサノイド(ロイコトリエン(LTB(ロイコトリエンB4受容体(aka P2Y プリン受容体7、P2Y7)、ロイコトリエンB4受容体(aka Fishboy Gタンパク質共役型受容体)、および、LTC(システイニルロイコトリエン受容体CysLT2)、システイニルロイコトリエン受容体(CYSLT1)、プロスタノイド(CRTH2(GPR44)、プロスタサイクリン受容体(プロスタノイドIP受容体)、プロスタグランジンD2受容体(プロスタノイドDP受容体)、プロスタグランジンE2受容体EP1サブタイプ(プロスタノイドEP1受容体)、プロスタグランジンE2受容体EP2サブタイプ(プロスタノイドEP2受容体)、プロスタグランジンE2受容体EP3サブタイプ(プロスタノイドEP3受容体)、プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体)、プロスタグランジンF2受容体(プロスタノイドFP受容体)、トロンボキサンA2受容体(TXA2-R)(プロスタノイドTP受容体)、リゾスフィンゴ脂質(lysophingolipid)(EDG-4、EDG-1、EDG6、EDG-7、EDG-2、EDG-3、EDG5、EDG-8)、スフィンゴシルホスホリルコリン(OGR1)、リゾホスファチジルコリン(G2A))、メラトニン(H9、MEL-1A-R、MEL-1B-R))、ヌクレオチド(P2Y12血小板ADP受容体)、アデノシン(A1、A2A、A2B、A3)(ヌクレオシド-砂糖 K1AA0001、UDPグルコース)、P2U(P2U1、P2Y2、P2Y1、P2Y11、P2Y6)、嗅覚(OR1A2、OR1A1、嗅覚受容体17-90、OR17-24、6M1-16\*01/02/03、6M1-18\*01/02、6M1-4P\*02/05、嗅覚受容体89、AC006271、AF143328、AL096770-01、AL096770-02、AL096770-03、AL096770-04、AL121944、AL135841、BC62940\_\_2、BC85395\_\_1、BC85395\_\_3、F20569\_\_1、F20722\_\_1、F20722\_\_2、FAT11、GPR1、GRIR-1、OR17-4、HGMP07I、HGMP07J、HI7、HOR'5ベータ、HOR'5ベータ、HOR3'ベータ1、HPFH1OR、HS6M1-1、HS6M1-3、HS6M1-6、HSA1、HSA10、HSA3、HSA5、HSA8、OR16-35、H\_\_DJ0855D21.1、H\_\_DJ0988G15.2、JCG2、OLF1、OLF3、OLF4、OLFR42B、OLFR42B、OLRCC15、OR1-25、OR1-26、OR10A1、OR17-201、OR17-209、OR17-210、OR17-219、OR17-228、OR17-30、OR17-40、OR2C1、OR2D2、OR5-40、OR5D3、OR5F1、OR6A1、OR7-138、R30385\_\_1、TPCR100、TPCR110、TPCR120、TPCR16、TPCR24、TPCR25、TPCR26、TPCR27、TPCR85、TPCR92、Z98744、dJ25J6.1、dJ88J8.1、前立腺特異的嗅覚受容体)、推定上の味覚受容体HTR2、オプシン(青感性のオプシン、エンセファロプシン(encephalopsin)、緑感性のオプシン、メラノプシン、RPE網膜Gタンパク質共役受容体、赤感性のオプシン、ロドプシン

、視色素様受容体、ペロブシン、ペプチド（アンジオテンシン（AT1、AT2）、アペリン（APJ）、ボンベシン（BRS-3、GRP-R（GRP選択性ボンベシン受容体）、ニューロメジン-B受容体、NMB-R（ニューロメジン-B-選択性ボンベシン受容体）、ブラジキニン（BK-1受容体、BK-2受容体）、ケモカイン（CCR1、CCR10、CCR11、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、XCR1、CXCR3、CXCR4、CXCR5、FMET-LEU-PHE受容体（FMLP受容体）、FMLP関連受容体I（FMLP-R-I）、FMLP関連受容体II（FMLP-R-II）、インターロイキン（CXCR1、CXCR2）、アナフィラトキシン（C3A-R、C5A-R）、コレシストキニン（CCK-A受容体、CCK-B受容体）、エンドセリン（ET-B、ET-A）、ガラニン（GAL1-R、GAL2-R、GAL3-R）、メラノコルチン（MC1-R（MSH-R）、MC2-R（ACTH-R）、MC3-R、MC5-R）、モチリン（GPR38（モチリン受容体）、神経ペプチド（NPFF（NPFF2、RFamide関連ペプチド受容体）、神経ペプチドY（NPY1-R、NPY2-R、NPY4-R、NPY5-R、NPY6-R）、ニューロテンシン（NTR1、NTR2）、オピオイド（DOR-1、KOR-1、MOR-1、ノシセプチン受容体、KOR-3）、オレキシン（オレキシン受容体1型、OX1R（ヒボクレチン受容体1型）、OX2R（ヒボクレチン受容体2型）、他のペプチド（KiSS受容体（GPR54）、プロテアーゼ活性化（PAR-2、PAR-3、PAR-4、トロンビン受容体）、ソマトスタチン（SS5R、SS1R、SS2R、SS3R、SS4R）、タキキニン（NK-3受容体、NK-4受容体、NMU1R（aka FM3）、NMU2R、NK-2受容体、NK-1受容体）、ウロテンシン（ウロテンシンII受容体、GPR14）、バソプレシン（OT-R、バソプレシンV1A受容体、バソプレシンV1B受容体、バソプレシンV2受容体）、血小板活性因子（白血球血小板活性因子受容体（血小板活性因子受容体（PAF-R））、放出ホルモン（GNRH-R、GHS-R、プロラクチン放出ペプチド受容体（GPR10）、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体（TRH-R）、II型GnRH-Rタンパク質）が挙げられる。

#### 【0039】

いくつかの例では、1つ以上のクラスAのGPCRは、オーファンGPCRとしてさらに分類される。いくつかの例では、オーファンGPCRは、その内因性のリガンドが同定されていないGPCRを指す。こうした場合、リガンドが同定されると、オーファンの状態は採用されたGPCRとして再度割り当てられる。典型的なクラスAオーファンGPCRとしては、限定されないが、5-ヒドロキシトリプタミン受容体ホモログ、膜貫通型受容体HEOAD54、ケモカイン受容体、ケモカイン受容体様1、Gタンパク質共役受容体DEZ、ケモカイン受容体様2、IL-8関連受容体DRY12 GPR30 CEP R、後根受容体1 DRR1、後根受容体2 DRR2、後根受容体3 DRR3、後根受容体4 DRR4、後根受容体5 DRR5、後根受容体6 DRR6、ダッフイ抗原、EBV誘発Gタンパク質共役受容体2（EBI2）、EDGホモログ、EDGホモログ（GPR45）、EDGホモログ、GPR35、GPR37、GPR75、Gタンパク質共役受容体（RAIG1）、BONZO（STRL33）、D38449、ETBR-LP-2、GPR1、GPR12、GPR15、GPR17、GPR18、GPR19、GPR20、GPR22、GPR3（ACCA「オーファン」受容体）、GPR31、GPR32、GPR34、GPR39、GPR4（GPR19）、GPR40、GPR41、GPR43、GPR55、GPR6、GPR7、GPR73、GPR8、HG38、HM74、LGR4、RDC1ホモログ、GPR48、GPR61、GPR62、GPR77、GPR84、GPR86、GPR87、GPR72、GPRC5B、H7TBA62、Gタンパク質共役型受容体R97222、SALPR、Y13583、Y36302、GPR58、GPR57、RE2、GPR21、GPR52、SREB1、SREB2、SREB3、LGR7、MASプロト癌遺伝子、MAS関連Gタンパク質共役受容体MRG、ニューロテンシン受容体ntr2受容体ホモログ、GPR25、H963、P2Y10

、 P 2 Y 5、 P 2 Y 9、 F M L P 関連受容体ホモログ、フェロモン受容体ホモログ、 N - ホルミルペプチド受容体ホモログ、 G P R 9 2、 R A I G 1 ホモログ、 F K S G 4 6、 F K S G 4 7、 V 1 R L 1、 C R A M - A、 F K S G 8 0、 7 回膜貫通型ドメインタンパク質 p 4 0 ホモログ T A S P 睾丸特異的アドリアマイシン感受性タンパク質、線条体特異的 G タンパク質共役受容体、 T 細胞死亡関連タンパク質、および胸大動脈 G タンパク質共役受容体が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

クラス B G P C R (またはクラス 2) は G P C R のセクレチンファミリーを含む。いくつかの例では、セクレチン受容体はグルカゴンホルモンファミリーからペプチドホルモンによって調節される。いくつかの例では、典型的なクラス B の G P C R は、限定されないが、セクレチン ( B A I - 1、 B A I - 2、 B A I - 3 )、カルシトニン遺伝子関連ペプチド 1 型受容体、カルシトニン受容体 ( C T - R )、 G I P - R、グルカゴン受容体 ( G L - R )、グルカゴン様ペプチド 1 受容体 ( G L P - 1 受容体)、グルカゴン様ペプチド - 2 受容体 ( G L P 2 R )、成長ホルモン放出ホルモン受容体 ( G H R H 受容体)、白血球抗原 C D 9 7、眼白子症 1 型タンパク質、 P T H 2 受容体、 P T H R 受容体、 P A C A P - R - 1、 F M I 1 ( M E G F 2 )、 S C T - R、 C R H ( C R F 1、 C R F 2 )、 V I P ( V I P - R - 1、 V I P - R - 2 ) を含む。

【 0 0 4 1 】

場合によっては、クラス B のオーファン G P C R としては、例えば、カドヘリン E G F L A G 7 回膜貫通型 G 型受容体 ( C E L S R 1 )、細胞表面糖タンパク質 E M R 1、クラス B の G タンパク質共役受容体 Y 9 1 6 2 5、 E G F 様モジュール含有ムチン様受容体 E M R 3、フラミンゴ ( f l a m i n g o ) 1 ( F M I 1 )、 E M R 2、 F L J 1 4 4 5 4、 K I A A 1 8 2 8、 A L 0 3 3 3 7 7 ( H E 6 ホモログ)、 E T L、 G P R 5 6、 H E 6、 K I A A 0 7 5 8、ラトロフィリン - 1、ラトロフィリン - 2、ラトロフィリン - 3、 V L G R 1 が挙げられる。

【 0 0 4 2 】

クラス C G P C R (またはクラス 3) は、 G P C R の代謝型グルタミン酸フェロモンを含む。いくつかの例では、典型的なクラス C の G P C R は、限定されないが、代謝型カルシウム感知受容体 ( C A S R )、代謝型グルタミン酸受容体 1、代謝型グルタミン酸受容体 2、代謝型グルタミン酸受容体 3、代謝型グルタミン酸受容体 4、代謝型グルタミン酸受容体 5、代謝型グルタミン酸受容体 6、代謝型グルタミン酸受容体 7、代謝型グルタミン酸受容体 8、感覚伝達 G タンパク質共役受容体 - B 3、味覚受容体 G P C R - B 4、および G A B A - B ( G A B A - B 1 A 受容体、 G A B A - B 2 受容体) が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

クラス D の G P C R (またはクラス 4) は、真菌交配型フェロモン受容体を含む。典型的な交配因子受容体は S T E 2 と S T E 3 を含んでいる。

【 0 0 4 4 】

クラス E の G P C R (またはクラス 5) は、環状 A M P 受容体を含む。

【 0 0 4 5 】

クラス F の G P C R (またはクラス 6) は、 G P C R の F r i z z l e d / S m o o t h e n e d ファミリーを含む。典型的なクラス F の G P C R としては、限定されないが、 f r i z z l e d 1 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 1 0 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 2 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 3 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 4 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 5 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 6 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 7 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 9 膜貫通型受容体、 f r i z z l e d 様受容体 s m o o t h e n e d ホモログ ( S M O )、および f r i z z l e d 7 ホモログが挙げられる。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された G P C R はさらに味覚 G P C R を含む。典型的な味覚 G P C R としては、限定されないが、 T 2 R 1、 T 2 R 1 0、 T 2 R

10

20

30

40

50

13、T2R14、T2R16、T2R3、T2R4、T2R5、T2R7、T2R8、およびT2R9が挙げられる。

【0047】

いくつかの実施形態では、受容体はGPCRである。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはGPCRである。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、クラスA、クラスB、クラスC、クラスD、クラスE、またはクラスFのGPCRである。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは味覚GPCRである。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。

10

【0048】

イオンチャネルポリペプチド

イオンチャネルタンパク質は、細胞膜全体のイオンの流れを調節し、細胞量を制御し、静止膜電位を確立する、気孔形成膜タンパク質である。いくつかの例では、イオンチャネルタンパク質は電位依存性イオンチャネルまたはリガンド依存性イオンチャネルを含む。場合によっては、イオンチャネルタンパク質は、カルシウム活性化カリウムチャンネル、CatSperおよび二孔チャンネル、環状ヌクレオチド調節チャンネル、内向き整流性カリウムチャンネル、リアノジン受容体、一過性受容体電位チャンネル、2Pカリウムチャンネル、電位依存性カルシウムチャンネル、電位依存性カリウムチャンネル、電位依存性陽子チャンネル、電位依存性ナトリウムチャンネル、5-HT3-受容体、酸感知(陽子依存性)イオンチャンネル(ASIC)、上皮のナトリウムチャンネル(ENaC)、GABAA受容体、グリシン受容体、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体、IP3受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、P2X受容体、あるいはZACを含む。

20

【0049】

ある実施形態では、受容体はイオンチャネルポリペプチドである。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャネルポリペプチドである。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、カルシウム活性化カリウムチャンネル、CatSperおよび二孔チャンネル、環状ヌクレオチド調節チャンネル、内向き整流性カリウムチャンネル、リアノジン受容体、一過性受容体電位チャンネル、2Pカリウムチャンネル、電位依存性カルシウムチャンネル、電位依存性カリウムチャンネル、電位依存性陽子チャンネル、電位依存性ナトリウムチャンネル、5-HT3-受容体、酸感知(陽子依存性)イオンチャンネル(ASIC)、上皮のナトリウムチャンネル(ENaC)、GABAA受容体、グリシン受容体、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体、IP3受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、P2X受容体、あるいはZACから選択されるイオンチャネルポリペプチドを含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたTRPV3、KCa3.1、あるいはTRPC6を含む。

30

【0050】

修飾された膜貫通ポリペプチドを生成するためのプラットフォーム

ある実施形態では、物理化学的性質が増強または改善された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成する方法とプラットフォームが本明細書に開示される。いくつかの例では、本明細書に記載される方法またはプラットフォームは、突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成する工程、C末端選択マーカールと随意にN末端選択マーカールを含む発現ベクターに修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入する工程、および、安定的に折り畳まれた修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを同定するために少なくとも1つの選択剤の存在または不在で宿主細胞中のベクターを発現させる工程を含む。

40

【0051】

いくつかの例では、物理化学的性質が増強または改善された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成するための本明細書に記載される方法とプラットフォームは、図1で例証される通りである。いくつかの例では、方法またはプラットフォームは突然変異誘発方

50

法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成する工程を含む(101)。いくつかの例では、突然変異誘発方法は無作為の突然変異誘発である。典型的な無作為の突然変異誘発は、エラープローンPCR、ローリングサークル、エラープローンPCR、突然変異誘発株、一時的突然変異誘発株、挿入突然変異誘発、エチルメタンスルホン酸、亜硝酸、あるいはDNAシャフリングを含む。いくつかの例では、突然変異誘発はエラープローンPCR法である。いくつかの例では、突然変異誘発方法はDNAシャフリング法である。他の例では、突然変異誘発法は非無作為の突然変異誘発法である。ライブラリーの生成に際して、ライブラリー内での修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはそれぞれ選択プロセスを経験するための発現ベクター中でコードされる(102)。いくつかの例では、発現ベクターはさらに、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端に位置する第1の選択マーカを含む。このような選択マーカはしばしば、複数膜貫通型ポリペプチドの早熟な切断(premature truncations)を防ぐように選択され、および/または複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを容易にする。場合によっては、発現ベクターは随意に、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端に位置する第2の選択マーカを含む。場合によっては、第2の選択マーカの存在は、複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを促す。いくつかの例では、誤って折り畳まれたポリペプチドは標識され、分解用の宿主細胞機構によって除去される。いくつかの例では、第1の選択マーカは第1の選択ポリペプチドをコードし、第2の選択マーカは第2の選択ポリペプチドをコードする。いくつかの例では、発現ベクターは、少なくとも1つの選択剤の存在または不在下(例えば、抗生物質の存在下、または栄養要求性薬剤の不在下)において宿主細胞中で発現される。場合によっては、第1の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端部分に適切に表示され、第2の選択ポリペプチドが修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端部分に適切に表示されるときに、少なくとも1つの選択剤は、第1の選択ポリペプチドと第2の選択ポリペプチドとの相互作用によって宿主細胞に対して無毒化される。いくつかの例では、少なくとも1つの選択剤は、抗生物質(例えば、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、またはテトラサイクリン)、あるいは毒性の代謝産物(例えば、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾール)を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。選択プロセス(102)からのいくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、所望の物理化学的性質を伝えることができる突然変異の最小限のセットを同定するために、無作為の突然変異誘発(101)の追加のラウンド(例えば、無作為の突然変異誘発の2、3、4、または5以上のラウンド)と選択プロセス(102)とを経験するために同定される。選択プロセス(102)からの他の例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、発現と特性決定(103)のために同定される。いくつかの例では、物理化学的性質の1つ以上、例えば、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、あるいは経路活性化選択性の1つ以上が評価される。いくつかの例では、増強された安定性(例えば、耐熱性またはpH安定性)や結晶の形成におけるタンパク質の改善された傾向などの物理化学的性質の増強はさらに、改善された免疫原性と抗原性に相互に関連する。いくつかの例では、1つ以上の分析技術は、特性決定プロセス(103)のために利用され、X線結晶学、電子結晶学、クライオ電子顕微鏡、核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR)、熱変性技術、および/または化学変性技術を含む。場合によっては、発現と特性決定工程(103)から、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの候補は、大規模タンパク質産生(104)について同定され、その後、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補の結晶化(105)、小分子スクリーニング(106)、ペプチドスクリーニング(107)、抗体および/またはワクチン産生(108)について同定される。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補は、昆虫宿主細胞または哺乳動物宿主細胞中で生成される。いくつかの例では、ファージディスプレイあるいは酵母ディスプレイは抗体スクリーニングに使用され、修飾された複

10

20

30

40

50

数膜貫通型ポリペプチド候補はスクリーニングプロセス中にナノ粒子上で固定される。いくつかの例では、抗体スクリーン(107)から同定された抗体は、ワクチンのためにさらに製剤される。いくつかの例では、ペプチド・スクリーニング(107)から同定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補のペプチドは、ワクチンのためにさらに製剤される。他の例では、タンパク質産生工程(104)から生成された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補はワクチン(例えば、核酸ベースのワクチン、抗原提示細胞(APC)ベースのワクチン、あるいはウイルスベースのワクチン)のためにさらに製剤される。

#### 【0052】

修飾された複数膜貫通型ポリペプチド

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは1つ以上の修飾を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは約1から約100の修飾を含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約1から約90まで、約5から約80まで、約10から約70まで、約15から約60まで、約20から約50まで、約30から約40まで、約1から約80まで、約1から約60まで、約1から約50まで、約1から約40まで、約1から約30まで、約1から約15まで、約1から約10まで、約10から約80まで、約10から約60まで、約10から約50まで、約10から約40まで、約20から約80まで、約20から約60まで、約20から約40まで、約30から約80まで、約30から約60まで、または約30から約50までの修飾を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。

#### 【0053】

場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質(例えば、イオンチャネルタンパク質)、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。場合によっては、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質(例えば、イオンチャネルタンパク質)、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体から選択される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約1から約100の修飾を含む。場合によっては、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質(例えば、イオンチャネルタンパク質)、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体から選択される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約1から約90まで、約5から約80まで、約10から約70まで、約15から約60まで、約20から約50まで、約30から約40まで、約1から約80まで、約1から約60まで、約1から約50まで、約1から約40まで、約1から約30まで、約1から約15まで、約1から約10まで、約10から約80まで、約10から約60まで、約10から約50まで、約10から約40まで、約20から約80まで、約20から約60まで、約20から約40まで、約30から約80まで、約30から約60まで、または約30から約50までの修飾を含む。いくつかの例では、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質(例えば、イオンチャネルタンパク質)、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体から選択される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。

#### 【0054】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャネルタンパク質である。いくつかの例では、イオンチャネルタンパク質は約1から約100の修飾を含む。場合によっては、イオンチャネルタンパク質は、約1から約90まで、約5

10

20

30

40

50

から約 80 まで、約 10 から約 70 まで、約 15 から約 60 まで、約 20 から約 50 まで、約 30 から約 40 まで、約 1 から約 80 まで、約 1 から約 60 まで、約 1 から約 50 まで、約 1 から約 40 まで、約 1 から約 30 まで、約 1 から約 15 まで、約 1 から約 10 まで、約 10 から約 80 まで、約 10 から約 60 まで、約 10 から約 50 まで、約 10 から約 40 まで、約 20 から約 80 まで、約 20 から約 60 まで、約 20 から約 40 まで、約 30 から約 80 まで、約 30 から約 60 まで、または約 30 から約 50 までの修飾を含む。

【 0 0 5 5 】

いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 1 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 2 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 3 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 4 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 5 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 6 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 7 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 8 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 9 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 10 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 11 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 12 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 13 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 14 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 15 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 16 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 17 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 18 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 19 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 20 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 25 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 30 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 35 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 40 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 45 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、イオンチャンネルタンパク質は約 50 以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは受容体である。場合によっては、受容体は GPCR である。いくつかの例では、GPCR は約 1 から約 100 の修飾を含む。場合によっては、GPCR は、約 1 から約 90 まで、約 5 から約 80 まで、約 10 から約 70 まで、約 15 から約 60 まで、約 20 から約 50 まで、約 30 から約 40 まで、約 1 から約 80 まで、約 1 から約 60 まで、約 1 から約 50 まで、約 1 から約 40 まで、約 1 から約 30 まで、約 1 から約 15 まで、約 1 から約 10 まで、約 10 から約 80 まで、約 10 から約 60 まで、約 10 から約 50 まで、約 10 から約 40 まで、約 20 から約 80 まで、約 20 から約 60 まで、約 20 から約 40 まで、約 30 から約 80 まで、約 30 から約 60 まで、または約 30 から約 50 までの修飾を含む。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

いくつかの例では、GPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約1以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約2以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約3以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約4以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約5以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約6以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約7以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約8以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約9以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約10以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約11以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約12以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約13以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約14以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約15以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約16以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約17以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約18以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約19以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約20以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約25以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約30以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約35以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約40以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約45以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、GPCRは約50以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0058】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの例では、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体から選択される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。

#### 【0059】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は約0.5%またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は約1%またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は約2%またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は約3%またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャネルタンパク質は約4%またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャ

チャンネルタンパク質は約 5 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 6 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 7 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 8 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 9 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 10 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 11 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 12 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 13 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 14 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 15 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 20 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 25 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、イオンチャンネルタンパク質は約 30 % またはそれ以上の修飾を含む。

10

20

30

40

50

**【 0 0 6 0 】**

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは受容体である。場合によっては、受容体は GPCR である。いくつかの実施形態において、GPCR は、約 0.5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、20 %、25 %、30 %、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 0.5 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 1 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 2 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 3 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 4 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 5 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 6 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 7 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 8 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 9 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 10 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 11 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 12 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 13 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 14 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 15 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 20 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 25 % またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、GPCR は約 30 % またはそれ以上の修飾を含む。

**【 0 0 6 1 】**

いくつかの実施形態において、1 つ以上の修飾は、GPCR の N 末端部分、GPCR の膜貫通コア (transmembrane core) (TM)、GPCR の C 末端部分、またはこれらの組み合わせに位置する。いくつかの例では、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、またはそれ以上の修飾は、GPCR の N 末端部分に位置する。場合によっては、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、またはそれ以上の修飾は、GPCR の TM 内、例えば、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、TM7、またはこれらの組み合わせ内にある。さらなる場合には、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、またはそれ以上の修飾は、GPCR の C 末端部分に位置する。

**【 0 0 6 2 】**

いくつかの実施形態において、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する物理化学的性質の増強または改善に相関する。いくつかの例では、物理化学的性質は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、および/または経路活性化選択性を含む。場合によっては、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する物理化学的性質の増強または改善に相関し、物理化学的性質は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、および/または経路活性化選択性から選択される。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。場合によっては、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する物理化学的性質の増強または改善に相関し、物理化学的性質は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、および/または経路活性化選択性から選択される。さらなる場合には、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する物理化学的性質の増強または改善に相関し、物理化学的性質は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、および/または経路活性化選択性から選択される。

10

20

30

40

50

**【0063】**

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された発現レベルである。いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する発現レベルの増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する発現レベルの増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する発現レベルの増強または改善に相関する。

**【0064】**

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された安定性である。場合によっては、安定性はpH安定性と耐熱性をさらに含む。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドのpH安定性は、折り畳まれたままで留まるポリペプチドの能力であり、定義されたpH範囲で生体機能(例えば生物学的活性)を保持する。いくつかの例では、定義されたpH範囲は、長さが約1から約11、約3から約9、約4から約9、約5から約9、約6から約9、あるいは約7から約9である。場合によっては、定義されたpHは、少なくとも約1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、またはそれ以上である。

**【0065】**

場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドの熱安定性は、折り畳まれたままで留まるポリペプチドの能力であり、定義された温度で生体機能(例えば生物学的活性)を保持する。いくつかの例では、定義された温度範囲は、約0°Cから約120°C、約10°Cから約100°C、約15°Cから約80°C、約20°Cから約60°C、約25°Cから約50°C、約30°Cから約40°C、約15°Cから約37°C、約20°Cから約37°C、約25°Cから約37°C、約25°Cから約50°C、約37°Cから約50°Cである。場合によっては、定義された温度は、少なくとも約1°C、4°C、5°C、8°C、10°C、15°C、16°C、18°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、42°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、80°C、90°C、100°C、またはそれ以上である。

**【0066】**

いくつかの例では、複数膜貫通型ポリペプチドの熱安定性はさらに、複数膜貫通型ポリペプチドの融点に関連している。場合によっては、融点曲線は、複数膜貫通型ポリペプチドサンプルを熱し、変性、不活性化、凝集または分解の程度を、熱シフトアッセイ(例えば、染料を使用する蛍光シフト)、示差走査熱量測定、円偏光二色性分光分析、ピークシフトアッセイ(HPLC/サイズ排除クロマトグラフィーに基づく)などの技術を利用して測定することにより生成される。場合によっては、熱安定性は、修飾された複数膜貫通

型ポリペプチドの、その野性型に対する融点（または融解温度）の上昇を指す。場合によっては、上昇は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、またはそれ以上の温度の上昇である。

【0067】

場合によっては、安定性はさらに、その正常な膜環境の外部での精製を可能にする、洗浄薬、界面活性剤、および可溶化緩衝液の範囲中の複数膜貫通型ポリペプチドの安定性を含む。したがって、複数膜貫通型ポリペプチドは、非標的膜タンパク質、膜関連タンパク質、またはリポタンパク質、アポリポタンパク質、脂質、ホスホイノシトール脂質（phosphoinositol lipids）、およびリポ糖（liposaccharides）などの他の膜成分といった非所望抗原から除去された単離形態で提供される。

10

【0068】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する増強または改善された安定性（例えば、pH安定性または熱安定性）に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する増強または改善された安定性（例えば、pH安定性または熱安定性）に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する増強または改善された安定性（例えば、pH安定性または熱安定性）に相関する。

【0069】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された配座の選択性である。いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する配座の選択性の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する配座の選択性の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する配座の選択性の増強または改善に相関する。

20

【0070】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された均質性である。いくつかの例では、均質性は、複数膜貫通型ポリペプチドの集団内での1つ以上の物理化学的性質の構造的な類似性あるいは均一性、および/または均一性を指す。いくつかの例では、複数膜貫通型ポリペプチドのタンパク質の配座の可変性の減少は、サンプル内での複数膜貫通型ポリペプチドの均質性の増加または高度な均質性に相関する。他の例では、複数膜貫通型ポリペプチドの分解および/または変性の増大は、サンプル内での複数膜貫通型ポリペプチドの均質性の減少に相関する。

30

【0071】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する均質性の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する均質性の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する均質性の増強または改善に相関する。

40

【0072】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強されたタンパク質結晶化である。いくつかの例では、改善または増強されたタンパク質結晶化は、容易に結晶化される複数膜貫通型ポリペプチドの傾向を指す。例えば、複数膜貫通型ポリペプチドとそれらの複合体は、過飽和条件下で結晶を形成するように促される。こうした条件下では、個々のタンパク質分子は非共有相互作用によって一緒にまとめられて反復アレイ中に詰められる。その後、こうした結晶は、タンパク質の分子構造を調べるために、および/または、工業的または生物工学的な目的のために、構造生物学で使用される。いくつかの例では、タンパク質結晶化は、水性環境の制約、高品質のタンパク質サンプルを得る難しさ、

50

あるいは、温度、pH、およびイオン強度に対するタンパク質サンプルの感度などの因子のせいで困難であると考えられている。いくつかの例では、複数膜貫通型タンパク質の同じグループ内の複数膜貫通型タンパク質は、その物理化学的特性において異なり、そのため、所望の特定のタンパク質の結晶化は予測可能ではない。場合によっては、所定のタンパク質のための適切な結晶化条件の決定は、優れた結晶化条件が見つかる前に、多くの条件の実証的な検定を必要とする。場合によっては、本明細書に記載される改善または増強されたタンパク質結晶化は、高品質のタンパク質サンプルの増加、タンパク質結晶回折の増加、あるいは異質性の減少または安定性の改善を指す。

【0073】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対するタンパク質結晶化の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対するタンパク質結晶化の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対するタンパク質結晶化の増強または改善に相関する。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された抗原性である。いくつかの例では、抗原性は、抗体またはその結合フラグメントに、あるいは、液性免疫応答および/または細胞媒介性免疫応答の生成物に相互作用するまたは特異的に結合する化学構造（例えば抗原）の能力である。

20

【0075】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する抗原性の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する抗原性の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する抗原性の増強または改善に相関する。

【0076】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された免疫原性である。場合によっては、免疫原性は、液性免疫応答および/または細胞媒介性免疫応答を誘発する化学構造（例えば、免疫原）の能力である。

30

【0077】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する免疫原性の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する免疫原性の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する免疫原性の増強または改善に相関する。

【0078】

いくつかの実施形態において、物理化学的性質は改善または増強された経路活性化選択性である。いくつかの例では、改善または増強された経路活性化選択性は、複数膜貫通型ポリペプチドが複数の利用可能な代謝経路またはシグナル伝達経路の中から1つ以上の数の代謝経路またはシグナル伝達経路を選択的に活性化する能力を指す。

40

【0079】

いくつかの例では、上記の修飾は、複数膜貫通型ポリペプチドの、その野性型に対する経路活性化選択性の増強または改善に相関する。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドはイオンチャンネルタンパク質またはGPCRである。いくつかの例では、上記の修飾は、イオンチャンネルタンパク質の、その野性型に対する経路活性化選択性の増強または改善に相関する。いくつかの例では、上記の修飾は、GPCRの、その野性型に対する経路活性化選択性の増強または改善に相関する。

50

## 【0080】

いくつかの実施形態において、改善された熱安定性および/または均質性はさらに、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのタンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、経路活性化選択性、および/または他の物理化学的性質を調節する(例えば、改善する)。

## 【0081】

いくつかの実施形態において、修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、挿入、欠失、突然変異、あるいはこれらの組み合わせを含む。場合によっては、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはさらに切断を含む。場合によっては、切断は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの末端の両方に位置する。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは内部の欠失または挿入も含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは内部の欠失を含む。他の場合には、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは内部の挿入を含む。

10

## 【0082】

いくつかの例では、修飾は、疎水性または非極性のアミノ酸残基への突然変異を含む。場合によっては、疎水性または非極性のアミノ酸は、小さな疎水性アミノ酸と大きな疎水性アミノ酸を含む。典型的な小さな疎水性アミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、およびそれらのアナログを含む。典型的な大きな疎水性アミノ酸は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびこれらのアナログを含む。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、小さな疎水性アミノ酸への突然変異(例えばグリシン、アラニン、プロリン、およびこれらのアナログへの突然変異)を含む。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、大きな疎水性アミノ酸への突然変異(例えば、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびこれらのアナログへの突然変異)を含む。

20

## 【0083】

いくつかの例では、修飾は、非極性のアミノ酸残基への突然変異を含む。場合によっては、極性アミノ酸は、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、チロシン、およびこれらのアナログを含む。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、非極性のアミノ酸残基への突然変異(例えば、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、チロシン、およびこれらのアナログへの突然変異)を含む。

30

## 【0084】

さらなる例では、修飾は、荷電アミノ酸残基への突然変異を含む。場合によっては、荷電アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、あるいはこれらのアナログを含む。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、荷電アミノ酸残基への突然変異(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、あるいはこれらのアナログへの突然変異)を含む。

40

## 【0085】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、非必須アミノ酸への修飾を含む。いくつかの例では、非必須アミノ酸残基は、その必須の生物学的または生物化学的な活性(例えば、受容体結合あるいは活性化)を消失させるまたは実質的に変化させることなく、ポリペプチドの野生型配列から変化する残基である。場合によっては、本明細書で提供される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは必須アミノ酸を含む。場合によっては、必須アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から変えられると、ポリペプチドの必須の生物学的または生物化学的な活性を消失させるまたは実質的に消失させる残基である。

50

## 【0086】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは保存的アミノ酸置換を含む。場合によっては、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と取り替えられるアミノ酸置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。こうしたファミリーは、例えば、塩基性側鎖（例えば、K、R、H）、酸性側鎖（例えば、D、E）、非荷電極性側鎖（例えば、G、N、Q、S、T、Y、C）、無極性側鎖（例えば、A、V、L、I、P、F、M、W）、ベータ分岐側鎖（例えば、T、V、I）、および芳香族側鎖（例えば、Y、F、W、H）を備えたアミノ酸を含む。したがって、ポリペプチド中の予測される非必須アミノ酸残基は、例えば、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基と取り替えられる。許容可能な置換の他の例は、当電子の考察（例えばメチオニン用ノルロイシン）または他の特性（例えば、フェニルアラニン用の2-チエニルアラニン、あるいはトリプトファン用の6-C1-トリプトファン）に基づく置換を含む。

10

## 【0087】

選択マーカー

いくつかの実施形態において、選択マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子を含む。いくつかの例では、選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質（例えば、蛍光タンパク質）をコードしない。上に議論されるように、いくつかの例の選択マーカーは、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みを促す。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの安定したかつ適切な折り畳みは、翻訳後プロセッシングの後のその構造的な建築物によって生体機能を達成することができるポリペプチドを指す。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの安定した適切な折り畳みはさらに、生物学的に活性な機能を備えたポリペプチドを指す。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの安定した適切な折り畳みは、誤って折り畳まれた構造的なアーキテクチャーを備えたポリペプチド、あるいはその生体機能または活性を経験するのを防ぐ構造的なアーキテクチャーを備えたポリペプチドを指さない。

20

## 【0088】

いくつかの例では、選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子、赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子、tdTomato蛍光タンパク質をコードする遺伝子、あるいはルシフェラーゼをコードする遺伝子を含む。いくつかの例では、第2の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子をコードする。いくつかの例では、選択マーカー遺伝子は、第1の選択マーカー遺伝子あるいは第2の選択マーカー遺伝子である。いくつかの例では、第1の選択マーカー遺伝子および/または第2の選択マーカー遺伝子は、レポーター遺伝子を含まない。

30

40

## 【0089】

いくつかの例では、選択マーカー遺伝子は第1の選択マーカー遺伝子である。いくつかの実施形態において、第1の選択マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子を含む。いくつかの例では、第1の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質（例えば、蛍光タンパク質）をコードしない。いくつかの例では、第1の選択マーカー遺伝

50

子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 - ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子をコードする。

【 0 0 9 0 】

いくつかの例では、選択マーカー遺伝子は第 2 の選択マーカー遺伝子である。いくつかの実施形態において、第 2 の選択マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子を含む。いくつかの例では、第 2 の選択マーカー遺伝子はレポータータンパク質（例えば、蛍光タンパク質）をコードしない。いくつかの例では、第 2 の選択マーカー遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 - ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子を含む。

10

【 0 0 9 1 】

いくつかの例では、第 1 の選択マーカー遺伝子と第 2 の選択マーカー遺伝子は同じである。他の例では、第 1 の選択マーカー遺伝子と第 2 の選択マーカー遺伝子は異なる。

20

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態において、第 1 の選択マーカー遺伝子および/または第 2 の選択マーカー遺伝子は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに直接的に、あるいは、約 1 ~ 約 6 0 のアミノ酸残基をコードするリンカー遺伝子を介して間接的に動作可能に連結される。いくつかの例では、第 1 の選択マーカー遺伝子は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに直接的に、あるいは、約 1 ~ 約 6 0 のアミノ酸残基をコードするリンカー遺伝子を介して間接的に動作可能に連結される。いくつかの例では、第 2 の選択マーカー遺伝子は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに直接的に、あるいは、約 1 ~ 約 6 0 のアミノ酸残基をコードするリンカー遺伝子を介して間接的に動作可能に連結される。場合によっては、リンカー遺伝子は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約 6 0 のアミノ酸残基をコードする。

30

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態において、第 1 と第 2 の選択マーカーは選択剤に対して選択的である。いくつかの実施形態において、第 2 の選択剤は抗生物質または毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5 - フルオロオロチン酸または 3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾールを含む。いくつかの実施形態において、選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

40

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態において、選択剤は第 1 の選択剤と第 2 の選択剤を含む。いくつかの実施形態において、第 1 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつか

50

の実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5 - フルオロオロチン酸または3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾールを含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

【0096】

式 I - IV の修飾された膜貫通ポリペプチド

10

いくつかの実施形態において、式 ( I ) の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成することが本明細書で開示され、

【0097】

【化6】



### 式 I

式中、

20

MSMP は少なくとも1つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、

SP1 は MSMP の C 末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1 は第1の選択剤に対して耐性を有し、

SP2 は MSMP の N 末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2 は第2の選択剤に対して耐性を有し、

L1 は第1のリンカーであり、

L2 は第2のリンカーであり、

x は独立して 0 - 3 であり、

y は独立して 1 - 5 であり、

z は独立して 1 - 3 であり、および、

30

m と n は各々独立して 0 - 60 のアミノ酸残基である。

【0098】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された TRPV3、KCa3.1、または TRPC6 である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。いくつかの実施形態において、修飾された GPCR は、修飾された CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、または EP4 の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾された GPCR は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾された GPCR は、約 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。

40

【0099】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はエラープローン PCR

50

法を含む。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はDNAシャフリング法を含む。

【0100】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は、N末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む。

【0101】

いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。

10

【0102】

いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

20

【0103】

いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

30

【0104】

いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある。いくつかの例では、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。

【0105】

いくつかの例では、SP1とSP2は同じである。他の例では、SP1とSP2は異なる。場合によっては、SP1とSP2はさらに、それぞれL1とL2によってMSMPに連結している。いくつかの例では、L1は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。場合によっては、L2は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、3

40

50

4、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。

【0106】

いくつかの実施形態において、 $SP1_z$ は $SP1_{2-3}$ であり、 $SP1$ の各々は他とは異なる。いくつかの例では、 $SP1_z$ は $SP1_3$ であり、3つの $SP1$ の2つは同じである。いくつかの例では、 $SP1$ の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別の $SP1$ に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

10

【0107】

いくつかの実施形態において、 $SP2_x$ は $SP2_{2-3}$ であり、 $SP2$ の各々は他とは異なる。いくつかの例では、 $SP2_x$ は $SP2_3$ であり、3つの $SP2$ の2つは同じである。いくつかの例では、 $SP2$ の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別の $SP2$ に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。

30

【0109】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、MBP、TrxA、FLAGタグ、AVIタグ、またはHisTagを含む。

40

【0111】

いくつかの実施形態において、式(Ia)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成することが本明細書で開示され、

【0112】

## 【化 7】

SP2-L2<sub>m</sub>-MSMP-L1<sub>n</sub>-SP1

## 式 Ia

式中、

MSMPは少なくとも1つの修飾を含む複数膜貫通型ポリペプチドであり、  
 SP1はMSMPのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1  
 は第1の選択剤に対して耐性を有し、  
 SP2はMSMPのN末端に連結された第2の選択ポリペプチドであり、ここで、SP2  
 は第2の選択剤に対して耐性を有し、  
 L1は第1のリンカーであり、  
 L2は第2のリンカーであり、および、  
 mとnは各々独立して0 - 60のアミノ酸残基である。

10

## 【0113】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの実施形態では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、  
 修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体（GPCR）である。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは、約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。

20

30

## 【0114】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はエラープローンPCR法を含む。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はDNAシャフリング法を含む。

## 【0115】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾は、N末端切断、C末端切断、またはその組み合わせを含む。

40

## 【0116】

いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。

## 【0117】

いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐

50

性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 - ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 - ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

10

【 0 1 1 9 】

いくつかの例では、S P 1 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、S P 1 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある。場合によっては、S P 2 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、S P 2 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの例では、S P 1 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、S P 2 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。

20

【 0 1 2 0 】

いくつかの例では、S P 1 と S P 2 は同じである。他の例では、S P 1 と S P 2 は異なる。場合によっては、S P 1 と S P 2 はさらに、それぞれ L 1 と L 2 によって M S M P に連結している。いくつかの例では、L 1 は長さが約 0 ~ 約 6 0 のアミノ酸残基、例えば、長さが約 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約 6 0 のアミノ酸残基である。場合によっては、L 2 は長さが約 0 ~ 約 6 0 のアミノ酸残基、例えば、長さが約 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約 6 0 のアミノ酸残基である。

30

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態において、第 1 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5 - フルオロオロチン酸または 3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾールを含む。

40

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態において、第 1 の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含

50



末端切断、またはその組み合わせを含む。

【0129】

いくつかの実施形態において、修飾されたGPCRは哺乳動物のGPCRである。いくつかの実施形態では、修飾されたGPCRはヒトのGPCRである。

【0130】

いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

10

【0131】

いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

20

【0132】

いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある。場合によっては、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。

30

【0133】

いくつかの例では、SP1とSP2は同じである。他の例では、SP1とSP2は異なる。場合によっては、SP1とSP2はさらに、それぞれL1とL2によってRPに連結している。いくつかの例では、L1は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。場合によっては、L2は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。

40

【0134】

いくつかの実施形態において、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>2-3</sub>であり、SP1の各々は他とは異なる。いくつかの例では、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>3</sub>であり、3つのSP1の2つは同じであ

50

る。いくつかの例では、SP1の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別のSP1に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>2-3</sub>であり、SP2の各々は他とは異なる。いくつかの例では、SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>3</sub>であり、3つのSP2の2つは同じである。いくつかの例では、SP2の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別のSP2に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

10

【0136】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。

20

【0137】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

30

【0138】

いくつかの実施形態において、式(II)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、MBP、TrxA、FLAGタグ、AVIタグ、またはHisTagを含む。

【0139】

いくつかの実施形態において、式(III)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成することが本明細書で開示され、

40

【0140】

【化9】



式 III

式中、

GPCRは少なくとも1つの修飾を含むGPCRであり、

SP1は、GPCRのC末端に連結された第1の選択ポリペプチドであり、ここで、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、第1の選択剤に対して

50

耐性を有し、

S P 2 は、G P C R の N 末端に連結された第 2 の選択ポリペプチドであり、ここで、S P 2 は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にあり、第 2 の選択剤に対して耐性を有し、

L 1 は第 1 のリンカーであり、

L 2 は第 2 のリンカーであり、

x は独立して 0 - 3 であり、

y は独立して 1 - 5 であり、

z は独立して 1 - 3 であり、および、

m と n は各々独立して 0 - 60 のアミノ酸残基である。

10

【0141】

いくつかの実施形態において、修飾された G P C R は、修飾された C C R 7、C C R 10、G P R 55、N T R 1、E P 2、または E P 4 の受容体である。いくつかの実施形態では、修飾された G P C R は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾された G P C R は、約 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上の修飾を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はエラープローン P C R 法を含む。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法は D N A シャフリング法を含む。

20

【0143】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は、N 末端切断、C 末端切断、またはその組み合わせを含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、修飾された G P C R は哺乳動物の G P C R である。いくつかの実施形態では、修飾された G P C R はヒトの G P C R である。

30

【0145】

いくつかの実施形態において、第 1 の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第 1 の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第 1 の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

40

【0146】

いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第 2 の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、p y r E 遺伝子、p y r F 遺伝子、H I S 3 遺伝子、U R A 3 遺伝子、L Y S 2 遺伝子、A D E 1 - 2 遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリ

50

ホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

【0147】

いくつかの例では、SP1とSP2は同じである。他の例では、SP1とSP2は異なる。場合によっては、SP1とSP2はさらに、それぞれL1とL2によってGPCRに連結している。いくつかの例では、L1は長さが約0～約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。場合によっては、L2は長さが約0～約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。

10

【0148】

いくつかの実施形態において、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>2-3</sub>であり、SP1の各々は他とは異なる。いくつかの例では、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>3</sub>であり、3つのSP1の2つは同じである。いくつかの例では、SP1の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別のSP1に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

20

【0149】

いくつかの実施形態において、SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>2-3</sub>であり、SP2の各々は他とは異なる。いくつかの例では、SP2<sub>x</sub>はSP2<sub>3</sub>であり、3つのSP2の2つは同じである。いくつかの例では、SP2の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別のSP2に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

30

【0150】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。

40

【0151】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

【0152】

50

いくつかの実施形態において、式 ( I I I ) の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの N 末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの C 末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、 M B P、 T r x A、 F L A G タグ、 A V I タグ、または H i s T a g を含む。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態において、式 ( I V ) の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを生成することが本明細書で開示され、

【 0 1 5 4 】

【 化 1 0 】

10

SP2<sub>x</sub>-L2<sub>m</sub>-ICP<sub>y</sub>-L1<sub>n</sub>-SP1<sub>z</sub>

#### 式 IV

式中、

ICP は少なくとも 1 つの修飾を含むイオンチャネルポリペプチドであり、

SP 1 は I C P の C 末端に連結された第 1 の選択ポリペプチドであり、ここで、SP 1 は第 1 の選択剤に対して耐性を有し、

SP 2 は I C P の N 末端に連結された第 2 の選択ポリペプチドであり、ここで、SP 2 は第 2 の選択剤に対して耐性を有し、

L 1 は第 1 のリンカーであり、

L 2 は第 2 のリンカーであり、

x は独立して 0 - 3 であり、

y は独立して 1 - 5 であり、

z は独立して 1 - 3 であり、および、

m と n は各々独立して 0 - 6 0 のアミノ酸残基である。

【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された T R P V 3、K C a 3 . 1、または T R P C 6 である。いくつかの実施形態では、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、約 0 . 5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、20 %、25 %、30 %、またはそれ以上の修飾を含む。

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法はエラープローン P C R 法を含む。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発方法は D N A シャフリング法を含む。

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は挿入、欠失、または突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異はナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾は、N 末端切断、C 末端切断、またはその組み合わせを含む。

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質は哺乳動物のイオンチャネルタンパク質である。いくつかの実施形態において、修飾されたイオンチャネルタンパク質はヒトのイオンチャネルタンパク質である。

【 0 1 5 9 】

50

いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第1の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

【0160】

いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、抗生物質耐性遺伝子または栄養要求性遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドはレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態において、第2の選択ポリペプチドは、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、pyrE遺伝子、pyrF遺伝子、HIS3遺伝子、URA3遺伝子、LYS2遺伝子、ADE1-2遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいはアルカリホスファターゼ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

【0161】

いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にある。場合によっては、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分または細胞外部分にある。いくつかの例では、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。いくつかの例では、SP1は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞内部分にあり、SP2は、宿主細胞中で発現するとき、宿主細胞の細胞外部分にある。

【0162】

いくつかの例では、SP1とSP2は同じである。他の例では、SP1とSP2は異なる。場合によっては、SP1とSP2はさらに、それぞれL1とL2によってICPに連結している。いくつかの例では、L1は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。場合によっては、L2は長さが約0~約60のアミノ酸残基、例えば、長さが約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基である。

【0163】

いくつかの実施形態において、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>2-3</sub>であり、SP1の各々は他とは異なる。いくつかの例では、SP1<sub>z</sub>はSP1<sub>3</sub>であり、3つのSP1の2つは同じである。いくつかの例では、SP1の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別のSP1に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1~約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、3

10

20

30

40

50

6、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

【0164】

いくつかの実施形態において、 $SP2_x$ は $SP2_{2-3}$ であり、 $SP2$ の各々は他とは異なる。いくつかの例では、 $SP2_x$ は $SP2_3$ であり、3つの $SP2$ の2つは同じである。いくつかの例では、 $SP2$ の各々はさらに、直接的に、または、リンカーポリペプチドによって間接的に、別の $SP2$ に連結している。いくつかの例では、リンカーポリペプチドは、約1~約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基を含む。

10

【0165】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は抗生物質あるいは毒性の代謝産物を含む。いくつかの実施形態において、抗生物質は、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、あるいはテトラサイクリンを含む。いくつかの実施形態において、毒性の代謝産物は、5-

20

フルオロオロチン酸または3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを含む。

【0166】

いくつかの実施形態において、第1の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。いくつかの実施形態において、第2の選択剤は、温度の上昇、温度の低下、栄養素の不足、または補助因子の不足を含む。

【0167】

いくつかの実施形態において、式(IV)の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、タグは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのN末端、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのC末端、またはこれらの組み合わせに連結している。いくつかの実施形態において、タグは、MBP、TrxA、FLAGタグ、AVIタグ、またはHisTagを含む。

30

【0168】

無作為の突然変異誘発

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは無作為の突然変異誘発方法によって生成される。いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は、様々な機能特性を備えたタンパク質突然変異体のライブラリーを生成する方法である。例えば、無作為な突然変異は、この遺伝子の何十億もの様々なバージョンを含むライブラリーを生成するために、最初に遺伝子へ導入される。その後、この遺伝子のバージョンあるいは変異体が発現され、その後、機能についてそれぞれの発現されたタンパク質の特性を評価する。場合によっては、無作為の突然変異誘発は、エラーブローンPCR、ローリングサークル、エラーブローンPCR、突然変異誘発株、一時的突然変異誘発株、挿入突然変異誘発、エチルメタンサルホン酸、亜硝酸、あるいはDNAシャフリングを用いて達成される。場合によっては、無作為の突然変異誘発は、例えば、UV、イオン化放射能、X線、ガンマ線、あるいは、例えば、マスタードガス、シクロホスファミド、またはシスプラチンなどの化学薬品によって生成される。

40

【0169】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発はエラーブローンPCR方法を使用して達成される。場合によっては、エラーブローンPCRは、忠実度の低いポリメラーゼ(例えば、高いエラー率のポリメラーゼ)を用いるPCR方法である。場合によっては、そのようなPCR方法は、最も一般的なタイプの突然変異として点突然変異あるいは単一ヌクレオ

50

チド突然変異を備える野生型の配列の増幅中に最大で2%の誤差をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、エラープロードPCR方法によって生成される。

【0170】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発はローラーサークルエラープロードPCR方法を使用して達成される。ローリングサークルエラープロードPCRでは、例えば、野生型の配列はまずプラスミドへクローン化され、その後、全体のプラスミドはエラープロードPCR条件下で増幅される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、ローリングサークルエラープロードPCR方法によって生成される。

10

【0171】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は突然変異誘発株手法を使用して達成される。場合によっては、突然変異誘発株手法はXL1-Red(Stratagene)などの突然変異誘発株を利用し、これは、3つのDNA修復経路(mutS、mutD、およびmutT)が欠損している大腸菌株であり、したがって、複製中にエラーを引き起こす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、突然変異誘発株手法によって生成される。

【0172】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は一時的突然変異誘発株方法を使用して達成される。場合によっては、一時的突然変異誘発株方法は、3つのDNA修復経路の代わりに1つのDNA修復経路(mutD5)が欠損している。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、一時的突然変異誘発株方法によって生成される。

20

【0173】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は挿入突然変異誘発を使用して達成される。場合によっては、挿入突然変異誘発は、所望の配列の全体にわたって15の塩基配列を無作為に挿入するためにトランスポゾンベースのシステムを利用する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、挿入突然変異誘発によって生成される。

【0174】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発はエチルメタンスルホン酸(EMS)手法を使用して達成される。場合によっては、エチルメタンスルホン酸(EMS)手法は、グアニジン残基をアルキル化するために化学的なEMSを利用し、それにより、DNA複製中にそれらを不正確にコピーする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、エチルメタンスルホン酸手法によって生成される。

30

【0175】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は亜硝酸を使用して達成される。場合によっては、亜硝酸は、アデニンとシトシンの残基を脱アミノ化することによって突然変異を導入する化学的突然変異誘発要因であり、それによって、トランバージョン点突然変異を引き起こす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、亜硝酸によって生成される。

40

【0176】

いくつかの例では、無作為の突然変異誘発は亜硝酸を使用して達成される。DNAシャフリングは、ある症例には、興味のある配列あるいはDNaseIを備えた配列ライブラリーおよび自給式のPCRを使用して、任意にフラグメントを再連結することを任意に要約することによって達成される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、一時的突然変異誘発株方法によって生成される。

【0177】

非無作為の突然変異誘発

50

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、非無作為の突然変異誘発方法によって生成される。典型的な非無作為の突然変異誘発方法は、部位特異的突然変異誘発を含む。部位特異的突然変異誘発は、所望の遺伝子内の特定の変質あるいは修飾を可能にする方法である。いくつかの例では、部位特異的突然変異誘発は、カセット突然変異誘発、PCR部位特異的突然変異誘発、全プラスミド突然変異誘発、Kunkelの方法、あるいはインビボ部位特異的突然変異誘発方法を利用する。カセット突然変異誘発は、例えば、制限酵素とライゲーション方法を使用して、DNAの合成されたフラグメントをプラスミドに挿入させる。場合によっては、それは重合を含まない。いくつかの例では、PCR部位特異的突然変異誘発は、カセット突然変異誘発に似ているが、より大きなフラグメントが得られ、ゲル電気泳動によって鑄型フラグメントから分離され、その後、所望の遺伝子へらいゲとされる。Quickchange（登録商標）方法などの全プラスミド突然変異誘発は、1つ以上のプライマーを使用して突然変異を挿入することを可能にし、その後、全プラスミドを増幅する。いくつかの例では、この方法は、プラスミドが線形のフォーマットであり、PCRでのように指数関数的に増幅される必要がないという点で、PCR部位特異的突然変異誘発とは異なる。Kunkelの方法は、例えば、プライマーに基づく部位特異的な方法であり、生成物と鑄型菌株とを区別し、それにより、所望の突然変異を含むプラスミドのより容易な選択を可能にするために、DNA複製の間に細菌がウラシルを取り込むことを防ぐ酵素であるdUTPaseが欠損している大腸菌株を利用するという点で、前述の方法とは異なる。場合によっては、インビボの部位特異的突然変異誘発方法は、Delitto perfetto方法、移転（transplacement）「ポップイン・ポップアウト（pop-in pop-out）」方法、直接的な遺伝子欠失およびPCRと1つの再利用可能なマーカートをを用いる部位特異的突然変異誘発、直接的な遺伝子欠失および長いホモログ領域を使用するPCRと1つの再利用可能なマーカートをを用いる部位特異的突然変異誘発、あるいは、合成オリゴヌクレオチドを用いるインビボの部位特異的突然変異誘発を含む。

#### 【0178】

##### 発現ベクター

いくつかの実施形態において、ベクターは、真核生物源または原核生物源に由来する任意の適切なベクターを含む。場合によっては、ベクターは、細菌（例えば、大腸菌）、昆虫、酵母（例えば、ピキア・パストリス）、アルジー、あるいは哺乳動物源から得られる。典型的な細菌ベクトルはpACYC177、pASK75、pBADベクターシリーズ、pBADMベクターシリーズ、pETベクターシリーズ、pETMベクターシリーズ、pGEXベクターシリーズ、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQEベクターシリーズ、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2シリーズ、pZ A31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG AT5、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC、あるいはpTAC-MAT-2を含む。

#### 【0179】

典型的な媒介昆虫は、pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac、M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、pPolh-FLAG1またはpPolh-MAT 2などのFLAGベクター、あるいはpPolh-MAT1またはpPolh-MAT2などのMATベクターを含む。

#### 【0180】

場合によっては、酵母ベクターは、Gateway（登録商標）pDEST（商標）14ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）15ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）17ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）24ベクター、Gateway（登録商標）pYES-DEST52ベクター

10

20

30

40

50

一、pBAD-DEST49 Gateway (登録商標) デスティネーションベクター、pAO815 ピキアベクター、pFLD1 ピキ・パストリスベクター、pGAPZA、B、& C ピキア・パストリスベクター、pPIC3.5K ピキアベクター、pPIC6 A、B、& C ピキアベクター、pPIC9K ピキアベクター、pTEF1/Zeo、pYES2 酵母ベクター、pYES2/CT 酵母ベクター、pYES2/NT A、B、& C 酵母ベクター、あるいは pYES3/CT 酵母ベクターを含む。

【0181】

典型的なアルジーベクターは、pChlamy-4 ベクターまたは MCS ベクターを含む。

【0182】

哺乳動物ベクターの例は一時的発現ベクターまたは安定した発現ベクターを含む。哺乳動物の一時的発現ベクターは、例えば、p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a, b, c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a, b, c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3、または pBICEP-CMV 4 を含む。哺乳動物の安定した発現ベクターは、例えば、pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1、または pBICEP-CMV 2 を含む。

【0183】

いくつかの例では、無細胞系は、細胞からの細胞質成分および/または核成分の混合物であり、インピトロの核酸合成に使用される。場合によっては、無細胞系は、原核細胞成分または真核細胞成分のいずれかを利用する。しばしば、核酸合成は、例えば、ショウジョウバエ細胞、ツメガエル卵、または HeLa 細胞に基づく無細胞系で得られる。典型的な無細胞系としては、限定されないが、大腸菌 S30 抽出物系、大腸菌 T7 S30 系、あるいは PURExpress (登録商標) が挙げられる。

【0184】

宿主細胞

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、天然由来細胞あるいは遺伝子組み換え細胞などの任意の適切な細胞を含む。いくつかの例では、宿主細胞は産生宿主細胞である。いくつかの例では、宿主細胞は真核細胞である。他の例では、宿主細胞は原核細胞である。場合によっては、真核細胞は、真菌 (例えば、酵母菌)、動物細胞、または植物細胞を含む。場合によっては、原核細胞は細菌細胞である。細菌細胞の例はグラム陽性菌またはグラム陰性菌を含んでいる。しばしば、グラム陰性菌は嫌気性であり、桿状であり、あるいはその両方である。

【0185】

いくつかの例では、グラム陽性菌はアクチノバクテリア、ファーミキューテス、またはテネリキューテスを含む。場合によっては、グラム陰性菌は、Aquificae、ディノコッカス-サーマス、フィプロバクター-クロロピノバクテロイデス門 (FCB 群)、フゾバクテリウム、ゲンマティモナス門、ニトロスピラ門、プランクトミケス門-ヴェルコミクロビウム門/クラミジア門 (PVC グループ)、プロテオバクテリア、スピロヘータ、あるいはシネルギステス門を含む。他の細菌は、例えば、アキドバクテリウム門、クロコフレクサス門、クリシオゲネス門、シアノバクテリア、デフェリバクター門、ディクチオグロムス門、サーモデスルフォバクテリア門、またはテルモトガ門を含む。細菌細胞は、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ボツリヌス菌、あるいは大腸菌 (*Coli bacilli*) である。

10

20

30

40

50

## 【0186】

典型的な原核生物の宿主細胞としては、限定されないが、BL21、Mach1（商標）、DH10B（商標）、TOP10、DH5<sup>+</sup>、DH10Bac（商標）、OmniMax（商標）、MegaX（商標）、DH12S（商標）、INV110、TOP10F<sup>'</sup>、INV<sup>-</sup>F、TOP10/P3、ccdB<sup>-</sup>Survival、PIR1、PIR2、Stbl2（商標）、Stbl3（商標）、またはStbl4（商標）が挙げられる。

## 【0187】

いくつかの例では、動物細胞は、脊椎動物または無脊椎動物からの細胞を含む。場合によっては、動物細胞は、海の無脊椎動物、魚、昆虫、両生類、爬虫類、あるいは哺乳動物からの細胞を含む。場合によっては、真菌細胞は、ビール酵母、パン酵母、またはワイン酵母などの酵母菌を含む。

10

## 【0188】

真菌は、酵母、カビ、糸状菌、担子菌あるいは接合菌などの子囊菌を含む。いくつかの例では、酵母は子囊菌門または担子菌門を含む。場合によっては、子囊菌門がサッカロミケス亜門（真正酵母菌、例えば、ビール酵母菌）（パン酵母）あるいはタフリナ菌亜門（例えば、シゾサッカロミケス属（分裂酵母））を含んでいる。場合によっては、担子菌門は、ハラタケ亜門（例えばシロキクラゲ綱）あるいはサビキン亜門（例えばミクロボトリウム菌綱）を含んでいる。

## 【0189】

典型的な酵母あるいは糸状菌は、例えば、属：サッカロミケス、分裂酵母、カンジダ属、ピチア属、ハンゼヌラ、クリベロマイセス属、チゴサッカロミセス、ヤロウシア属、毛芽胞菌属、ロドスポリジウム、アスペルギルス属、フザリウム属、またはトリコデルマ属を含む。典型的な酵母あるいは糸状菌は、例えば、種：サッカロマイセス・セレピシエ、シゾサッカロミケス・ボンベ、カンジダ・ユチリス、カンジダボイディニ、カンジダ・アルピカンス、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ステラトイデア、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・クルセイ、カンジダ・パラシローシス、カンジダ・ギリエルモンジィ、カンジダ・ピスワナチイ、カンジダ・ルシタニエ、ロドトルラ・ムシラギノーサ、ピキア・メタノリカ、ピキア・アングスタ、ピキア・パストリス、ピキア・アノマラ、ハンゼヌラ・ポリモルファ、クリベロマイセス・ラクティス、チゴサッカロミセス・ルーキシィ、ヤロウシア・リポリティカ、トリコスポロン・ブルランス、ロドスポリジウム・トル・アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランス、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・オリゼ、トリコデルマ・リーゼイ、ヤロウシア・リポリティカ、プレタノマイセス・ブリュッセルンシス、カンジダ・ステラータ、シゾサッカロミケス・ボンベ、トルラスポラ・デルブルッキ、チゴサッカロミセス・バイリィ、クリプトコックス・ネオフォルマンズ、クリプトコッカス・ガッティ、またはサッカロマイセス・ブラウディを含む。

20

30

## 【0190】

典型的な酵母宿主細胞としては、限定されないが、GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H、およびX-33などのピキア・パストリス酵母菌株；および、INVS<sup>c</sup>1などのサッカロマイセス・セレピシエ酵母菌株が挙げられる。

40

## 【0191】

いくつかの例では、追加の動物細胞は、軟体動物、節足動物、環形動物、あるいは海綿動物から得られた細胞を含んでいる。場合によっては、追加の動物細胞は、例えば、霊長類、類人猿、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類からの哺乳動物細胞である。場合によっては、げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、ハムスター、チンチラ、ファンシーラット、またはモルモットを含む。

## 【0192】

典型的な哺乳動物の宿主細胞としては、限定されないが、293A細胞株、293FT細胞株、293F細胞、293H細胞、CHO-DG44細胞、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、Exp<sup>i</sup>293F（商標）細胞、Flp-In（商標）T-REx（商標）

50

293細胞株、Flp-In(商標)-293細胞株、Flp-In(商標)3T3細胞株、Flp-In(商標)-BHK細胞株、Flp-In(商標)-CHO細胞株、Flp-In(商標)-CV-1細胞株、Flp-In(商標)-Jurkat細胞株、FreeStyle(商標)293-F細胞、FreeStyle(商標)CHO-S細胞、Griptide(商標)293MSR細胞株、GS-CHO細胞株、HepaRG(商標)細胞、T-REx(商標)Jurkat細胞株、Per.C6細胞、T-REx(商標)-293細胞株、T-REx(商標)-CHO細胞株、およびT-REx(商標)-HeLa細胞株が挙げられる。

#### 【0193】

いくつかの例では、哺乳動物の宿主細胞は、安定した細胞株、あるいはそれ自体のゲノムに所望の遺伝物質を組み入れた細胞株であり、多くの世代の細胞分裂の後に遺伝物質の生成物を発現する能力を有する。場合によっては、哺乳動物の宿主細胞は、一時的な細胞株、あるいはそれ自体のゲノムに所望の遺伝物質を組み入れていない細胞株であり、多くの世代の細胞分裂の後に遺伝物質の生成物を発現する能力を持っていない。

10

#### 【0194】

典型的な昆虫宿主細胞としては、限定されないが、ショウジョウバエS2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、High Five(商標)細胞、およびexpressF+(登録商標)細胞が挙げられる。

#### 【0195】

いくつかの例では、植物細胞はアルジーからの細胞を含む。典型的な昆虫細胞株としては、限定されないが、クラミドモナス・レインハルディ137cまたはシネココッカスエロンガタスPPC7942からの菌株が挙げられる。

20

#### 【0196】

物理化学的性質を特徴づけるための分析技術

いくつかの実施形態において、1つ以上の分析技術が、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために利用される。上で議論されたように、物理化学的性質は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、および/または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、1つ以上の分析技術は、X線結晶学、電子結晶学、クライオ電子顕微鏡、核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR)、熱変性技術、および/または化学変性技術を含む。

30

#### 【0197】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、X線結晶学である。いくつかの例では、1つ以上の結晶化方法がタンパク質結晶を生成するために使用される。例えば、蒸気拡散法は、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのタンパク質結晶の生成のためにしばしば使用される。他のときには、脂質立方相(LCP)結晶化方法は、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのタンパク質結晶を生成するために使用される。いくつかの例では、タンパク質(例えば、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド)の結晶化は、精製されたタンパク質を、上記タンパク質を過飽和、結晶核生成、および結晶成長まで駆り立てるように意図された溶液と混合することを含む。

40

#### 【0198】

いくつかの例では、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、そのタンパク質結晶化特性、例えば、タンパク質結晶を形成する際の能力、採取可能な結晶の形成の時間、X線検出素子によって選別可能な結晶の形成の時間、まとめて融合された複数の結晶ではなく単結晶を形成する能力、および回折分解能に基づいて評価される。いくつかの例では、採取可能な結晶の形成の時間は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30日、またはそれ以上の日を含む。いくつかの例では、採取可能な、または、X線検出素子によって選別可能な結晶のサイズは、約5ミクロン、10ミクロン、15ミクロン、20ミクロン、30ミクロン、40ミクロン、50ミクロン、80ミ

50

クロン、100ミクロン、150ミクロン、200ミクロン、250ミクロン、300ミクロン、400ミクロン、またはそれ以上の直径を有する結晶を含む。いくつかの例では、回折分解能は、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2またはそれ以上の分解能である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、野生型の複数膜貫通型ポリペプチドあるいは異なる修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと比べて、例えば、タンパク質結晶を形成する際の能力、採取可能な結晶の形成の時間、X線検出素子によって選別可能な結晶の形成の時間、まとめて融合された複数の結晶ではなく単結晶を形成する能力、および回折分解能の1つ以上における、改善された特性または優れた特性を含む。

【0199】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。

【0200】

いくつかの例では、本明細書に記載される修飾されたGPCRは、そのタンパク質結晶化特性、例えば、タンパク質結晶を形成する際の能力、採取可能な結晶の形成の時間、X線検出素子によって選別可能な結晶の形成の時間、まとめて融合された複数の結晶ではなく単結晶を形成する能力、および回折分解能に基づいて評価される。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾されたGPCRは、野生型のGPCRあるいは異なる修飾されたGPCRと比べて、例えば、タンパク質結晶を形成する際の能力、採取可能な結晶の形成の時間、X線検出素子によって選別可能な結晶の形成の時間、まとめて融合された複数の結晶ではなく単結晶を形成する能力、および回折分解能の1つ以上における、改善された特性または優れた特性を含む。

【0201】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、電子結晶学である。いくつかの例では、電子結晶学は、透過電子顕微鏡(TEM)を使用して、標的ポリペプチドの原子の配置を決定する方法である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。いくつかの例では、電子結晶学(例えばTEM)は修飾されたGPCRの物理化学的性質を特徴づけるために使用される。

【0202】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、クライオ電子顕微鏡(cryo-EM)である。いくつかの例では、cryo-EMはサンプルを極低温分析するTEMの形態である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。いくつかの例では、クライオ電子顕微鏡(cryo-EM)は、修飾されたGPCRの物理化学的性質を特徴づけるために使用される。

【0203】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR)である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。いくつかの例では、NMRは修飾されたGPCRの物理化学的性質を特徴づけるために使用される。

【0204】

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、熱変性(例えば、円偏光二色性分光分析または示差走査熱量測定)である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。いくつかの例では、熱変性技術(例えば円偏光二色性分光分析または示差走査熱量測定)は、修飾されたGPCRの物理化学的性質を特徴づけるために使用される。

【0205】

10

20

30

40

50

いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの物理化学的性質を特徴づけるために使用された分析技術は、化学変性技術（例えば、尿素、グアニジン - HCl、または、短鎖洗浄薬、陰イオン洗浄剤、あるいは陽性洗浄剤などの刺激の強い洗浄薬（harsh detergent）である。いくつかの例では、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは修飾されたGPCRである。いくつかの例では、化学変性技術（例えば、尿素、グアニジン - HCl、または、短鎖洗浄薬、陰イオン洗浄剤、あるいは陽性洗浄剤などの刺激の強い洗浄薬）は、修飾されたGPCRの物理化学的性質を特徴づけるために使用される。

#### 【0206】

治療薬をスクリーニングする方法

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドから治療薬をスクリーニングするための方法とプラットフォームが本明細書で開示される。いくつかの例では、治療薬はポリペプチドまたは小分子である。いくつかの実施形態において、治療薬はポリペプチドである。他の実施形態では、治療剤は小分子である。

#### 【0207】

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して治療薬をスクリーニングする方法が本明細書に記載され、該方法は、（a）無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；（b）発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程（a）のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；（c）安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；（d）工程（c）で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；（e）第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；（f）治療薬を用いて、工程（e）の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、（g）複数膜貫通型ポリペプチド生成物と治療薬との間の結合を検知する工程、を含む。場合によっては、該方法はさらに、a）産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、上の工程（c）で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を含む、工程；（b）第3の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、（c）上に議論された工程（f）の治療薬に対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから発現された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドを決定するための分析方法によって複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの例では、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの例では、上記の工程（g）の結合は、フローサイトメトリー方法によって、酵素結合免疫吸着定量法（ELISA）、後方散乱干渉法、蛍光偏光方法、表面プラズモン共鳴（SPR）方法、プラズモン導光路共振法、核磁気共鳴（NMR）方法、等温滴定熱量測定方法、熱変性アッセイ、蛍光リガンド結合アッセイ、または放射リガンド結合アッセイによって検知される。いくつかの例では、上記の工程（g）の結合は、フローサイトメトリー方法、あるいは酵素結合免疫吸着定量法（ELISA）によって検知される。場合によっては、フローサイトメト

10

20

30

40

50

リー方法は、磁気活性化細胞選別（MACS）あるいは蛍光活性化細胞選別（FACS）を含む。

【0208】

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。場合によっては、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体（GPCR）である。場合によっては、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。

10

【0209】

ポリペプチドをスクリーニングする方法

いくつかの実施形態において、治療薬はポリペプチドである。いくつかの例では、ポリペプチドは複数膜貫通型ポリペプチドと相互に作用するポリペプチドである。場合によっては、複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。場合によっては、治療薬は、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質（例えば、イオンチャネルタンパク質）、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体と相互に作用するポリペプチドである。いくつかの例では、治療薬は受容体と相互に作用するポリペプチドである。場合によっては、受容体はイオンチャネルタンパク質である。場合によっては、治療薬はイオンチャネルタンパク質と相互に作用するポリペプチドである。場合によっては、受容体はGPCRである。場合によっては、治療薬はGPCRと相互に作用するポリペプチドである。

20

【0210】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、治療薬は抗体またはその結合フラグメントである。場合によっては、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab2、単鎖可変フラグメント（scFv）、ダイアボディ（diabody）、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体（sdAb）、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。

30

【0211】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングする方法が本明細書に記載され、該方法は、（a）無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；（b）発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程（a）のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；（c）安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在下で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；（d）工程（c）で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；（e）第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；（f）抗体またはその結合フラグメントを用いて、工程（e）の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペ

40

50

プチド生成物をインキュベートする工程；および、(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物と抗体またはその結合フラグメントとの間の結合を検知する工程、を含む。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される。場合によっては、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 Fab'、二価 Fab<sub>2</sub>、単鎖可変フラグメント (scFv)、ダイアボディ (diabody)、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 (sdAb)、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。

#### 【0212】

場合によっては、該方法はさらに、(a) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、上記の工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(b) 第3の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(c) 上に議論された工程(f)の抗体またはその結合フラグメントに対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから、発現された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドを決定するための分析方法によって複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの例では、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの例では、上記の工程(g)の結合は、フローサイトメトリー方法によって、酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA) によって、後方散乱干渉法によって、蛍光偏光方法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 方法、プラズモン導光路共振法、核磁気共鳴 (NMR) 方法、等温滴定熱量測定方法、または熱変性アッセイによって検知される。いくつかの例では、上記の工程(g)の結合は、フローサイトメトリー方法、あるいは酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA) によって検知される。場合によっては、フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別 (MACS) あるいは蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む。

#### 【0213】

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、原形質膜タンパク質、核膜タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞内膜タンパク質、輸送体、チャネルタンパク質 (例えば、イオンチャネルタンパク質)、アドヘシン、トランスロカーゼ、または受容体を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。場合によっては、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾された TRPV3、KCa3.1、または TRPC6 である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。場合によっては、修飾された GPCR は、修飾された CCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、または EP4 の受容体である。

#### 【0214】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法によって生成される抗体またはその結合フラグメントも本明細書に記載される。いくつかの例では、重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 の配列と、軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列とを含む、単離および精製された抗体またはその結合フラグメントが本明細書に記載され、ここで、重鎖と軽鎖の CDR は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと相互作用し、および、ここで、抗体またはその結合フラグメントは以下のプロセスによって生成される：(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベ

10

20

30

40

50

クターが、工程 ( a ) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドの C 末端に動作可能に連結された第 1 の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドの N 末端に動作可能に連結された第 2 の選択マーカー遺伝子とを含む、工程 ; ( c ) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも 1 つの選択剤の存在または不在で第 1 の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第 1 のセットを発現させる工程 ; ( d ) 工程 ( c ) で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程 ; ( e ) 第 2 の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程 ; ( f ) 抗体のセットまたはその結合フラグメントを用いて、工程 ( e ) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程 ; および、 ( g ) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物に特異的に結合する抗体またはその結合フラグメントを選択する工程、を含む。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F a b '、二価 F a b 2、単鎖可変フラグメント ( s c F v )、ダイアボディ ( d i a b o d y )、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 ( s d A b )、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャンネルタンパク質である。いくつかの例では、修飾されたイオンチャンネルタンパク質は、修飾された T R P V 3、K C a 3 . 1、または T R P C 6 である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 ( G P C R ) である。いくつかの例では、修飾された G P C R は、修飾された C C R 7、C C R 1 0、G P R 5 5、N T R 1、E P 2、または E P 4 の受容体である。

#### 【 0 2 1 5 】

いくつかの例では、宿主細胞は、原核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、または昆虫宿主細胞である。場合によっては、第 1 の複数の宿主細胞は、原核生物宿主細胞を含む。場合によっては、原核生物宿主細胞は大腸菌細胞である。場合によっては、第 2 の複数の宿主細胞は哺乳動物宿主細胞または昆虫宿主細胞を含む。

#### 【 0 2 1 6 】

「抗体」と「免疫グロブリン」 ( I g s ) は同じ構造的な特徴を有する糖タンパク質である。これらの用語は同じ意味で使用される。いくつかの例では、免疫グロブリンの抗原特異性は知られている。

#### 【 0 2 1 7 】

用語「抗体」は最も広い意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、抗原に結合することができる抗体フラグメント (例えば、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、単鎖抗体、ダイアボディ、抗体キメラ、ハイブリッド抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体など)、および前述のものを含む組み換えペプチドを包含する。

#### 【 0 2 1 8 】

本明細書で使用されるような「モノクローナル抗体」や「m A b」との用語は、抗体の実質的に均質の集団から得られた抗体を指し、つまり、上記集団を含む個々の抗体は、少量で存在することがある起こりうる自然発生の突然変異を除けば同一である。

#### 【 0 2 1 9 】

「天然の抗体」と「免疫グロブリン」は通常、2つの同一の軽 ( L ) 鎖と2つの同一の重 ( H ) 鎖から構成される、約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。軽鎖はそれぞれ1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合するが、ジスルフィド結合の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。重鎖と軽鎖はそれぞれ規則的に距離をおいた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は一方の端部に可変ドメイン ( V H ) とその後の多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は一方の端部に可変ドメ

10

20

30

40

50

イン ( V L ) を、もう一方の端部に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第 1 の定常ドメインと位置合わせされ、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと位置合わせされる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変領域の間で境界面を形成すると考えられている。

#### 【 0 2 2 0 】

用語「可変」とは、可変ドメインのある部分が抗体中で配列が大きく異なるという事実を指す。可変領域は抗原結合特異性を与える。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメイン全体に均一に分布していない。それは、軽鎖と重鎖の可変ドメイン中の相補性決定領域 ( C D R ) または超可変領域、その両方の 3 つのセグメントに集中している。可変ドメインの高度に保存された部分はフレームワーク ( F R ) 領域と呼ばれる。天然の重鎖と軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、ループ接続を形成し、場合によっては、 $\beta$ -ブリーツシート構造の一部を形成する、3 つの C D R により接続された、 $\beta$ -ブリーツシート構造を採用している 4 つの F R 領域を含む。各鎖における C D R は、他方の鎖からの C D R とともに、F R 領域によって近接してまとめられ、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常ドメインは抗体を抗原に結合することに直接関与しないが、F c 受容体 ( F c R ) 結合、抗体依存性の細胞の毒性への抗体の関与、補体依存性細胞傷害の開始、およびマスト細胞脱顆粒などの様々なエフェクター機能を示す。

10

#### 【 0 2 2 1 】

用語「超可変領域」は、本明細書で使用する時、抗原結合の原因となる抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補的決定領域」または「C D R」(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基 2 4 - 3 4 ( L 1 )、5 0 - 5 6 ( L 2 )、および 8 9 - 9 7 ( L 3 ) と、重鎖可変ドメイン中の残基 3 1 - 3 5 ( H 1 )、5 0 - 6 5 ( H 2 )、および 9 5 - 1 0 2 ( H 3 ) ; K a b a t e t a l . ( 1 9 9 1 ) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d . ) からのアミノ酸残基、および/または、「超可変ループ」(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基 2 6 - 3 2 ( L 1 )、5 0 - 5 2 ( L 2 )、および、9 1 - 9 6 ( L 3 ) と、重鎖可変ドメイン中の残基 ( H 1 )、5 3 - 5 5 ( H 2 )、および 9 6 - 1 0 1 ( H 3 ) ; C l o t h i a a n d L e s k , ( 1 9 8 7 ) J . M o l . B i o l . , 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 ) からの残基を含む。本明細書で認められるように、「フレームワーク」あるいは「F R」残基は、超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。

20

30

#### 【 0 2 2 2 】

「抗体フラグメント」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、F a b、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、および F v フラグメント；ダイアボディ；線形の抗体；( Z a p a t a e t a l . ( 1 9 9 5 ) P r o t e i n E n g . 1 0 : 1 0 5 7 - 1 0 6 2 ) 単鎖抗体分子；および、抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が挙げられる。抗体のパイン消化は、各々が単一の抗原結合部位を有する「F a b」フラグメントと呼ばれる 2 つの同一の抗原結合性フラグメントと、その名前が容易に結晶させる能力を反映している残基「F c」フラグメントを生成する。ペプシン処置により、2 つの抗原結合部位を有するとともに依然として抗原を架橋結合することができる F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントが生成される。

40

#### 【 0 2 2 3 】

「F v」は、完全抗原認識部位および結合部位を含む最小限の抗体フラグメントである。この領域は、緊密な非共有結合性会合中の 1 つの重鎖と 1 つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。V H - V L 二量体の表面上の抗原結合部位を定義するために、それぞれの可変ドメインの 3 つの C D R が相互作用するのはこの構造内においてである。まとめて、6 つの C D R が抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、全結合部位よりも親和性は低い、1 つの可変ドメインでも ( または、抗原に特異的なわずかな 3 つの C D R しか含まない F v の半分 )、抗原を認識して結合する能力を有している。

50

## 【0224】

F a bフラグメントはさらに、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1の定常ドメイン（C H 1）を含む。F a bフラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に少数の残基を加えることでF a b'フラグメントとは異なる。F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するF a b'に関する本明細書での命名である。F a b'フラグメントは、F（a b'）<sub>2</sub>フラグメントの重鎖ジスルフィド架橋を還元することにより生成される。抗体フラグメントの他の化学的結合も知られている。

## 【0225】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ（ $\kappa$ ）とラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる、2つの明らかに異なるタイプの1つに割り当て可能である。

10

## 【0226】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンを様々なクラスに割り当てることができる。5つの主要なクラスのヒト免疫グロブリン：I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mがあり、これらのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2に分けることもある。様々なクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。様々なクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と三次元構造は周知である。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有する。例えば、ヒトI g G 1とI g G 3アイソタイプはA D C C（抗体依存性細胞傷害）活性を有する。

20

## 【0227】

## ファージディスプレイ

いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントはファージディスプレイ方法によって生成される。いくつかの例では、結合抗体を示す1010のファージ変異体を利用される。いくつかの例では、選択プロセスで同定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補は、哺乳動物細胞株（例えば、安定した哺乳動物細胞株）で発現され、そこから、発現されたポリペプチドは精製され、ナノ粒子に固定されるか、あるいは、表面（例えばプレートのコーティングされた表面）へ固定される。いくつかの例では、発現されたポリペプチドは、ナノ粒子に固定される。いくつかの例では、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子、超常磁性のナノ粒子、金属ナノ粒子、または無機のナノチューブを含む。いくつかの例では、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子である。いくつかの例では、ナノ粒子は、例えば、ストレプトアビジンタグ、ビオチンタグなどの反応的なタグ、あるいは本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに共役することができる反応的な部分でさらに誘導体化される。

30

## 【0228】

いくつかの例では、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む固定されたナノ粒子は、その後、ファージライブラリーに対してスクリーニングされ、ここでは、例えば、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド標的に対する選択的な親和性を備えた抗体を表示するファージを単離させるために磁気分離を使用する。いくつかの例では、濃縮されたファージ集団はクローン単離物へ分離され、ファージでコードされた抗体遺伝子が配列決定され、産生のために哺乳動物の発現ベクターへクローン化される。

40

## 【0229】

いくつかの例では、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、1つ以上の方法が利用される。

## 【0230】

いくつかの例では、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、フロー

50

サイトメトリー方法が利用される。場合によっては、フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別 (MACS) あるいは蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む。場合によっては、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA) が利用される。

#### 【0231】

場合によっては、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、例えば、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド標的に対する選択的な親和性を備えた抗体を表示するファージを単離させるために磁気分離を使用するファージライブラリーに対してスクリーニングする前に、リボソーム、例えば、リボソームカプセル化ナノ粒子とともに (例えば、ポリマーアンフィポール (Amphipol) (A8-35) とともに) さらに製剤される。

10

#### 【0232】

いくつかの例では、ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、グリフィン-1ライブラリー (H Griffin, MRC, Cambridge, UK)、Tomlinson Iライブラリー、または、Schofield, et al., "Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization," に記載されるライブラリーなどを含む。

20

#### 【0233】

##### 酵母ディスプレイ

いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは酵母ディスプレイ方法によって生成される。いくつかの例では、酵母表面ディスプレイは、哺乳動物の (例えばヒト) のタンパク質の折り畳みと翻訳後の修飾を促し、さらに蛍光活性化細胞選別 (FACS) を使用して定量的かつ視覚的な選別を可能にする真核生物発現装置を含む。いくつかの例では、酵母ディスプレイ・システムは酵母サッカロマイセス・セレビスエを利用する。

#### 【0234】

いくつかの例では、選択プロセスで同定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補が発現され、精製され、その後、ナノ粒子に固定されるか、あるいは表面 (例えば、プレートのコーティングされた表面) へ固定される。いくつかの例では、発現されたポリペプチドは、ナノ粒子に固定される。いくつかの例では、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子、超常磁性のナノ粒子、金属ナノ粒子、または無機のナノチューブを含む。いくつかの例では、ナノ粒子は常磁性のナノ粒子である。いくつかの例では、ナノ粒子は、例えば、ストレプトアビジンタグ、ビオチンタグなどの反応的なタグ、あるいは本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに共役することができる反応的な部分でさらに誘導体化される。

30

#### 【0235】

いくつかの例では、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む固定されたナノ粒子は、その後、酵母ディスプレイライブラリーに対してスクリーニングされ、ここでは、例えば、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド標的に対する選択的な親和性を備えた抗体を表示する酵母を単離させるために磁気分離を使用する。

40

#### 【0236】

いくつかの例では、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、1つ以上の方法が利用される。いくつかの例では、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、フローサイトメトリー方法が利用される。場合によっては、フローサイトメトリー方法は、磁気活性化細胞選別 (MACS) あるいは蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む。場合によっては、本明細書に記載される固定された修飾された複数膜貫通型

50

ポリペプチドに結合された抗体またはその結合フラグメントをスクリーニングするために、酵素結合免疫吸着定量法 (E L I S A) が利用される。

【0237】

F A C S は比較的小規模な細胞集団の選択に制限される。大きなライブラリーの効率的な選択については、ライブラリーを F A C S が分類することができるサイズにするために、磁気活性化された細胞選別 (M A C S) の追加の工程が必要となる。ファージと比較して、比較的大量の酵母細胞と低いライブラリー密度 (10<sup>9</sup> 細胞/ml) を考慮すると、約 1 × 10<sup>10</sup> 実体のライブラリーを効率的に選択するためには、数十~数百ミリメートルの出発酵母とともに、複数の並列の M A C S と F A C S のプロセスが必要となる。

【0238】

いくつかの実施形態において、酵母ディスプレイ抗体ライブラリーの例は、F e l d h a u s e t a l . , " F l o w - c y t o m e t r i c i s o l a t i o n o f h u m a n a n t i b o d i e s f o r m a n o n i m m u n e S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e s u r f a c e d i s p l a y l i b r a r y , " 21 (2) : 163 - 170 (2003) ; W e a v e r - F e l d h a u s e t a l . , " Y e a s t m a t i n g f o r c o m b i n a t o r i a l F a b l i b r a r y g e n e r a t i o n a n d s u r f a c e d i s p l a y , " 564 (1 - 2) : 24 - 34 (2004) に記載されているものを含む。

【0239】

ポリペプチドをスクリーニングする追加の方法

いくつかの実施形態において、追加の方法は、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補をスクリーニングするために使用される。いくつかの例では、追加の方法は、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生し、および、その後、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補に対してスクリーニングする工程を含む。場合によっては、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ) に、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドフラグメントを、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原を発現する培養細胞を、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを発現する樹状細胞を、樹状細胞由来のエキソソームを、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補を含む組み換えの細胞外パキウロウィルスの発芽ウイルス形態を、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補を含む細胞膜を、あるいは精製された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド候補を、接種する工程を含む。

【0240】

場合によっては、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドフラグメントを、哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ) に接種する工程を含む。いくつかの例では、ポリペプチドフラグメントは、長さが約 15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、ポリペプチドフラグメントは G P C R フラグメントを含む。いくつかの例では、G P C R フラグメントは、N 末端部分、C 末端部分、1 つ以上の T M コア、エキソループ (e x o l o o p) 、細胞内ループ、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、該方法は、ポリペプチドフラグメント (例えば、G P C R フラグメント) に対する抗体を収穫および精製する工程をさらに含む。

【0241】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原を発現する培養細胞を、哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ) に接種する工程を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原は、修飾された G P C R 抗原である。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾された G P C R を発現する培養細胞を、哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ) に接種する工程

10

20

30

40

50

を含む。いくつかの例では、該方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原（例えば、修飾されたGPCR抗原）に対する抗体を収穫および精製する工程をさらに含む。

【0242】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド発現樹状細胞を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、樹状細胞は修飾されたGPCRを発現する。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾されたGPCR発現樹状細胞を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、上記方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド発現樹状細胞（例えば、修飾されたGPCR発現樹状細胞）に対する抗体を収穫および精製する工程をさらに含む。

10

【0243】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、樹状細胞由来のエキソソームを、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、樹状細胞由来のエキソソームは、抗原特異性のB細胞抗体応答の活性化を誘発する抗原（例えば、複数膜貫通型ポリペプチド抗原）を含む。場合によっては、樹状細胞由来のエキソソームは、複数膜貫通型ポリペプチド抗原を含む。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原は、修飾されたGPCR抗原である。場合によっては、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、GPCR抗原を発現する樹状細胞由来のエキソソームを、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、該方法は、樹状細胞由来のエキソソームに対する抗体を採取および精製する工程をさらに含む。

20

【0244】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含有する組み換えの細胞外バキュロウィルスの発芽ウイルス形態を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原は、修飾されたGPCRである。場合によっては、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾されたGPCRを含有する組み換えの細胞外バキュロウィルスの発芽ウイルス形態を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、該方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、修飾されたGPCR）を含有する組み換えの細胞外バキュロウィルスの発芽ウイルス形態に対する抗体を、収穫および精製する工程をさらに含む。

30

【0245】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む細胞膜を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原は、修飾されたGPCRである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、修飾されたGPCRを含む培養膜を、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、該方法は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、修飾されたGPCR）を含む細胞膜に対する抗体を、収穫および精製する工程をさらに含む。

40

【0246】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、精製された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド抗原は、修飾されたGPCRである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントを生成または産生する方法は、精製された修飾されたGPCRを、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、あるいはウサギ）に接種する工程を含む。いくつかの例では、該方法は、精製された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、精製された修飾

50

されたGPCR)に対する抗体を、収穫および精製する工程をさらに含む。

【0247】

小分子をスクリーニングする方法

いくつかの実施形態において、治療薬は小分子である。場合によっては、小分子は薬物または小分子フラグメントである。いくつかの例では、薬物は治療効果を示す分子（例えば、化学分子または生物製剤）である。他の例では、薬物は治療効果を示さない分子（例えば、化学分子または生物製剤）である。いくつかの例では、本明細書に記載される治療薬は、治療効果を示す薬物（例えば、化学分子または生物製剤）である。他の例では、本明細書に記載される治療薬は、治療効果を示さない薬物（例えば、化学分子または生物製剤）である。

10

【0248】

いくつかの実施形態において、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対して小分子をスクリーニングする方法が本明細書に記載され、該方法は、(a)無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b)発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカ遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカ遺伝子とを含む、工程；(c)安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(d)工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；(e)第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；(f)小分子を用いて、工程(e)の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、(g)複数膜貫通型ポリペプチド生成物と小分子との間の結合を検知する工程、を含む。

20

【0249】

場合によっては、該方法はさらに、(a)産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、上記の工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(b)第3の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(c)上に議論された工程f)の小分子に対してスクリーニングするために、物理化学的性質が増強または改善したセットから発現された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドを決定するための分析方法によって複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの例では、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの例では、上記の工程g)の結合は、等温滴定熱量測定、表面プラズモン共鳴(SPR)、後方散乱干渉法、核磁気共鳴(NMR)方法、蛍光偏光方法、プラズモン導光路共振法、蛍光リガンド結合アッセイ、放射リガンド結合アッセイなどの分析技術によって検知される。

30

40

【0250】

いくつかの例では、小分子は小分子フラグメントである。場合によっては、小分子フラグメントは非天然発生分子である。場合によっては、小分子フラグメントは、天然および/または非天然のペプチドフラグメント、あるいは哺乳動物の身体内で自然に生成される小分子（例えば、代謝産物）を含まない。

50

## 【0251】

いくつかの例では、小分子フラグメントは、約100ダルトン以上の分子量を含む。いくつかの実施形態において、小分子フラグメントは、約120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000ダルトン以上の分子量を含む。

## 【0252】

いくつかの例では、小分子フラグメントはマイクロモル濃度あるいはミリモル濃度の結合親和性を含む。いくつかの例では、小分子フラグメントは、約1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M、500 $\mu$ M、1mM、10mM、あるいはそれ以上の結合親和性を含む。

10

## 【0253】

場合によっては、小分子フラグメントは高いリガンド効率(LE)を有する。リガンド効率は、リガンドの、その結合パートナー(例えば、GPCR)に対する1つの原子当たりの結合エネルギーの測定値である。いくつかの例では、リガンド効率は、化合物(N)の非水素原子の数に対するギブスの自由エネルギー(-G)の比率として定義される：

$$LE = (-G) / N.$$

## 【0254】

場合によっては、LEは以下のようにも配される：

$$LE = 1.4 (-\log IC_{50}) / N.$$

20

## 【0255】

いくつかの例では、LEスコアは、約0.3 kcal mol<sup>-1</sup> HA<sup>-1</sup>、約0.35 kcal mol<sup>-1</sup> HA<sup>-1</sup>、約0.4 kcal mol<sup>-1</sup> HA<sup>-1</sup>、あるいはそれ以上である。

## 【0256】

いくつかの実施形態において、小分子フラグメントは3の法則(the Rule of 3)に基づいて設計されている。いくつかの実施形態において、3の法則は、約3以下の無極性溶媒-極性溶媒(例えば、オクタノール-水)分配係数対数P、約300ダルトン以下の分子量、約3以下の水素結合供与体、約3以下の水素結合受容体、および約3以下の回転可能な結合を含む。

30

## 【0257】

いくつかの実施形態において、小分子フラグメントは、小分子フラグメントをそれ以上最適化することなく投与される治療薬としては不適切な薬物動態パラメータをさらに含む。いくつかの例では、治療薬として適切な薬物動態パラメータは、米国食品医薬品局(FDA)のガイドラインに沿った、あるいは米国外の同等の食品医薬品局のガイドラインに沿ったパラメータを含む。いくつかの例では、薬物動態パラメータは、ピーク血漿濃度(C<sub>max</sub>)、治療薬の最低濃度(C<sub>min</sub>)、分布容積、C<sub>max</sub>到達時間、排出半減期、クリアランスなどを含む。いくつかの実施形態において、小分子フラグメントの薬物動態パラメータは、FDAのガイドラインによって、あるいは米国外の同等の食品医薬品局のガイドラインによって設定されたパラメータの外にある。いくつかの例では、当業者は、本明細書に記載される小分子フラグメントの薬物動態パラメータを考慮すれば、これらの小分子フラグメントがそれ以上の最適化を行わなければ治療薬としては不適切であるということを理解する。

40

## 【0258】

いくつかの例では、典型的な小分子フラグメントの例としては、限定されないが、ChemBridge fragment library、Pyramid Platform Fragment-Based Drug Discovery、Maybridge fragment library、FRGx from AnalytiCon、TCI-Frag from AnCoreX、Bio Building Bloc

50

ks from ASINEX、BioFocus 3D from Charles River、Fragments of Life (FOL) from Emerald Bio、Enamine Fragment Library、IOTA Diverse 1500、BIONET fragments library、Life Chemicals Fragments Collection、OTAVA fragment library、Prestwick fragment library、Selcia fragment library、TimTec fragment-based library、Allium from Vitas-M Laboratory、またはZenobia fragment libraryが挙げられる。

【0259】

ワクチン

いくつかの実施形態において、ワクチンと、本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに基づいたワクチン製剤が本明細書にさらに記載されている。いくつかの例では、ワクチンは、生の弱毒化した病原体、あるいは、例えば、化学製品、熱、放射線によって不活性化された不活性化病原体から調製される。いくつかの例では、ワクチンは、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのサブユニットまたは一部を含み、上記サブユニットまたは一部は随意に共役される。いくつかの例では、ワクチンは、ペプチドベースのワクチン、核酸ベースのワクチン、抗体ベースのワクチン、あるいは抗原提示細胞ベースのワクチンとして調製される。

【0260】

いくつかの例では、ワクチンは、薬学的に使用される調製物への活性化化合物の処理を促す賦形剤と助剤を含む1つ以上の生理学的に許容可能な担体を使用して、従来のやり方で製剤される。適切な製剤は、選択される投与の経路に依存する。周知の技術、担体、および賦形剤のいずれかが、適切なものとして、および当該技術で理解されているように使用される。

【0261】

場合によっては、ワクチンは、ペプチドベースのワクチン、核酸ベースのワクチン、抗体ベースのワクチン、あるいは細胞ベースのワクチンとして製剤される。例えば、ワクチン組成物はしばしば、カチオン性脂質製剤の中にネイキッドcDNA；リボペプチド（例えば、Vitiello, A. et al., J. Clin. Invest. 95: 341, 1995）、ネイキッドcDNAまたはペプチド、例えば、ポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)（「PLG」）中にカプセル化されたマイクロスフェア（例えば、Eldridge, et al., Molec. Immunol. 28: 287-294, 1991; Alonso et al, Vaccine 12: 299-306, 1994; Jones et al, Vaccine 13: 675-681, 1995を参照）；免疫刺激複合体（ISCOMS）中に含まれるペプチド組成物（例えば、Takahashi et al, Nature 344: 873-875, 1990; Hu et al, Clin Exp Immunol. 113: 235-243, 1998を参照）；あるいは、複数の抗原ペプチドシステム（MAP）（例えば、Tam, J. P., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 85: 5409-5413, 1988; Tarn, J. P., J. Immunol. Methods 196: 17-32, 1996を参照）。しばしば、ワクチンは、ペプチドベースのワクチン、あるいは核酸ベースのワクチンとして製剤され、ここで、核酸は、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする。しばしば、ワクチンは抗体ベースのワクチンとして製剤される。しばしば、ワクチンは細胞ベースのワクチンとして製剤される。

【0262】

抗体ベースのワクチン

いくつかの実施形態において、ワクチンは抗体ベースのワクチンである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通

10

20

30

40

50

型ポリペプチドに結合する。いくつかの例では、ワクチンは、重鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 の配列と、軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列とを含む、単離および精製された抗体またはその結合フラグメントを含み、ここで、重鎖と軽鎖の C D R は、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドと相互作用し、および、ここで、抗体またはその結合フラグメントは以下のプロセスによって生成される：(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b) 発現ベクターの第 1 のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程 (a) のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドの C 末端に動作可能に連結された第 1 の選択マーカ遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドの N 末端に動作可能に連結された第 2 の選択マーカ遺伝子とを含む、工程；(c) 安定的に折り置かれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも 1 つの選択剤の存在または不在で第 1 の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第 1 のセットを発現させる工程；(d) 工程 (c) で同定された安定的に折り置かれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り置かれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む産生ベクターを生成する工程；(e) 第 2 の複数の宿主細胞中の産生ベクターを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；(f) 抗体のセットまたはその結合フラグメントを用いて、工程 (e) の産生ベクターから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物をインキュベートする工程；および、(g) 複数膜貫通型ポリペプチド生成物に特異的に結合する抗体またはその結合フラグメントを選択する工程、を含む。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ法によって生成される。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャンネルタンパク質である。いくつかの例では、修飾されたイオンチャンネルタンパク質は、修飾された T R P V 3、K C a 3 . 1、または T R P C 6 である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾された G タンパク質共役受容体 ( G P C R ) である。いくつかの例では、修飾された G P C R は、修飾された C C R 7、C C R 1 0、G P R 5 5、N T R 1、E P 2、または E P 4 の受容体である。いくつかの例では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの例では、アジュバントは G M - C S F を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0263】

いくつかの例では、抗体ベースのワクチンは、周知の技術、担体、および賦形剤のいずれかを用いて、適切に、かつ、当該技術分野で理解されるとおりに製剤される。上記のように、抗体またはその結合フラグメントは、例えば、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F a b '、二価 F a b 2、単鎖可変フラグメント ( s c F v )、ダイアボディ ( d i a b o d y )、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体 ( s d A b )、あるいはラクダ科抗体、またはその結合フラグメントを含む。いくつかの例では、抗体は、自然抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または抗体フラグメントである。場合によっては、モノクローナル抗体は、任意の適切な種、例えば、ネズミ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、またはヒトのモノクローナル抗体から得られる。

#### 【0264】

##### 核酸ベースのワクチン

いくつかの実施形態において、ワクチンは核酸ベースのワクチンとして製剤される。いくつかの例では、核酸ベースのワクチンは、周知の技術、担体、および賦形剤のいずれかを用いて、適切に、かつ、当該技術分野で理解されるとおりに製剤される。場合によっては、核酸は、D N A、ゲノムと c D N A、R N A の両方、またはハイブリッドであり、核酸は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドの組み合わせ、および、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン・ヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンを含む塩基の組み合わせを含んでいる。場合によっては、核酸が化学合成方法、あるいは組み換え法によって得られる。いくつかの例では、

ワクチンは、DNAベースのワクチン、RNAベースのワクチン、ハイブリッドDNA/RNAベースのワクチン、あるいはハイブリッド核酸/ペプチドベースのワクチンである。

【0265】

場合によっては、本明細書に記載される核酸ベースのワクチンは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは以下のプロセスによって生成される：(a)無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b)発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；(c)安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(d)産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(e)第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(f)ワクチンの生成のために物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程e)の産生ベクターの第2のセットから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの例では、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの例では、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの例では、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの例では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの例では、アジュバントはGM-CSFを含む。

【0266】

いくつかの例では、本明細書で使用されるような核酸分子は、ともに共有結合した少なくとも2つのヌクレオチドを指す。本明細書に記載される核酸は、例えば、リン酸ジエステル結合を含むが、場合によっては、(例えば、プライマーや標識プローブなどのプローブの構造において)以下に概説されるように、例えば、代替的なバックボーンを有する核酸アナログが含まれ、例えば、ホスホラミド(Beaucage et al., Tetrahedron 49(10):1925(1993)およびこれに記載の文献； Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800(1970)； Sprinzel et al., Eur. J. Biochem. 81:579(1977)； Letsinger et al., Nucl. Acid Res. 14:3487(1986)； Sawai et al., Chem. Lett. 805(1984)； Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470(1988)； および、 Pauwels et al., Chémica Scripta 26:141(1986)； および、 Mag et al., Nucleic Acid

10

20

30

40

50

s Res. 19:1437 (1991); および U.S. Pat. No. 5,644,048), ジチオリン酸 (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989), O-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press を参照), および、ペプチド核酸 (“PNA” としても知られている) 骨格および結合 (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 (1992); Nielsen, Nature, 365:566 (1993); Carlsson et al., Nature 380:207 (1996) を参照) である。他のアナログ核酸は、ロック核酸 (本明細書では「LNA」とも呼ばれる)、Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc. 120.13252 3 (1998); 陽性の骨格 (positive backbones) (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); 非イオン性骨格 (non-ionic backbones) (U.S. Pat. Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)), および、U.S. Pat. Nos. 5,235,033 および 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook に記載されるものを含む非リボース骨格 (non-ribose backbones) を含んでいる二環式の構造を有するものを含む。1つ以上の炭素環式糖を含む核酸も、核酸の定義内に含まれる (Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169 176 を参照)。いくつかの核酸アナログは Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 page 35 に記載されている。「ロック核酸」も核酸アナログの定義内に含まれる。LNA は、リボース環が 2'-O 原子を C-4' 原子に結合するメチレン架橋によりロックされている、核酸アナログのクラスである。リボース-リン酸塩骨格のこれらの修飾は、生理的環境でこうした分子の安定性と半減期を増加させるために行うことができる。例えば PNA:DNA と LNA-DNA のハイブリッドは、より高い安定性を示すことがあり、ゆえに、いくつかの実施形態において使用することができる。標的核酸は指定されるとおりに一本鎖または二本鎖であってもよく、あるいは二本鎖または一本鎖の両方の配列の一部を含むことができる。用途によっては、核酸は、DNA (例えば、ゲノム DNA、ミトコンドリア DNA、および cDNA を含む)、RNA (例えば、mRNA と rRNA を含む)、またはハイブリッドであり得るが、核酸はデオキシリボ-ヌクレオチドとリボ-ヌクレオチドの任意の組み合わせ、および、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キササニン (xathanine) ヒボキササニン (hyp

10

20

30

40

50

oxathanine)、イソシトシン、イソグアニンなどを含む塩基の任意の組み合わせを含んでいる。

【0267】

いくつかの例では、ベクターは円形のプラスミドまたは線形の核酸である。場合によっては、円形のプラスミドまたは線形の核酸は、適切な被験体の細胞の特定のヌクレオチド配列の発現を導くことができる。場合によっては、ベクターは、終結シグナルに動作可能に連結されるポリペプチドコードヌクレオチド配列に動作可能に連結されるプロモーターを有する。いくつかの例では、ベクターはさらに、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要とされる配列を含む。所望のヌクレオチド配列を含むベクターはキメラであり得、このことは、その成分の少なくとも1つがその他の成分の少なくとも1つに対して異種であることを意味する。発現カセット中のヌクレオチド配列の発現は、宿主細胞が特定の外部刺激にさらされるときのみに転写を開始することができる構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターにより制御可能である。

10

【0268】

いくつかの例では、ベクターはプラスミドである。場合によっては、プラスミドがポリペプチドをコードする核酸を細胞にトランスフェクトするのに役立ち、変形した宿主細胞は、ポリペプチドの発現が行われる条件下で培養および維持可能である。

【0269】

いくつかの例では、プラスミドは、本明細書に開示された修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの1つ以上をコードする核酸配列を含む。単一のプラスミドは、例えば、単一のポリペプチドのためのコード配列、あるいは1つを超えるポリペプチドのためのコード配列を含む。しばしば、プラスミドは、免疫刺激分子またはサイトカインなどのアジュバントをコードするコード配列をさらに含む。いくつかの例では、プラスミドはさらに、開始コドン、終止コドン、コード配列に動作可能に連結されるプロモーター、およびコード配列の上流のエンハンサーを含む。

20

【0270】

いくつかの例では、プラスミドは、プラスミドを染色体外に維持し、かつ細胞中のプラスミドの複数のコピーを生成するために、哺乳動物起源の複製を含む。プラスミドはInvitrogen (San Diego, CA)からのpVAX1、pCEP4、あるいはpREP4であり得る。

30

【0271】

いくつかの例では、プラスミドは制御配列をさらに含み、これは、プラスミドが投与される細胞中での遺伝子発現を可能にする。場合によっては、コード配列は、宿主細胞中のコード配列のより効率的な転写を可能にするコドンをさらに含む。

【0272】

典型的なプラスミドは、大腸菌(E. coli)でのタンパク質生成に使用することができるpSE420 (Invitrogen, San Diego, CA); 酵母のサッカロマイセス・セレビシエ菌株でのタンパク質生成に使用されるpYES2 (Invitrogen, San Diego, CA); 昆虫細胞でのタンパク質生成に使用されるMAXBAC (商標)完全バキュロウイルス発現系 (Invitrogen, San Diego, CA); および、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの哺乳動物細胞でのタンパク質生成に使用されるpcDNA1、またはpcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA)を含む。

40

【0273】

いくつかの例では、ベクターは円形のプラスミドであり、これは、細胞のゲノムへ統合することにより、または染色体外に存在する(例えば、複製開始点を有するプラスミドを自律的に複製することにより、標的細胞を変形する。典型的なベクターとしては、pVAX、pcDNA3.0、またはprovax、あるいは、抗原をコードするDNAを発現することができ、細胞が免疫系によって認識される抗原へと配列を翻訳することを可能にする他の発現ベクターが挙げられる。

50

## 【0274】

いくつかの例では、核酸ベースのワクチンは線形の核酸ワクチンまたは線形の発現カセット) (「LEC」) であり、電気穿孔法によって被験体に効率的に送達可能であり、かつ、本明細書に開示された1つ以上のポリペプチドを発現することができる。LECは任意のリン酸塩骨格が欠けている任意の線形のDNAであり得る。DNAは本明細書に開示された1つ以上のポリペプチドをコードすることができる。LECはプロモーター、イントロン、終止コドン、および/またはポリアデニル化シグナルを含むことができる。ポリペプチドの発現はプロモーターによって制御されてもよい。場合によっては、LECは抗生物質耐性遺伝子および/またはリン酸塩骨格を含まない。場合によっては、LECはポリペプチド発現と無関係の他の核酸配列を含まない。

10

## 【0275】

## ペプチドベースのワクチン

しばしば、ワクチンは細胞ベースのワクチンとして製剤される。場合によっては、本明細書に記載されたペプチドベースのワクチンは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含み、ここで、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは以下のプロセスによって生成される：(a) 無作為の突然変異誘発方法によって修飾された複数膜貫通型ポリペプチドライブラリーを生成する工程；(b) 発現ベクターの第1のセットを生成する工程であって、各発現ベクターが、工程(a)のライブラリーからの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドのC末端に動作可能に連結された第1の選択マーカー遺伝子と、随意に、ポリヌクレオチドのN末端に動作可能に連結された第2の選択マーカー遺伝子とを含む、工程；(c) 安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットを選択するために、少なくとも1つの選択剤の存在または不在で第1の複数の宿主細胞中の発現ベクターの第1のセットを発現させる工程；(a) 産生ベクターの第2のセットを生成する工程であって、ここで、各産生ベクターは、工程(c)で同定された安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドのセットからの安定的に折り畳まれた複数膜貫通型ポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；(e) 第2の複数の宿主細胞中の産生ベクターの第2のセットを発現させる工程であって、ここで、宿主細胞は産生宿主細胞である、工程；および、(f) ワクチンの生成のために物理化学的性質が増強または改善したセットから複数膜貫通型ポリペプチド生成物を決定するための分析方法によって工程e)の産生ベクターの第2のセットから生成された複数膜貫通型ポリペプチド生成物のセットを分析する工程であって、ここで、物理化学的性質の増強または改善は、対照複数膜貫通型ポリペプチドに対するものである、工程を含む。いくつかの例では、物理化学的性質の増強または改善は、発現レベル、安定性、配座の選択性、均質性、タンパク質結晶化、抗原性、免疫原性、または経路活性化選択性を含む。いくつかの例では、対照は、野生型の複数膜貫通型ポリペプチド、あるいは異なる修飾を備える修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを含む。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたイオンチャネルタンパク質である。いくつかの例では、修飾されたイオンチャネルタンパク質は、修飾されたTRPV3、KCa3.1、またはTRPC6である。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、修飾されたGタンパク質共役受容体(GPCR)である。いくつかの例では、修飾されたGPCRは、修飾されたCCR7、CCR10、GPR55、NTR1、EP2、またはEP4の受容体である。いくつかの例では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの例では、アジュバントはGM-CSFを含む。

20

30

40

## 【0276】

場合によっては、ペプチドベースのワクチンは、周知の技術、担体、および賦形剤のいずれかを用いて、適切に、かつ、当該技術分野で理解されるとおりに製剤される。いくつかの例では、1つ以上の修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、同じ配列を含む複数のポリペプチドのカクテル、あるいは異なるポリペプチドの複数のコピーのカクテルとして製剤される。いくつかの例では、ペプチドは、例えば、脂質修飾、または担体タンパク質への結合などによって修飾される。場合によっては、脂質修飾はポリペプチドに対

50

する脂質群の共有結合である。いくつかの例では、脂質付加されたペプチドまたは脂質付加されたポリペプチドは、構造を安定させ、ワクチン処置の有効性を増強する。

【0277】

いくつかの例では、脂質付加されたペプチドはさらにリポソームに組み入れられる。例えば、脂質付加されたペプチドの脂質部分は自発的にリポソームの脂質二重層へ統合する。したがって、リポペプチドはリポソームの「表面」上で提示される。いくつかの例では、脂質付加されたペプチドは、リポソーム内でカプセル化される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドを指す。

【0278】

製剤中での取り込みに適切な典型的なリポソームとしては、限定されないが、多重層ベシクル (MLV)、オリゴ層状ベシクル (OLV)、単層ベシクル (UV)、小さな単層ベシクル (SUV)、中程度の大きさの単層ベシクル (MUV)、大きな単層ベシクル (LUV)、巨大な単層ベシクル (GUV)、多胞体ベシクル (MVB)、逆相蒸発法によって作られた単一またはオリゴ層状ベシクル (REV)、逆相蒸発法によって作られた多重層ベシクル (MLV-REV)、安定した複数層ベシクル (SPLV)、凍結融解した MLV (FATMLV)、押出法によって調製されたベシクル (VET)、フレンチプレスによって調製されたベシクル (FPV)、融合によって調製されたベシクル (FUV)、脱水-再水和ベシクル (DRV) およびバブルソーム (bubblesomes) (BSV) が挙げられる。いくつかの例では、リポソームは Amphipol (A8-35) を含む。リポソームを調製するための技術は、例えば、COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS vol. 66 (J. Kreuter ed., Marcel Dekker, Inc. (1994)) に記載されている。

10

20

【0279】

調製方法に依存して、リポソームは単層状または多層状であり、約  $0.02 \mu\text{m}$  ~ 約  $10 \mu\text{m}$  までに  $n$  及び直径のサイズが異なる。

【0280】

いくつかの例では、リポソームは多くのタイプの細胞を吸収し、その後、取り込んだ薬剤 (例えば、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチド) を放出する。場合によっては、リポソームは標的細胞と融合し、それによってリポソームの内容物は標的細胞中にすべて移される。場合によっては、リポソームは食作用性の細胞によってエンドサイトーシスされる。エンドサイトーシスの後、リポソーム脂質のリソソーム内分解とカプセルに包まれた薬剤の放出が行われる。Scherphof et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 446: 368 (1985)。

30

【0281】

いくつかの例では、本明細書に提供されるリポソームはさらに担体脂質を含む。いくつかの実施形態において、担体脂質はリン脂質である。リポソームを形成することができる担体脂質としては、限定されないが、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ホスファチジルコリン (PC; レシチン)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジエタノールアミン (PE)、またはホスファチジルセリン (PS) が挙げられる。他の適切なリン脂質はさらにジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA); ジミリストイルホスファチジン酸 (DMPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジミリストイルホスファチジルセリン (DMPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS)、ジパルミトイルホスファチジエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスファチジエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイルホスファチジエタノールアミン (DSPE) など、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、リポソームは、リポソーム形成を調節するステロール (

40

50

例えばコレステロール)をさらに含む。担体脂質は任意の既知の非リン酸塩極性脂質であり得る。

【0282】

いくつかの例では、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、ワクチンとして送達される担体タンパク質にも結合される。いくつかの例では、担体タンパク質は免疫原の要素であり、任意の組み換えの技術によって結合される。典型的な担体タンパク質は、Mariculture キーホールリンペットヘモシニアン(mcKLH)、PEGylated mcKLH、Blue Carrier(登録商標)タンパク質、ウシ血清アルブミン(BSA)、カチオン化BSA、オバルブミン、および破傷風トキソイドなどの細菌タンパク質(TT)を含む。

10

【0283】

場合によっては、ポリペプチドは多抗原性ペプチド(MAP)として調製される。場合によっては、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは、N末端またはC末端において小さな非免疫原性コアに結合される。場合によっては、コアは、二機能性の単位から構成された樹状コア残基またはマトリックスを含む。MAPの構築に適切なコア分子は、例えば、アンモニア、エチレンジアミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびリジンを含む。本明細書で使用されるように、MAP系構造の「線形の部分または分子」は、コアマトリックスに連結された抗原ペプチドを指す。したがって、抗原エピトープのクラスターは、MAPの表面を形成し、小さなマトリックスがそのコアを形成する。樹状コアと全MAPは、いくつかの例では、古典的Merrifield合成手順を使用して、固体樹脂上で合成される。MAP合成は一般に、U.S. Pat. Nos. 5,580,563、および、6,379,679、並びに、Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5409-5413, 1988に記載されている。

20

【0284】

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドは化学的に合成されるか、あるいは細胞系または無細胞系で組み換え発現される。ペプチドは、例えば、液相合成、固相合成によって、あるいはマイクロ波支援ペプチド合成によって、合成される。

【0285】

ポリペプチドの生成後、ポリペプチドはしばしば、不純物を取り除くために1回以上の精製工程にさらされる。場合によっては、精製工程は、親和性に基づく、サイズ排除に基づく、イオン交換に基づくなどの分離方法を利用するクロマトグラフィー工程を含む。場合によっては、ポリペプチドは、せいぜい30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、または100%純粋であるか、あるいは不純物が存在しない。場合によっては、ポリペプチドは、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、または100%純粋であるか、あるいは不純物が存在しない。

30

【0286】

本明細書で使用されるように、ポリペプチドは天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、アミノ酸残基は、アミノ基とカルボキシル基の両方を含む分子を指す。適切なアミノ酸は、限定されないが、有機合成あるいは他の代謝性ルートによって調製された非自然発生のアミノ酸と同様に、自然発生のアミノ酸のD異性体とL異性体の両方を含む。アミノ酸との用語は、本明細書で使用されるように、限定されないが、-アミノ酸、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、およびアミノ酸類似体を含む。

40

【0287】

いくつかの例では、( ) - アミノ酸は、アミノ基と、 - 炭素と示される炭素に結合されたカルボキシル基とを両方含む分子を指す。

【0288】

いくつかの例では、( ) - アミノ酸は、配置にアミノ基とカルボキシル基の両方を含む分子を指す。

50

## 【0289】

いくつかの例では、自然発生アミノ酸は、自然界において合成されたペプチド中で一般に見られ、かつ、1つの文字略語A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、およびVによって知られている20のアミノ酸のいずれか1つを指す。

## 【0290】

いくつかの例では、疎水性アミノ酸は、小さな疎水性アミノ酸と大きな疎水性アミノ酸を含む。小さな疎水性アミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、およびそれらのアナログである。大きな疎水性アミノ酸は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびこれらのアナログである。極性アミノ酸は、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、チロシン、およびこれらのアナログである。荷電アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、あるいはこれらのアナログである。

10

## 【0291】

いくつかの例では、アミノ酸アナログは、アミノ酸に構造上似ていて、かつ、ペプチド模倣大環状分子の形成においてアミノ酸の代わりに用いられる、分子を指す。アミノ酸アナログは、限定されないが、-アミノ酸、および、アミノまたはカルボキシの基が同様の反応基によって置き換えられる(例えば、二級または三級アミンによる一級アミンの置換、あるいはエステルによるカルボキシ基の置換)アミノ酸を含む。

20

## 【0292】

いくつかの例では、自然発生アミノ酸は、自然界において合成されたペプチド中で一般に見られ、かつ、1つの文字略語A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、およびVによって知られている20のアミノ酸のいずれか1つを指す。

## 【0293】

いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸またはアミノ酸アナログは、限定されないが、以下を含む：

## 【0294】

下記などの -アミノ酸アナログ：環状の -アミノ酸アナログ； -アラニン；(R) - フェニルアラニン；(R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - イソキノリン - 3 - 酢酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (1 - ナフチル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - クロロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - シアノフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - フルオロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - フリル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - メチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - ナフチル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - チエニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (2 - トリフルオロメチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3, 4 - ジクロロフェニル) 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3, 4 - ジフルオロフェニル) 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - ベンゾチエニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - クロロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - シアノフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - フルオロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - メチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - ピリジル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - チエニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (3 - トリフルオロメチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ブロモフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - クロロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - シアノフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ヨードフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - メチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ニトロフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ピリジル) - 酪酸；(R) - 3 - アミノ - 4 - (4 - トリフルオロメチルフェニル) - 酪酸；(R) - 3 - アミ

30

40

50

ノ - 4 - ペンタフルオロ - フェニル 酪酸 ; ( R ) - 3 - アミノ - 5 - ヘキセン酸 ; ( R )  
 - 3 - アミノ - 5 - ヘキシン酸 ; ( R ) - 3 - アミノ - 5 - フェニルペンタン酸 ; ( R )  
 - 3 - アミノ - 6 - フェニル - 5 - ヘキセン酸 ; ( S ) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ  
 - イソキノリン - 3 - 酢酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 1 - ナフチル ) - 酪酸 ; ( S )  
 - 3 - アミノ - 4 - ( 2 , 4 - ジクロロフェニル ) 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2  
 - クロロフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - シアノフェニル ) - 酪酸 ;  
 ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - フルオロフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 -  
 ( 2 - フリル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - メチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S )  
 ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - ナフチル ) - 酪酸 ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - チエニル  
 ) - 酪酸 ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 2 - トリフルオロメチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) 10  
 - 3 - アミノ - 4 - ( 3 , 4 - ジクロロフェニル ) 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3  
 , 4 - ジフルオロフェニル ) 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - ベンゾチエニル ) -  
 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - クロロフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ -  
 4 - ( 3 - シアノフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - フルオロフェニル  
 ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - メチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミ  
 ノ - 4 - ( 3 - ピリジル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - チエニル ) - 酪酸 ;  
 ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 3 - トリフルオロメチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - ア  
 ミノ - 4 - ( 4 - プロモフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - クロロフェ  
 ニル ( 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - シアノフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - ア  
 ミノ - 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - ヨードフェ 20  
 ニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - メチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 -  
 アミノ - 4 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - ピリジル  
 ) - 酪酸 ( S ) - 3 - アミノ - 4 - ( 4 - トリフルオロメチルフェニル ) - 酪酸 ; ( S )  
 - 3 - アミノ - 4 - ペンタフルオロ - フェニル 酪酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 5 - ヘキセン  
 酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 5 - ヘキシン酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 5 - フェニルペンタン  
 酸 ; ( S ) - 3 - アミノ - 6 - フェニル - 5 - ヘキセン酸 ; 1 , 2 , 5 , 6 - テトラヒド  
 ロピリジン - 3 - カルボン酸 ; 1 , 2 , 5 , 6 - テトラヒドロピリジン - 4 - カルボン酸  
 ; 3 - アミノ - 3 - ( 2 - クロロフェニル ) - プロピオン酸 ; 3 - アミノ - 3 - ( 2 - チ  
 エニル ) - プロピオン酸 ; 3 - アミノ - 3 - ( 3 - プロモフェニル ) - プロピオン酸 ; 3  
 - アミノ - 3 - ( 4 - クロロフェニル ) - プロピオン酸 ; 3 - アミノ - 3 - ( 4 - メトキ 30  
 シフェニル ) - プロピオン酸 ; 3 - アミノ - 4 , 4 , 4 - トリフルオロ - 酪酸 ; 3 - アミ  
 ノアジピン酸 ; D - - フェニルアラニン ; - ロイシン ; L - - ホモアラニン ; L -  
 - ホモアスパラギン酸 - ベンジルエステル ; L - - ホモグルタミン酸 - ベンジル  
 エステル ; L - - ホモイソロイシン ; L - - ホモロイシン ; L - - ホモメチオニン  
 ; L - - ホモフェニルアラニン ; L - - ホモプロリン ; L - - ホモトリプトファン  
 ; L - - ホモバリン ; L N - ベンジルオキシカルボニル - - ホモリジン ; N - L  
 - - ホモアルギニン ; O - ベンジル - L - - ホモヒドロキシプロリン ; O - ベンジル  
 - L - - ホモセリン ; O ベンジル - L - - ホモトレオニン ; O ベンジル - L - - ホ  
 モチロシン ; - トリチル - L - - ホモアスパラギン ; ( R ) - - フェニルアラニン  
 ; L - - ホモアスパラギン酸 - t - ブチルエステル ; L - - ホモグルタミン酸 - 40  
 t - ブチルエステル ; L - N - - ホモリジン ; N - トリチル - L - - ホモグルタ  
 ミン ; N - 2 , 2 , 4 , 6 , 7 - ペンタメチル - ジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニ  
 ル - L - - ホモアルギニン ; O - t - ブチル - L - - ホモヒドロキシ - プロリン ; O  
 - t - ブチル - L - - ホモセリン ; O - t - ブチル - L - - ホモトレオニン ; O - t  
 - ブチル - L - - ホモチロシン ; 2 - アミノシクロペンタンカルボン酸 ; および、 2 -  
 アミノシクロヘキサンカルボン酸。

## 【 0 2 9 5 】

下記などのアラニン、バリン、グリシン、あるいはロイシンのアナログ： - メトキシ  
 グリシン； - アリル - L - アラニン； - アミノイソ酪酸； - メチル - ロイシン；  
 - ( 1 - ナフチル ) - D - アラニン； - ( 1 - ナフチル ) - L - アラニン； - ( 2 - 50

ナフチル) - D - アラニン; - (2 - ナフチル) - L - アラニン; - (2 - ピリジル) - D - アラニン; - (2 - ピリジル) - L - アラニン; - (2 - チエニル) - D - アラニン; - (2 - チエニル) - L - アラニン; - (3 - ベンゾチエニル) - D - アラニン; - (3 - ベンゾチエニル) - L - アラニン; - (3 - ピリジル) - D - アラニン; - (3 - ピリジル) - L - アラニン; - (4 - ピリジル) - D - アラニン; - (4 - ピリジル) - L - アラニン; - クロロ - L - アラニン; - シアノ - L - アラニン; - シクロヘキシル - D - アラニン; - シクロヘキシル - L - アラニン; - シクロペンテン - 1 - イル - アラニン; - シクロペンチル - アラニン; - シクロプロピル - L - A l a - O H . ジシクロヘキシルアンモニウム塩; - t - ブチル - D - アラニン; - t - ブチル - L - アラニン; - アミノ酪酸; L - , - ジアミノプロピオン酸; 2, 4 - ジニトロ - フェニルグリシン; 2, 5 - ジヒドロ - D - フェニルグリシン; 2 - アミノ - 4, 4, 4 - トリフルオロ酪酸; 2 - フルオロ - フェニルグリシン; 3 - アミノ - 4, 4, 4 - トリフルオロ酪酸; 3 - フルオロ - パリン; 4, 4, 4 - トリフルオロ - パリン; 4, 5 - デヒドロ - L - l e u - O H . ジシクロヘキシルアンモニウム塩; 4 - フルオロ - D - フェニルグリシン; 4 - フルオロ - L - フェニルグリシン; 4 - ヒドロキシ - D - フェニルグリシン; 5, 5, 5 - トリフルオロ - ロイシン; 6 - アミノヘキサン酸; シクロペンチル - D - G l y - O H . ジシクロヘキシルアンモニウム塩; シクロペンチル - G l y - O H . ジシクロヘキシルアンモニウム塩; D - , - ジアミノプロピオン酸; D - - アミノ酪酸; D - - t - ブチルグリシン; D - (2 - チエニル) グリシン; D - (3 - チエニル) グリシン; D - 2 - アミノカプロン酸; D - 2 - インダニルグリシン; D - アリルグリシン - ジシクロヘキシルアンモニウム塩; D - シクロヘキシルグリシン; D - ノルパリン; D - フェニルグリシン; - アミノ酪酸; - アミノイソ酪酸; (2 - プロモフェニル) グリシン; (2 - メトキシフェニル) グリシン; (2 - メチルフェニル) グリシン; (2 - チアゾイル) グリシン; (2 - チエニル) グリシン; 2 - アミノ - 3 - (ジメチルアミノ) - プロピオン酸; L - , - ジアミノプロピオン酸; L - - アミノ酪酸; L - - t - ブチルグリシン; L - (3 - チエニル) グリシン; L - 2 - アミノ - 3 - (ジメチルアミノ) - プロピオン酸; L - 2 - アミノカプロン酸 ジシクロヘキシル - アンモニウム塩; L - 2 - インダニルグリシン; L - アリルグリシン . ジシクロヘキシルアンモニウム塩; L - シクロヘキシルグリシン; L - フェニルグリシン; L - プロパルギルグリシン; L - ノルパリン; N - - アミノメチル - L - アラニン; D - , - ジアミノ酪酸; L - , - ジアミノ酪酸; - シクロプロピル - L - アラニン; (N - - (2, 4 - ジニトロフェニル) - L - , - ジアミノプロピオン酸; (N - - 1 - (4, 4 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル) - D - , - ジアミノプロピオン酸; (N - - 1 - (4, 4 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル) - L - , - ジアミノプロピオン酸; (N - - 4 - メチルトリチル) - L - , - ジアミノプロピオン酸; (N - - アリルオキシカルボニル) - L - , - ジアミノプロピオン酸; (N - - 1 - (4, 4 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル) - D - , - ジアミノ酪酸; (N - - 1 - (4, 4 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル) - L - , - ジアミノ酪酸; (N - - 4 - メチルトリチル) - D - , - ジアミノ酪酸; (N - - 4 - メチルトリチル) - L - , - ジアミノ酪酸; (N - - 4 - アリルオキシカルボニル) - L - , - ジアミノ酪酸; D - , - ジアミノ酪酸; 4, 5 - デヒドロ - L - ロイシン; シクロペンチル - D - G l y - O H ; シクロペンチル - G l y - O H ; D - アリルグリシン; D - ホモシクロヘキシルアラニン; L - 1 - ピレニルアラニン; L - 2 - アミノカプロン酸; L - アリルグリシン; L - ホモシクロヘキシルアラニン; および、N - (2 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - B z l ) - G l y - O H .

## 【0296】

アミノ酸アナログは、アルギニンまたはリジンのアナログを含み得る。アルギニンとリジンのアミノ酸アナログの例としては、限定されないが、以下が挙げられる：シトルリン

10

20

30

40

50

; L - 2 - アミノ - 3 - グアニジノプロピオン酸 ; L - 2 - アミノ - 3 - ウレイドプロピオン酸 ; L - シトルリン ; L y s ( M e ) 2 - O H ; L y s ( N 3 ) - - O H ; N - ベンジルオキシカルボニル - L - オルニチン ; N - ニトロ - D - アルギニン ; N - ニトロ - L - アルギニン ; - メチル - オルニチン ; 2 , 6 - ジアミノヘプタン二酸 ; L - オルニチン ; ( N - 1 - ( 4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソ - シクロヘキサ - 1 - イリデン ) エチル ) - D - オルニチン ; ( N - 1 - ( 4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソ - シクロヘキサ - 1 - イリデン ) エチル ) - L - オルニチン ; ( N - 4 - メチルトリチル ) - D - オルニチン ; ( N - 4 - メチルトリチル ) - L - オルニチン ; D - オルニチン ; L - オルニチン ; A r g ( M e ) ( P b f ) - O H ; A r g ( M e ) 2 - O H ( 非対称 ) ; A r g ( M e ) 2 - O H ( 対称 ) ; L y s ( i v D d e ) - O H ; L y s ( M e ) 2 - O H . H C l ; L y s ( M e 3 ) - O H クロリド ; N - ニトロ - D - アルギニン ; および N - ニトロ - L - アルギニン。

10

## 【0297】

下記などのアスパラギン酸またはグルタミン酸のアナログ : - メチル - D - アスパラギン酸 ; - メチル - グルタミン酸 ; - メチル - L - アスパラギン酸 ; - メチレン - グルタミン酸 ; ( N - - エチル ) - L - グルタミン ; [ N - - ( 4 - アミノベンゾイル ) ] - L - グルタミン酸 ; 2 , 6 - ジアミノピメリン酸 ; L - - アミノスベリン酸 ; D - 2 - アミノアジピン酸 ; D - - アミノスベリン酸 ; - アミノピメリン酸 ; イミノ二酢酸 ; L - 2 - アミノアジピン酸 ; トレオ - - メチル - アスパラギン酸 ; - カルボキシ - D - グルタミン酸 , - ジ - t - ブチルエステル ; - カルボキシ - L - グルタミン酸 , - ジ - t - ブチルエステル ; G l u ( O A l l ) - O H ; L - A s u ( O t B u ) - - O H ; および、ピログルタミン酸。

20

## 【0298】

下記などのシステインとメチオニンのアナログ : システイン ( ファルネシル ) - O H 、 システイン ( ファルネシル ) - O M e 、 - メチル - メチオニン、システイン ( 2 - ヒドロキシエチル ) - O H 、 システイン ( 3 - アミノプロピル ) - O H 、 2 - アミノ - 4 - ( エチルチオ ) 酪酸、ブチオニン、ブチオニンスルホキシイミン、エチオニン、メチオニン・チルスルホンイウムクロリド、セレノメチオニン、システイン酸、[ 2 - ( 4 - ピリジル ) エチル ] - D L - ペニシラミン、[ 2 - ( 4 - ピリジル ) エチル ] - L - システイン、4 - メトキシベンジル - D - ペニシラミン、4 - メトキシベンジル - L - ペニシラミン、4 - メチルベンジル - D - ペニシラミン、4 - メチルベンジル - L - ペニシラミン、ベンジル - D - システイン、ベンジル - L - システイン、ベンジル - D L - ホモシステイン、カルバモイル L - システイン、カルボキシエチル - L - システイン、カルボキシメチル - L - システイン、ジフェニルメチル - L - システイン、エチル - L - システイン、メチル - L - システイン、t - ブチル - D システイン、トリチル - L - ホモシステイン、トリチル - D - ペニシラミン、シスタチオニン、ホモシスチン、L - ホモシスチン、( 2 - アミノエチル ) - L - システイン、セレノ - L - シスチン、シスタチオニン、システイン ( S t B u ) - - O H 、 および、アセトアミドメチル - D - ペニシラミン。

30

## 【0299】

下記などのフェニルアラニンとチロシンのアナログ : - メチル - フェニルアラニン、- ヒドロキシフェニルアラニン、- メチル - 3 - メトキシ - D L - フェニルアラニン、- メチル - D - フェニルアラニン、- メチル - L - フェニルアラニン、1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸 ; 2 , 4 - ジクロロ - フェニルアラニン、2 - ( トリフルオロメチル ) - D - フェニルアラニン、2 - ( トリフルオロメチル ) - L - フェニルアラニン、2 - ブロモ - D - フェニルアラニン、2 - ブロモ - L - フェニルアラニン、2 - クロロ - D - フェニルアラニン、2 - クロロ - L - フェニルアラニン、2 - シアノ - D - フェニルアラニン、2 - シアノ - L - フェニルアラニン、2 - フルオロ - D - フェニルアラニン ; 2 - フルオロ - L - フェニルアラニン ; 2 - メチル - D - フェニルアラニン、2 - メチル - L - フェニルアラニン、2 - ニトロ - D - フェニルアラニン、2 - ニトロ - L - フェニルアラニン、2 , 4 , 5 - トリヒドロキシ - フェニルアラニン

40

50

、 3 , 4 , 5 - トリフルオロ - D - フェニルアラニン、 3 , 4 , 5 - トリフルオロ - L - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジクロロ - D - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジクロロ - L - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジフルオロ - D - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジフルオロ - L - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン、 3 , 4 - ジメトキシ - L - フェニルアラニン、 3 , 5 , 3' - トリヨード - L - サイロニン 3 , 5 - ジヨード - D - チロシン、 3 , 5 - ジヨード - L - チロシン、 3 , 5 - ジヨード - L - サイロニン、 3 - (トリフルオロメチル) - D - フェニルアラニン、 3 - (トリフルオロメチル) - L - フェニルアラニン、 3 - アミノ - L - チロシン、 3 - プロモ - D - フェニルアラニン、 3 - プロモ - L - フェニルアラニン、 3 - クロロ - D - フェニルアラニン、 3 - クロロ - L - フェニルアラニン、 3 - クロロ - L - チロシン、 3 - シアノ - D - フェニルアラニン、 3 - シアノ - L - フェニルアラニン、 3 - フルオロ - D - フェニルアラニン； 3 - フルオロ - L - フェニルアラニン； 3 - フルオロ - チロシン、 3 - ヨード - D - フェニルアラニン、 3 - ヨード - L - フェニルアラニン、 3 - ヨード - L - チロシン、 3 - メトキシ - L - チロシン、 3 - メチル - D - フェニルアラニン、 3 - メチル - L - フェニルアラニン、 3 - ニトロ - D - フェニルアラニン、 3 - ニトロ - L - フェニルアラニン、 3 - ニトロ - L - チロシン、 4 - (トリフルオロメチル) - D - フェニルアラニン、 4 - (トリフルオロメチル) - L - フェニルアラニン、 4 - アミノ - D - フェニルアラニン、 4 - アミノ - L - フェニルアラニン、 4 - ベンゾイル - D - フェニルアラニン、 4 - ベンゾイル - L - フェニルアラニン、 4 - ビス ( 2 - クロロエチル ) アミノ - L - フェニルアラニン、 4 - プロモ - D - フェニルアラニン、 4 - プロモ - L - フェニルアラニン、 4 - クロロ - D - フェニルアラニン、 4 - クロロ - L - フェニルアラニン、 4 - シアノ - D - フェニルアラニン、 4 - シアノ - L - フェニルアラニン、 4 - フルオロ - D - フェニルアラニン； 4 - フルオロ - L - フェニルアラニン； 4 - ヨード - D - フェニルアラニン、 4 - ヨード - L - フェニルアラニン、 ホモフェニルアラニン、 サイロキシン、 3 , 3 - ジフェニルアラニン、 サイロニン、 エチル - チロシン、 および、 メチル - チロシン。

【 0 3 0 0 】

下記などのプロリンアナログ： 3 , 4 - デヒドロ - プロリン、 4 - フルオロ - プロリン、 *c i s* - 4 - ヒドロキシ - プロリン、 チアゾリジン - 2 - カルボキシル酸、 およびトランス - 4 - フルオロ - プロリン。

【 0 3 0 1 】

下記などのセリンとスレオニンのアナログ： 3 - アミノ - 2 - ヒドロキシ - 5 - メチルヘキサタン酸、 2 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メチルペンタン酸、 2 - アミノ - 3 - エトキシブタン酸、 2 - アミノ - 3 - メトキシブタン酸、 4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチルヘブタン酸、 2 - アミノ - 3 - ベンジルオキシプロピオン酸、 2 - アミノ - 3 - ベンジルオキシプロピオン酸、 2 - アミノ - 3 - エトキシプロピオン酸、 4 - アミノ - 3 - ヒドロキシブタン酸、 および - メチルセリン。

【 0 3 0 2 】

下記などのトリプトファンアナログ： - メチル - トリプトファン； - ( 3 - ベンゾチエニル ) - D - アラニン； - ( 3 - ベンゾチエニル ) - L - アラニン； 1 - メチル - トリプトファン； 4 - メチル - トリプトファン； 5 - ベンジルオキシ - トリプトファン； 5 - プロモ - トリプトファン； 5 - クロロ - トリプトファン； 5 - フルオロ - トリプトファン； 5 - ヒドロキシ - トリプトファン； 5 - ヒドロキシ - L - トリプトファン； 5 - メトキシ - トリプトファン； 5 - メトキシ - L - トリプトファン； 5 - メチル - トリプトファン； 6 - プロモ - トリプトファン； 6 - クロロ - D トリプトファン； 6 - クロロ - トリプトファン； 6 - フルオロ - トリプトファン； 6 - メチル - トリプトファン； 7 - ベンジルオキシ - トリプトファン； 7 - プロモ - トリプトファン； 7 - メチル - トリプトファン； D - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - ノルハルマン - 3 - カルボン酸； 6 - メトキシ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロノルハルマン - 1 - カルボン酸； 7 - アザトリプトファン； L - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - ノルハルマン - 3 - カルボン酸； 5 - メトキシ - 2 - メチル - トリプトファン； および、 6 - クロロ - L - トリプトファン。

## 【0303】

いくつかの実施形態において、アミノ酸アナログはラセミ混合物である。いくつかの例では、アミノ酸アナログのD異性体は使用される。場合によっては、アミノ酸アナログのL異性体は使用される。いくつかの例では、アミノ酸アナログは、RまたはS配置にあるキラル中心を含む。しばしば、 $\alpha$ -アミノ酸アナログのアミノ基は、保護基、例えば、tert-ブチルオキシカルボニル(BOC基)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)、トシルなどで随意に置換される。しばしば、 $\alpha$ -アミノ酸アナログのカルボン酸官能基は、例えば、そのエステル誘導体として保護される。場合によっては、アミノ酸アナログの塩が使用される。

## 【0304】

抗原提示細胞(APC)ベースのワクチン

いくつかの例では、ワクチンは抗原提示細胞(APC)ベースのワクチンである。場合によっては、APCベースのワクチンは、周知の技術、担体、および賦形剤のいずれかを用いて、適切に、かつ、当該技術分野で理解されるとおりに製剤される。APCは単球、単球由来の細胞、マクロファージ、および樹状細胞を含んでいる。しばしば、APCベースのワクチンは樹状細胞ベースのワクチンであり得る。

## 【0305】

いくつかの例では、樹状細胞ベースのワクチンは、当該技術分野で周知の任意の方法によって調製される。場合によっては、樹状細胞(DC)ベースのワクチンは、エキスビオまたはインビオの方法により調製される。エキスビオ方法は例えば、患者への投与の前にDCを活性化または充填するために、本明細書に記載されたポリペプチドにおいてエキスビオでパルス化した自己由来のDCの使用を含む。いくつかの例では、インビオ方法は、本明細書に記載されたポリペプチドと結合した抗体を使用して、特定のDC受容体を標的とする工程を含む。DCベースのワクチンはさらに、TLR3、TLR7-8、およびCD40のアゴニストなどのDCアクチベーターを含むことができる。DCベースのワクチンはさらに、アジュバントと、薬学的に許容可能な担体とを含むことができる。

## 【0306】

ウイルスベースのワクチン

いくつかの実施形態において、ワクチンはウイルスベースのワクチンである。いくつかの例では、ウイルスベースのワクチンは、生ウイルスまたは不活性化ウイルスに基づいて生成される。生ウイルスベースのワクチンは、弱毒化ウイルス、あるいは低温に適応したウイルスを使用する。いくつかの例では、不活性化ウイルスに基づくワクチンは、全ビリオン、分離したビリオン、または精製された表面抗原(例えば、インフルエンザA型ウイルスからのHAおよび/またはN)を含む。ウイルスを不活性化するための化学的手段は、以下の薬剤: 洗浄薬、ホルムアルデヒド、 $\alpha$ -プロピオラクトン、メチレンブルー、ソラレン、カルボキシフラレン(C60)、二元性のエチルアミン、アセチルエチレンジアミン、またはこれらの組み合わせの1つ以上の効果的な量を用いる処置を含んでもよい。ウイルスの不活性化の非化学的方法、例えば、UV光または線照射などが、当該技術分野で知られている。

## 【0307】

場合によっては、ビリオンは、様々な方法によってウイルスを含有する流体から収穫される。例えば、精製プロセスは、ビリオンを破壊するための洗浄薬を含む線形の蔗糖勾配溶液を使用するゾーン遠心分離を含むことができる。抗原は、任意の希釈の後に、ダイアフィルトレーションによって精製可能である。

## 【0308】

場合によっては、分離したビリオンは、「トゥイーン-エーテル」分離プロセスを含むサブビリオン調製物を生成するために、洗浄薬(例えば、エチルエーテル、ポリソルベート80、デオキシコール酸塩、トリ-N-ブチリン酸塩、トリトンX-100、トリトンN101、臭化セチルトリメチルアンモニウム、Tergitol NP9など)で、精製されたビリオンを処置することにより得られる。

10

20

30

40

50

## 【0309】

## アジュバント

いくつかの例では、本明細書に記載されたワクチンはアジュバントをさらに含む。いくつかの例では、アジュバントは、ワクチンを受け取る患者において誘発された免疫反応（体液および/または細胞）を増強するために使用される。しばしば、アジュバントはTh1型応答を誘発する。またあるときには、アジュバントはTh2型応答を誘発する。いくつかの例では、Th1型応答は、IL-4、IL-5およびIL-10などのサイトカインの産生を特徴とするTh2型応答に対立するものとしてのIFN-γなどのサイトカインの産生を特徴とする。

## 【0310】

いくつかの態様では、MPLAやMDPなどの脂質ベースのアジュバントは、本明細書に開示されたワクチンと共に使用することができる。モノホスホリルリピドA(MPLA)は、例えば、特定のTリンパ球に対するリポソーム抗原の提示の増加をもたらすアジュバントである。加えて、ムラミルジペプチド(MDP)は、本明細書に記載されたワクチン製剤と協働する適切なアジュバントとして使用可能である。

## 【0311】

いくつかの例では、アジュバントは、サイトカインなどの刺激分子を含む。サイトカインの非限定的な例は以下を含む：CCL20、α-インターフェロン(IFN-α)、β-インターフェロン(IFN-β)、γ-インターフェロン、血小板由来の成長因子(PDGF)、TNFα、TNFβ、GM-CSF、上皮成長因子(EGF)、皮膚のT細胞吸引ケモカイン(CTACK)、上皮の胸腺発現ケモカイン(TECK)、粘膜関連性上皮ケモカイン(MEC)、IL-12、IL15、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP1a、MIP-1β、IL-8、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3M-CSF、G-CSF、IL-18の突然変異体形態、CD40、CD40L、血管成長因子、線維芽細胞成長因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮細胞増殖因子、Fas、TNF受容体、FasL、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、不活性のNIK、SAPK、SAP-I、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKLIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAPI、およびTAP2。

## 【0312】

追加のアジュバントは以下を含む：MCP-1、MIP1a、MIP-1β、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の突然変異体形態、CD40、CD40L、血管成長因子、線維芽細胞成長因子、IL-7、IL-22、神経成長因子、血管内皮細胞増殖因子、Fas、TNF受容体、FasL、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、不活性のNIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDR

10

20

30

40

50

C5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびその機能性フラグメント。

【0313】

いくつかの態様では、アジュバントはトール様受容体のモジュレーターである。トール様受容体のモジュレーターの例は、TLR-9アゴニストを含み、イミキモドなどのトール様受容体の小分子モジュレーターに限定されない。本明細書に記載されたワクチンと組み合わせて使用されるアジュバントの他の例としては、限定されないが、サポニン、CpG ODNなどが挙げられる。

10

【0314】

しばしば、アジュバントは、タンパク質の輸送と再折り畳みに関与する、HSP60、HSP70、GroEL、GroES、DnaK、および、DnaJなどの熱ショックタンパク質分子シャペロンである。

【0315】

しばしば、アジュバントは、細菌トキソイド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー、アルミニウム塩、リボソーム、CpGポリマー、水中油型エマルション、あるいはこれらの組み合わせから選択される。

【0316】

しばしば、アジュバントは水中油型エマルションである。水中油型エマルションは少なくとも1つの油と少なくとも1つの界面活性剤を含むことがあり、油と界面活性剤は生物分解性(代謝可能)であるとともに生体適合性である。エマルジョン中の油滴は一般に直径が5 μm未満であり、サブミクロン直径を有することさえもあり、こうした小さなサイズは、安定したエマルジョンを提供するために、高圧ホモジナイザーで達成される。濾過滅菌にさらすことができるように、220 nm未満のサイズの液滴が好ましい。

20

【0317】

場合によっては、使用される油は、動物源(魚など)または植物源由来のものを含む。植物油の源はナッツ、種子、および穀物を含み得る。ピーナッツオイル、ダイズオイル、ココナッツオイル、およびオリーブオイルが最も一般に利用されており、落花生油を例証する。例えば、ホホバ豆から得られたホホバ油を使用することができる。種子油はベニバナ油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ油などを含む。穀物群は以下を含み得る: トウモロコシ油、および小麦、オートミール、ライ麦、コメ、テフ、ライコムギなどの他の穀物の油。グリセロールと1,2-プロパンジオールの6-10の炭素脂肪酸エステルは、種子油で自然に生じないが、ナットと種子油から出発する適切な材料の加水分解、分離、およびエステル化によって製造されることがある。哺乳動物の乳からの油脂は代謝可能であり、ゆえに、本明細書に記載されるワクチンと共に使用可能である。分離、精製、鹸化、および動物源から純粋な油を得るために必要な他の手段の手順は、当該技術分野で周知である。魚は、容易に回収可能な代謝可能な油を含むことができる。例えば、タラ肝油、サメ肝油、および鯨ろうなどの鯨油は、本明細書で使用することができる魚油のいくつかを例証することができる。多くの分枝鎖油は、5つの炭素イソブレン単位で生化学的に合成可能であり、一般にテルペノイドと呼ばれる。サメ肝油は、スクワレン、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエンとして知られている、分枝した不飽和のテルペノイドを含む。スクワレンの飽和したアナログであるスクアランも使用することができる。スクワレンとスクアランを含む魚油は、商業源から容易に入手可能であり得るか、あるいは当該技術分野で知られている方法によって入手可能である。

30

40

【0318】

他の有用な油としては、例えば、高齢の患者(例えば、60歳以上)で使用されるワクチン中に含まれるトコフェロールを含んでいる。これは、ビタミンEが患者群中で免疫反応に好ましい効果があると報告されているためである。さらに、トコフェロールには、エ

50

マルジョンを安定させるのを助ける抗酸化剤特性がある。様々なトコフェロールが存在する（ 、 、 、 、 、あるいは ）が、通常 が使用される。 - トコフェロールの例は、DL - - トコフェロールである。 - トコフェロール琥珀酸塩は、インフルエンザワクチンと適合することができ、水銀化合物の代用物として有用な防腐剤になりえる。

#### 【0319】

例えば、スクワレンや - トコフェロールを含む油の混合物がしばしば使用される。2 - 20（容量）%の範囲の油分がしばしば使用される。

#### 【0320】

いくつかの例では、界面活性剤はその「HLB」（吸湿性/脂溶性の平衡）によって分類される。場合によっては、界面活性剤は、少なくとも10、少なくとも15、および/または少なくとも16のHLBを有する。界面活性剤としては、限定されないが、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般にトウインと呼ばれる）、例えば、ポリソルベート20およびポリソルベート80；エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）、および/またはブチレンオキシド（BO）のコポリマー（線形のEO/POブロックコポリマーなどのDOWFAX（商標）の商標名で売られている）；オクトキシノール-9を有する、反復エトキシ-（オキシ-1,2-エタンジール）基の数で異なり得る、オクトキシノール（トリトンX-100またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPAL CA-630/NP-40）；ホスファチジルコリン（レシチン）などのリン脂質；Tergitol（商標）NPシリーズなどのノニルフェノールエトキシレート；トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brij 30）などの、ラウリル、セチル、ステアリル、およびオレイルアルコール（Brij界面活性剤として知られている）に由来するポリオキシエチレン脂肪エーテル；および、三オレイン酸ソルビタン（Span 85）とソルビタンラウリン酸モノエステルなどのソルビタンエステル（一般にSPANとして知られている）。非イオン性の界面活性剤は本明細書に使用することができる。

#### 【0321】

使用される界面活性剤の混合物は、例えば、トウイン80/Span 85混合物を含む。ポリオキシエチレンソルビタンエステルとオクトキシノールの組み合わせも適切であり得る。別の組み合わせは、ラウレス9と、ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールを含むことができる。

#### 【0322】

場合によっては、界面活性剤の量（重量%）以下を含む：ポリオキシエチレンソルビタンエステル（トウイン80など）0.01~1%、とりわけ、約0.1%；オクチル-またはノニルフェノキシポリエトキシエタノール（トリトンX-100またはトリトンシリーズ中の他の洗浄薬）0.001~0.1%、とりわけ、0.005~0.02%；ポリオキシエチレンエーテル（ラウレス9など）0.1~20%、好ましくは0.1~10%、とりわけ、0.1~1%あるいは約0.5%。

#### 【0323】

##### 担体と賦形剤

いくつかの例では、ワクチンは、担体と賦形剤（限定されないが、緩衝液、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、あるいは、グリシン、抗酸化剤、静菌薬、キレート剤、懸濁化剤、増粘剤および/または保存剤などのアミノ酸を含む）、水、油、石油、動物起源、野菜起源、あるいは合成起源、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ごま油など、食塩水、水溶性デキストロスおよびグリセリン溶液、香料、着色料、粘着剥奪剤（detackifiers）および他の許容可能な添加剤、アジュバント、あるいは結合剤、生理学的条件を禁じさせるために必要とされる他の薬学的に許容可能な補助物質、例えば、pH緩衝剤、等張化剤、乳化剤などを含む。賦形剤の例としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。

10

20

30

40

50

別の例では、医薬品製剤は実質的に保存剤を含まない。他の例では、医薬品製剤は少なくとも1つの防腐剤を含むことができる。製剤形における一般的な方法は、Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lippencott Williams & Wilkins, Baltimore Md. (1999))で見られる。本明細書に記載される医薬品組成物を投与するために当業者に知られている任意の適切な担体を採用することができるが、担体のタイプは投与のモードに依存して変わることが認識される。

#### 【0324】

いくつかの例では、ワクチンの医薬品組成物は、周知の技術を使用してリポソーム内にカプセル化される。生物分解性のマイクロスフェアも、本発明の医薬品組成物用の担体として使用可能である。適切な生物分解性のマイクロスフェアは、例えば、U.S. Pat. No. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344、および、5,942,252で開示される。

10

#### 【0325】

場合によっては、医薬品組成物は、リポソームまたはマイクロスフェア（あるいは微粒子）中で投与される。患者への投与用のリポソームとマイクロスフェアを調製する方法は、当業者に周知である。U.S. Pat. 4,789,734は、例えば、リポソーム中の生体試料をカプセル化する方法を記載している。本質的に、材料は、水溶液、適切なリン脂質、および追加された脂質に、必要に応じて界面活性剤とともに溶かされ、材料を必要に応じて透析して超音波で処理した。既知の方法の調査は、G. Gregoriadis, Chapter 14, "Liposomes," *Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 2. sup. 87-341 (Academic Press, 1979)によって提供される。

20

#### 【0326】

ポリマーまたはタンパク質から作られたマイクロスフェアは当業者には周知であり、胃腸管を通して直接血流へ至る通路に合わせることができる。代替的に、化合物は組み込むことができ、マイクロスフェアまたはマイクロスフェアの複合体を、数日から数か月まで及ぶ期間にわたって徐放するために埋め込むことができる。例えば、U.S. Pat. No. 4,906,474、4,925,673、および3,625,214、ならびにJain, TIPS 19:155-157 (1998)を参照。

30

#### 【0327】

場合によっては、ワクチンは、チオメルサルあるいは2-フェノキシエタノールなどの保存剤を含む。いくつかの例では、ワクチンは実質的に、水銀材料を含まず（例えば、 $< 10 \mu\text{g/ml}$ ）、例えば、チオメルサルを含まない。トコフェロール琥珀酸塩は水銀の化合物の代わりとして使用されてもよい。

#### 【0328】

張性を制御するために、ナトリウム塩などの生理的な塩が随意にワクチンに含まれている。他の塩は、塩化カリウム、カリウム二水素リン酸塩、塩化マグネシウム、および/またはリン酸二ナトリウムを含む。

40

#### 【0329】

いくつかの例では、ワクチンは、約200 mOsm/kgから約400 mOsm/kg、約240から約360 mOsm/kg、あるいは290-310 mOsm/kgの範囲内の重量モル浸透圧濃度を有する。

#### 【0330】

場合によっては、ワクチンはトリス緩衝液；ホウ酸塩緩衝液；コハク酸塩緩衝液；ヒスチジン緩衝液（例えば、水酸化アルミニウムアジュバントを含む）；あるいは、クエン酸塩緩衝液などの1つ以上の緩衝液を含む。緩衝液は、場合によっては、5-20 mMの範囲で含まれる。

50

## 【0331】

場合によっては、ワクチンのpHは、約5.0～約8.5、約6.0～約8.0、約6.5～約7.5、あるいは約7.0～約7.8である。

## 【0332】

いくつかの例では、ワクチンは無菌である。場合によっては、ワクチンは、非発熱性であり、例えば、1回の投与量当たり<1EU(エンドトキシン単位、標準測定値)を含み、1回の投与量当たり<0.1EUであり得る。

## 【0333】

いくつかの例では、ワクチンは、とりわけ、分割または表面抗原のワクチンのために、洗浄薬、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(「トウイーン」として知られている)、オクトキシノール(オクトキシノール-9(トリトンX-100)、またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノールなど)、セチルトリメチル臭化アンモニウム(「CTAB」)、あるいはデオキシコール酸ナトリウムを含んでいる。洗浄薬は極微量でのみ存在することができる。したがって、ワクチンは、1mg/ml未満のオクトキシノール-10とポリソルベート80を各々含み得る。極微量の他の残余成分は随意に抗生物質(例えば、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ポリミキシンB)である。

10

## 【0334】

いくつかの例では、ワクチンは、当該技術分野で周知の適切なビヒクル中で無菌液または懸濁液として製剤される。医薬品組成物は従来の周知の滅菌技術によって殺菌可能であるか、あるいは滅菌る過可能である。結果として生じる水溶液は、そのまま使用されるためにパッケージ化可能であり、あるいは凍結乾燥可能であり、凍結乾燥された調製物は投与前に無菌液と組み合わせられる。適切な製剤と追加の担体は、Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Md.)に記載される。

20

## 【0335】

いくつかの例では、ワクチンは1つ以上の薬学的に許容可能な塩で製剤される。例えば、薬学的に許容可能な塩は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムのイオンなど無機のイオンの塩を含み得る。こうした塩は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、マンデル酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、あるいはマレイン酸などの無機または有機の酸を含む塩を含んでもよい。加えて、薬剤がカルボキシ基または他の酸性基を含む場合、それは無機または有機の塩基を備えた薬学的に許容可能な添加塩に変換可能である。適切な塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシル・アミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンなどが挙げられる。

30

## 【0336】

ペプチド、核酸、抗体、またはそのフラグメントなどの有効な薬剤、および/または、本明細書に記載されるAPCを、1つ以上のアジュバントと組み合わせて含む医薬品組成物は、あるモル比を含むように製剤可能である。例えば、1つ以上のアジュバントと組み合わせた、ペプチド、核酸、抗体、あるいはそのフラグメント、および/または本明細書に記載されるAPCなどの有効な薬剤の約99:1～約1:99のモル比を使用することができる。いくつかの例では、1つ以上のアジュバントと組み合わせた、ペプチド、核酸、抗体、あるいはそのフラグメント、および/または本明細書に記載されるAPCなどの有効な薬剤のモル比の範囲は、約80:20～約20:80、約75:25～約25:75、約70:30～約30:70、約66:33～約33:66、約60:40～約40:60、約50:50、および、約90:10～約10:90から選択される。1つ以上のアジュバントと組み合わせた、ペプチド、核酸、抗体、あるいはそのフラグメント、および/または本明細書に記載されるAPCなどの有効な薬剤のモル比は、約1:9であり

40

50

得、場合によっては、約 1 : 1 であり得る。1 つ以上のアジュバントと組み合わせた、ペプチド、核酸、抗体、あるいはそのフラグメント、および/または本明細書に記載される APC などの有効な薬剤は、同じ投与単位、例えば、1 つのバイアル、坐薬、錠剤、カプセル、エアロゾルスプレーで製剤可能であり、あるいは、各々の薬剤、形態、および/または化合物は、別々の単位、例えば、2 つのバイアル、坐剤、錠剤、2 つのカプセル、錠剤およびバイアル、エアロゾルスプレーなどで製剤可能である。

#### 【0337】

修飾された膜貫通ポリペプチドに由来するワクチンによる疾患または疾病の処置

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたワクチンは、癌などの疾患または疾病の処置のために製剤される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍または血液系悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。いくつかの例では、固形腫瘍は、肛門癌、虫垂癌、胆管癌（つまり、胆管細胞癌）、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、未知の原発性の（CUP）の癌、食道癌、目癌、卵管癌、胃腸癌、腎癌、肝臓癌、肺癌、髄芽腫、黒色腫、口腔癌、卵巣癌、膵癌、甲状腺疾患、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、咽喉癌、甲状腺癌、子宮癌、膣癌、あるいは外陰癌を含む。

10

#### 【0338】

いくつかの例では、血液系悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、T細胞悪性腫瘍、またはB細胞悪性腫瘍を含む。いくつかの実施形態において、T細胞悪性腫瘍は、末梢性T細胞リンパ腫、特段の定めのない限り（PTCL-NOS）、未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽細胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATLL）、芽細胞性NK-細胞リンパ腫、腸疾患-血液系悪性腫瘍T細胞性リンパ腫、肝脾ガンマ-デルタT細胞性リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、鼻のNK/T細胞性リンパ腫、または処置関連T細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態において、B細胞悪性は、慢性リンパ性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、高リスクCLL、非CLL/SLLリンパ腫、あるいは前リンパ球性白血病（PLL）を含む。いくつかの実施形態において、癌は、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、非パーキットリンパ高悪性度Bリンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫（PMBL）、免疫芽細胞性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓周辺帯リンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体腔性リンパ腫、あるいはリンパ腫様肉芽腫症である。

20

30

#### 【0339】

いくつかの例では、本明細書に記載される抗体ベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

#### 【0340】

いくつかの例では、本明細書に記載される核酸ベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

40

#### 【0341】

いくつかの例では、本明細書に記載されるペプチドベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

#### 【0342】

いくつかの例では、本明細書に記載される樹状細胞ベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍であ

50

る。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

【0343】

いくつかの例では、本明細書に記載される抗原提示細胞（APC）ベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

【0344】

いくつかの例では、本明細書に記載されるウイルスベースのワクチンは、癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。他の例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は転移癌、または再発性あるいは難治性の癌である。

10

【0345】

ワクチン製剤

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるワクチンは、1つ以上のアジュバントと組み合わせて、例えば、有効な薬剤の投与可能な調製物へと処理を促す、賦形剤、希釈剤、および/または、助剤を含む1つ以上の生理学的に許容可能な担体を使用して、従来の方法で製剤される。適切な製剤は、選択された投与経路に少なくとも部分的に依存する。本明細書に記載される薬剤は、吸入と同様に、経口、パッカル、局所、直腸、経皮、口腔粘膜、皮下、静脈内、および筋肉内の適用を含む多くの投与経路または投与様式を用いて、患者に送達可能である。

【0346】

いくつかの例では、有効な薬剤は、非経口適用（例えば、注射、例えば、ボラス注入または持続注入による）のために製剤され、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量の注入液、あるいは追加の保存剤を備えた複数回投与用の包装容器で、単位投与量形態で提示することができる。組成物は、油性または水溶性のビヒクル中で懸濁液、溶液、あるいはエマルジョンなど、例えば、水溶性のポリエチレングリコール中で溶液などの形態をとることができる。

20

【0347】

注射可能な製剤については、ビヒクルは、水溶液あるいは油性懸濁液（すなわちエマルジョン）を、ごま油、トウモロコシ油、綿実油あるいはピーナッツ油とともに、エリキシル剤、マンニトール、デキストロース、あるいは無菌水溶液と同様に賦形薬と含んで、適切となるように当該技術分野で知られているものから選択可能である。製剤は、ポリ（乳酸-c-o-グリコール）酸などの、生体適合性または生物分解性のポリマー組成物をさらに含むことができる。これらの材料を、薬物を充填してマイクロスフィアまたはナノスフィアにすることができ、さらにコーティングまたは誘導体化することで、非常に優れた徐放性パフォーマンスを発揮することができる。眼周囲または眼内の注射に適したビヒクルは、例えば、脂肪親和性の強い物質に適している注射グレードの水、リボソーム、およびビヒクル中に治療薬の懸濁液を含んでいる。眼周囲または眼内の注射用の他のビヒクルは、当該技術分野で周知である。

30

【0348】

投与が注射による場合、有効な薬剤はしばしば水溶液で、とりわけ、ハックス液、リンゲル溶液、あるいは生理食塩水緩衝液などの生理学的に適合する緩衝液で製剤される。溶液は、懸濁剤、安定剤、および/または、分散剤などの製剤化剤（formulatory agent）を任意に含み得る。代替的に、活性成分は、使用前に適切なビヒクル、例えば、無菌の発熱物質を含まない蒸留水との構成のための粉末形態であってもよい。別の実施形態では、医薬品組成物は、アジュバントあるいはペプチドによって刺激された免疫反応を増強するために加えられた他の物質も含まない。別の実施形態では、医薬品組成物は、ペプチドへの免疫反応を阻害する物質を含む。例えば、製剤の方法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton Pで開示されるように、当該技術分野で知られている。

40

50

## 【0349】

経口投与については、有効な薬剤はしばしば、有効な薬剤を、当該技術分野で知られている薬学的に許容可能な担体と組み合わせることにより容易に製剤される。このような担体は、本発明の薬剤を、治療される患者による経口摂取のための、咀嚼錠、丸剤、ドラジェ、カプセル、ロゼンジ、ハードキャンディー、液体、ゲル、シロップ、スラリー、粉末、懸濁液、エリキシル剤、ウエハーなどを含む錠剤として製剤することを可能にする。こうした製剤は、固体の希釈剤あるいは充填剤を含む薬学的に許容可能な担体、無菌の水性培地、および様々な無毒な有機溶媒を含むことができる。固体の担体は、希釈剤、香料、可溶化剤、滑沢剤、懸濁化剤、結合剤、保存剤、錠剤崩壊剤、あるいは封入材料として作用し得る1つ以上の物質であり得る。粉末では、担体は一般に、微粉化された有効成分を含む混合物である微粉化された固体である。錠剤では、有効成分は一般に、適切な大きさで必要な結合能力を有し、かつ、望ましい形状と大きさに圧縮される担体と混合される。粉末と錠剤は好ましくは、活性化化合物の約1～約70パーセントを含む。適切な担体としては、限定されないが、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、砂糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低い融解ろう、ココアバター、などが挙げられる。一般に、有効な薬剤は、所望の投与量単位を提供するのに十分な量で、経口剤形の全組成物の、約0.5重量%、約5重量%、約10重量%、約20重量%、あるいは約30%～約50重量%、約60重量%、約70重量%、約80重量%、あるいは約90重量%までの範囲の濃度レベルで含まれ得る。

10

20

## 【0350】

いくつかの例では、ワクチンはエアロゾル溶液、懸濁液、あるいは乾燥粉末へ製剤される。エアロゾルは呼吸器系または鼻路を介して投与可能である。例えば、当業者は、本発明の組成物を適切な担体、例えば、薬学的に許容可能な噴霧剤)中で懸濁または溶解させることができ、鼻内噴霧薬または吸入薬を用いて肺へ直接投与することができるということ認識する。例えば、輸送体、担体、あるいはイオンチャネル阻害剤を含むエアロゾル製剤を、例えば、鼻内噴霧薬または吸入薬として投与される噴霧剤または溶媒と噴霧剤の混合物中に溶解、懸濁、または乳化させることができる。エアロゾル製剤は、当該技術分野で従来使用されているように、化粧用に、または皮膚科学的に、または薬学的に許容可能な噴霧剤などの、圧力下で任意の許容可能な噴霧剤を含むことができる。

30

## 【0351】

経鼻投与のためのエアロゾル製剤は一般に、滴剤またはスプレーで鼻路に投与されるように設計された水溶液である。点鼻液は、一般に等張であり、約5.5～約6.5のpHを維持するためにわずかに緩衝されるが、この範囲外のpH値も使用することができるという点で、鼻の分泌物に似ていることがある。抗菌薬または保存剤も製剤に含むことができる。

## 【0352】

いくつかの例では、吸入剤と吸入薬のためのエアロゾル製剤は、薬剤または薬剤の組み合わせが鼻または経口の呼吸器系のルートによって投与されるときに被験体の呼吸樹へ運ばれるように設計される。吸入溶液は、例えば、噴霧器によって投与可能である。微粉化された、または液体の薬物を含む吸入剤または吹入剤は、例えば、分配を助けるべく、噴霧剤中の薬剤または薬剤の組み合わせの溶液または懸濁液の製薬エアロゾルとして呼吸器系に送達可能である。噴霧剤は、ハロゲン化炭素、例えば、フッ素化した塩素化炭化水素、ヒドロクロロフルオロカーボン、およびヒドロクロロカーボンなどのフルオロカーボンを、炭化水素および炭化水素エーテルと同様に、含む液化ガスであり得る。

40

## 【0353】

ハロゲン化炭素噴霧剤は、水素がすべてフッ素と取り替えられたフルオロカーボン噴霧剤、水素がすべて塩素と少なくとも1つのフッ素と取り替えられたクロロフルオロカーボン噴霧剤、水素含有フルオロカーボン噴霧剤、および水素含有クロロフルオロカーボン噴霧剤を含み得る。ハロゲン化炭素噴霧剤は、Johnson, U.S. Pat. No.

50

5, 376, 359; Byron et al., U.S. Pat. No. 5, 190, 029; および、Purewal et al., U.S. Pat. No. 5, 776, 434に記載されている。本発明に役立つ炭化水素噴霧剤は、例えば、プロパン、イソブタン、n-ブタン、ペンタン、イソペンタン、およびネオペンタンを含んでいる。炭化水素の混合物混合物も噴霧剤として使用することができる。エーテル噴霧剤は例えば、エーテルと同様にジメチルエーテルも含んでいる。いくつかの例では、エアロゾル製剤はさらに1つを超える噴霧剤を含む。例えば、エアロゾル製剤は、2つ以上のフルオロカーボンなどの同じクラスからの1つを超える噴霧剤；あるいはフッ化炭化水素と炭化水素などの様々なクラスからの1つを超える、2つを超える、および3つを超える噴霧剤を含み得る。いくつかの例では、ワクチンは、圧縮ガス、例えば、二酸化炭素、亜酸化窒素、または窒素などの不活性ガスで分配される。

10

## 【0354】

エアロゾル製剤はさらに、他の成分、例えば、エタノール、イソプロパノール、プロピレングリコールを、界面活性剤または油と洗浄薬などの他の成分と同様に含み得る。これらの成分は、製剤を安定させる役目を果たし、および/または、弁構成要素を潤滑する。

## 【0355】

いくつかの例では、エアロゾル製剤は圧力下でパッケージ化され、溶液、懸濁液、エマルジョン、粉末、および半固形製剤を使用して、エアロゾルとして製剤される。例えば、溶液エアロゾル製剤は、(実質的に)純粋な噴霧剤中で、あるいは噴霧剤と溶媒の混合物として、輸送体、担体、あるいはイオンチャンネル阻害剤などの本発明の薬剤の溶液を含み得る。溶媒は薬剤を溶かすために、および/または、噴霧剤の蒸発を遅らせるために、使用することができる。溶媒は例えば、水、エタノール、およびグリコールを含み得る。適切な溶媒の任意の組み合わせが、保存剤、抗酸化剤、および/または、他のエアロゾル成分と随意に組み合わせ使用可能である。

20

## 【0356】

いくつかの例では、エアロゾル製剤は分散液または懸濁液である。懸濁液エアロゾル製剤は、本発明の薬剤の懸濁液あるいは薬剤の組み合わせ(例えば、輸送体、担体、イオンチャンネル阻害剤、分散剤)を含み得る。分散剤は、例えば、ソルビタントリオレート、オレイルアルコール、オレイン酸、レシチン、およびトウモロコシ油を含み得る。懸濁液エアロゾル製剤はさらに、滑沢剤、保存剤、抗酸化剤、および/または他のエアロゾル成分を含み得る。

30

## 【0357】

場合によっては、エアロゾル製剤はエマルジョンとして製剤される。エマルジョンエアロゾル製剤は、本発明の薬剤、例えば、輸送体、担体、イオンチャンネルの組み合わせと同様に、例えば、エタノールなどのアルコール、界面活性剤、水、および噴霧剤を含み得る。使用された界面活性剤は非イオン性、アニオン性、またはカチオン性であり得る。エマルジョンエアロゾル製剤の1つの例は、例えば、エタノール、界面活性剤、水、および噴霧剤を含む。エマルジョンエアロゾル製剤の別の例は、例えば、植物油、モノステアリン酸グリセリン、およびプロパンを含む。

40

## 【0358】

ワクチン投与量、投与経路、および治療レジメン

いくつかの例では、ワクチンは様々なルート送達される。典型的な送達ルートは、経口(バツカルまたは舌下)、直腸、経鼻、局所、経皮パッチ、肺、膺、坐薬、あるいは非経口(筋肉内、動脈内、髄腔内、皮内、腹腔内、皮下、および静脈内)投与、あるいはエアロゾル投与、吸入、あるいは吹入れによる投与に適した形態での投与を含む。薬物送達系に関する一般的な情報は、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Lippencott Williams & Wilkins, Baltimore Md. (1999))で見つけることができる。いくつかの例では、本明細書に記載されるワクチンは筋肉に投与され、あるいは皮内または皮下注射によって、またはイオン浸

50

透療法によるなどして経皮的に投与可能である。場合によっては、ワクチンの表皮投与が使用される。

【0359】

いくつかの例では、ワクチンは鼻路による投与のために製剤される。担体が固体である経鼻投与に適した製剤は、嗅ぎタバコを摂取するようなやり方、つまり、鼻にできるだけ接近させた状態の粉末の容器から鼻路を通る迅速な吸入によって投与される、例えば、約10～約500ミクロンの範囲の粒径を有する粗粉末を含み得る。製剤は鼻内噴霧剤、点鼻液、あるいは噴霧器によるエアロゾル投与であり得る。製剤は、ワクチンの水溶性または油性の溶液を含み得る。

【0360】

場合によっては、ワクチンは懸濁液、シロップ、またはエリキシルなどの液体調合物である。ワクチンは、無菌の懸濁液またはエマルジョンなどの非経口、皮下、皮内、筋肉内、または静脈内の投与（例えば、注射可能な投与）のための調合物であってもよい。

【0361】

いくつかの例では、ワクチンは、単一の免疫処置のための材料を含むこともあれば、複数の免疫処置（つまり「複数回投与量」キット）のための材料を含むこともある。いくつかの例では、保存剤は複数回投与量構成に含まれる。複数回投与量組成物中に保存剤を含むことの代わりとして（に加えて）、組成物は材料の除去のための無菌のアダプターを有する容器に含まれ得る。

【0362】

いくつかの例では、ワクチンは約0.5mLの投与量で投与されるが、子どもには半分の投与量（つまり、約0.25mL）しか投与することができない。しばしば、ワクチンは高用量（例えば、約1mL）で投与可能である。

【0363】

いくつかの例では、ワクチンは、1、2、3、4、または5回以上の投与量コースレジメンとして投与される。しばしば、ワクチンは2、3、あるいは4回の投与量コースレジメンとして投与される。しばしば、ワクチンは2回投与量コースレジメンとして投与される。

【0364】

いくつかの例では、2回投与量コースレジメンの第1の投与量と第2の投与量の投与は、約0日、1日、2日、5日、7日、14日、21日、30日、2か月、4か月、6か月、9か月、1年、1.5年、2年、3年、4年、またはそれ以上に分けられる。

【0365】

いくつかの例では、本明細書に記載されたワクチンは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年、またはそれ以上ごとに投与される。しばしば、本明細書に記載されたワクチンは2、3、4、5、6、7年、またはそれ以上ごとに投与される。しばしば、本明細書に記載されたワクチンは4、5、6、7年、またはそれ以上ごとに投与される。しばしば、本明細書に記載されたワクチンは一度投与される。

【0366】

投与量の例は限定的なものではなく、本明細書に記載されたワクチンを投与するための特定の投薬レジメンを例証するために使用されているに過ぎない。ヒトで使用される有効な量は動物モデルから決定することができる。例えば、ヒトのための投与量は、動物に効果的であると分かっている循環型の肝臓、局所、および/または胃腸の濃度を達成するために製剤可能である。動物データと他のタイプの同様のデータに基づいて、当業者はヒトに適切な有効な量のワクチン組成物を決定することができる。

【0367】

薬剤あるいは薬剤の組み合わせを参照する際に、有効な量とは、医療または製薬の分野における様々な規制機関または諮問機関（例えば、FDA、AMA）のいずれかによって、あるいはメーカーまたは供給元によって推奨または承認されている、投与量範囲、投与のモード、製剤などを一般に意味する。

10

20

30

40

50

## 【0368】

いくつかの例では、ワクチンは、疾患または疾病（例えば癌）に関連した症状の発症の前に、間、または後に、投与することができる。典型的な症状としては、熱、咳、咽喉痛、鼻水および/または鼻づまり、頭痛、悪寒、疲労、悪心、嘔吐、下痢、疼痛、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの例では、ワクチンは癌の処置のために投与される。場合によっては、ワクチンは癌の予防療法などの予防のために投与される。場合によっては、ワクチンは患者からの免疫反応を誘発するために投与される。

## 【0369】

いくつかの態様では、本明細書に記載されたワクチンとキットは、2°Cと8°Cの間で保存される。いくつかの例では、ワクチンは冷凍で保存されない。いくつかの例では、ワクチンは-20°Cまたは-80°Cなどの温度で保管される。いくつかの例では、ワクチンは日光から離れて保管される。

10

## 【0370】

キット/製品

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の方法とプラットフォームとともに使用されるキットおよび製品が本明細書で開示される。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1以上の容器を収容するために仕切られた運搬装置、包装または容器を含み、各容器は本明細書中に記載されている方法を使用するための分けられた要素の1つを備える。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管を含む。他の実施形態において、容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成される。

20

## 【0371】

本明細書で提供される製品は包装材料を含む。製薬用包装材料の例としては、限定されないが、プリスターパック、瓶、チューブ、バッグ、容器、瓶、および選択された製剤と意図した投与および随意の処置のモードに適する任意の包装材料が挙げられる。

## 【0372】

例えば、包装容器は、精製された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、イオンチャンネルポリペプチドまたはGPCR）、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、イオンチャンネルポリペプチドまたはGPCR）構築物、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えば、イオンチャンネルポリペプチドまたはGPCR）に対する抗体、あるいは本明細書に記載された修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えばイオンチャンネルポリペプチドまたはGPCR）に基づくワクチンを含む。そのようなキットは、識別用の記載またはラベル、あるいは本明細書に記載される方法における使用に関する説明書を随意に含む。

30

## 【0373】

キットは典型的には、使用される内容物および/または説明書を列挙するラベルと、使用される説明書を備えた添付文書とを含んでいる。1セットの説明書も典型的に含まれる。

## 【0374】

1つの実施形態では、ラベルは容器上にあるか容器に付随する。1つの実施形態において、ラベルを形成する文字、数字または他の表示が、容器自体に貼り付けられるか、成形されるかまたは刻まれている場合は、ラベルは容器上に取り付けられる。ラベルは、例えば添付文書として容器を保持するレセプタクルまたは運搬装置内に存在するとき、容器に付随する。の実施形態において、ラベルは、内容物が特定の治療用途に用いられるべきものであるということを示すために用いられる。ラベルは、例えば、本明細書に記載の方法で、内容物を用いる使用するための指示を示すように使用されてもよい。

40

## 【0375】

ある実施形態では、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチド（例えばイオンチャンネルポリペプチドまたはGPCR）に基づくワクチンは、本明細書で提供される化合物を含む1つ以上の単位剤形を含んでいるパックまたはディスペンサー装置で提

50

示される。実施形態において、パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチックホイルを含む。さらなる実施形態において、パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が添付してある。別の実施形態において、パックまたはディスペンサーには、医薬品の製造、使用または販売を制御する政府機関によって規定された形態の容器に付属の通知書が添付してあり、この通知書は、ヒトまたは動物の投与のための薬物の形態についての、政府機関の承認を反映するものである。実施形態において、このような通知書は、例えば、処方薬または承認された生成物の挿入に関して、米国食品医薬品局により承認されたラベルである。1つの実施形態において、適合性の製薬担体で製剤される本明細書で提供される化合物を含む組成物も調製され、適切な容器に入れられ、示された疾病の処置のためにラベル付けされる。

10

#### 【0376】

特定の化学用語

別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語と科学用語はすべて、主張される主題が属する当該技術分野の当業者により一般に理解されるのと同じ意味を持っている。一般的な記載と詳細な記載は典型的かつ説明的なものに過ぎず、主張される主題を制限するものではないことを理解されたい。本出願では、単数の使用は、特別に別記しない限り、複数を含む。明細書および添付の請求項内で用いられる通り、単数形「a」、「an」、「the」は、その文脈が明確に定めていない限り、複数の指示対象を含むことに留意する。本出願において、「または」の使用は特に明記しない限り、「および/または」を意味する。さらに、用語「含んでいる (including)」の使用は、「含む (include)」、「含む (includes)」、「および「含まれる (included)」といった他の形態と同じく、限定的なものではない。

20

#### 【0377】

本明細書で使用されるように、範囲と量は「約」特定の値または範囲として表現可能である。「約」は正確な量も含んでいる。従って、「約5  $\mu$ L」とは「約5  $\mu$ L」と「5  $\mu$ L」を意味する。一般に、用語「約」は、実験誤差の範囲内、例えば、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 15\%$ 内であると典型的に予想される量を含む。

#### 【0378】

本明細書に使用される段落の見出しは、組織化するためのものに過ぎず、記載される主題を制限するものと解釈されてはならない。

30

#### 【0379】

本明細書で使用されるように、用語「個体」、「被験体」、および「患者」は任意の哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は非ヒトである。いかなる用語も、保健従事者（例えば、医者、正看護師、臨床看護師、医師助手、看護助手、あるいはホスピスの職員）の監督（例えば、常時または断続的）を特徴とする状況に制限されない。

#### 【0380】

本明細書で使用されるように、「動作可能に連結された」との用語は、例えば、第1の核酸分子が第2の核酸分子とインフレイムで（またはリーディングフレーム中で）結合していること、および、第1の核酸分子と第2の核酸分子の両方が、翻訳の際に、それぞれ第1のポリペプチドと第2のポリペプチドをコードすることを意味する。いくつかの例では、「動作可能に連結された」とは、直接連結または間接連結をさらに含み、例えば、第1の核酸分子は第2の核酸分子に直接連結するか、あるいは、リンカー配列によって間接連結する。いくつかの例では、第1の選択マーカー遺伝子と第2の選択マーカー遺伝子の文脈では、第1の選択マーカー遺伝子は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのコードされたC末端に動作可能に連結される（あるいはインフレイムで連結される）。場合によっては、第2の選択マーカーは、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのコードされたN末端に動作可能に連結される（あるいはインフレイムで連結される）。いくつかの例では、第1の選択マーカー遺伝子および/または第2の選択マーカー遺伝子は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドに直接連結されるか、または、リンカー配列によって本ボ

40

50

リヌクレオチドに間接連結される。場合によっては、リンカー配列は、長さが約1～約60のアミノ酸残基、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または約60のアミノ酸残基のリンカーポリペプチドをコードする。

#### 【0381】

本明細書で使用されるように、用語「産生ベクター」は、所望のタンパク質の産生のために利用される発現ベクターを意味する。例えば、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型ポリペプチドの文脈では、産生ベクターは、修飾された複数膜貫通型ポリペプチドのタンパク質産生に使用される発現ベクターである。いくつかの例では、産生ベクターは、細菌の（例えば、大腸菌）発現ベクター、昆虫発現ベクター、酵母発現ベクター、アルジー発現ベクター、あるいは哺乳動物の発現ベクターである。いくつかの例では、産生ベクターは、（例えば、N末端および/またはC末端に直接的に連結または間接的に連結される）修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードし、および、修飾された複数膜貫通型ポリペプチド-選択マーカポリペプチド融合タンパク質をコードする遺伝子に動作可能に連結される本明細書に記載されるような選択マーカ遺伝子を含まない。場合によっては、産生ベクターは、式I-IVの修飾された複数膜貫通型ポリペプチドをコードしない。

10

20

#### 【実施例】

#### 【0382】

これらの実施例は説明目的のために提供されるにすぎず、請求項の範囲を制限するものではない。

#### 【0383】

##### 実施例1-ライブラリー生成相

DNAシャフリングと随意に結び付けられた無作為の突然変異誘発は、複数の位置における全種類の組み合わせのアミノ酸置換に同時に影響を及ぼす。エラーブローンPCRは遺伝子のライブラリー（第1のレベル・ライブラリー）を生成するために使用され、DNAコード領域（突然変異のかなり均質な頻度）の各1Kbあたりの翻訳後に、2-8のアミノ酸残基を任意に突然変異させた。随意に、DNAシャフリング（StEP、Staggered Extension PCR）は、第2のライブラリー（第2のレベル）を生成するために続いて使用され、遺伝子を、DNAコード領域の各1Kb当たり約1-15の異なるアミノ酸中で無作為に突然変異させた。

30

#### 【0384】

構築物の様々な成分の機能的な折り畳みを可能にするために、これらのドメインをすべて、様々な小さなオリゴペプチドリンカーによって分離させた。化学的な誘導物質（例えば、アラビノース、IPTG）を加えるとともに、構成的なプロモーター（例えば、Plac）または誘導性プロモーター（例えば、araBAD、T7）を使用して、構築物を選択宿主大腸菌中で永久的に転写させた。

40

#### 【0385】

##### 実施例2-複数膜貫通型ポリペプチドバリエーション選択のための構築物の設計

変異させた遺伝子を、以下を含むあらかじめ形成された構築物（プラスミド形態）に挿入した：

- ・シグナル配列、
- ・そのC末端側の第1の選択マーカタンパク質/酵素（例えば、カナマイシン耐性遺伝子）、
- ・受容体のN末端側のマルトース結合タンパク質（MBP）または第2の選択マーカタンパク質/酵素（例えば、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子）。

#### 【0386】

50

## 実施例 3 - 選別相

その後、修飾された遺伝子を含む構築物ライブラリーをその後用いて、大腸菌株（例えば、BL21またはDH10beta）を変形させた。液体培養物と寒天プレートの両方でカナマイシンの濃度を変動させながら（非形質転換細胞用のMICはおよそ10 mg/Lであった）LB培地上で成長を試験した。

## 【0387】

ラット（NTSR1、UniProt P20789）からの野生型のニューロテンシン受容体1のN末端切断（aa 43 - 424）が対照系として使用された。

## 【0388】

約25の構築物を、以下の組み合わせからなる野生型のNTSR1を用いて生成した：  
 ・3つの様々なシグナル配列（gIIISs、DsbaSs、MBPss）；  
 ・2つの融合パートナー（TrxA、MBP）；  
 ・いくつかのオリゴペプチドリンカー；および、  
 ・抗生物質耐性酵素（カナマイシン抵抗性についてNPTII、ゲンタマイシン抵抗性についてAAC(3)-1、カルベニシリン抵抗性についてTEM-1 -ラクタマーゼ）。

## 【0389】

大腸菌がNTSR1（>50 mg/Lのカナマイシン、>75 mg/Lのカルベニシリン）を含む特定の構築物を発現するとき、試験された両方の抗生物質（カルベニシリンとゲンタマイシン）の明白なMICはかなり増加した。

## 【0390】

大腸菌がヒトからの野生型の膜貫通タンパク質受容体GPR55（UniProt Q9Y2T6）（約25 mg/Lのカナマイシン、40 mg/Lのカルベニシリン）をコードするプラスミドを含んでいたとき、試験された両方の抗生物質（カルベニシリンとカナマイシン）のMICも増加した。

## 【0391】

変異したGPR55遺伝子のライブラリーは、1つの遺伝子当たり約3~15の突然変異（残基）を含むように作られた。増強された受容体突然変異体を含むプラスミドの選択は50 mg/Lのカナマイシンで行われた。

## 【0392】

これらのライブラリーを備えた大腸菌株の形質転換は、高濃度のカナマイシン（>50 mg/L）あるいはカルベニシリン（>80 mg/L）に対する耐性を与えることができる突然変異GPR55クローンの単離をもたらした。

## 【0393】

突然変異したクローンを、pcDNA3.1ベクターを使用するトランスフェクションによって、HEK293Tを含む哺乳動物の発現宿主へ移した。発現は、電気泳動（図2）とfSEC技術で判断されるように、野生型のGPR55を含む構築物の5倍以上増加することがわかった。

## 【0394】

突然変異したクローンが発現されて精製された；結果として生じたタンパク質 - 洗浄薬複合体サンプルは、（fSEC（図3）と蛍光測定技術で判断されるように）突然変異誘発の1回のラウンドの後に野生型を上回って最大で7°Cまでの熱安定性の増加を実証した。

## 【0395】

突然変異したクローンはさらに、受容体サンプルをリガンドのない形態（図4）中で精製したとき、野生型と比較して、より均質なオリゴマー状態を実証した。

## 【0396】

選択宿主として超好熱性種（例えばサーマス・サーモフィラス）を使用する場合、大腸菌中で行われた選択プロセスと比較すると、（熱的変性フォーマット中の）同定された突然変異体のタンパク質融解温度は優れていることが予想される。（つまり、野生型よりも

10

20

30

40

50

10°C以上高い)。

【0397】

実施例4 - タンパク質産生のための構築物の設計

1セットの構築物は、発現され、細胞性膜から抽出され、均質になるまで単離および精製され、かつ、化合物スクリーニング、抗体選択、あるいは結晶化に適している、修飾された複数膜貫通型タンパク質を生成するように設計される。いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型タンパク質は、N末端とC末端の切断、表面の突然変異、および、内部切断ならびに/またはポリペプチド挿入を含む他の修飾を含んでいる。

【0398】

これらの構築物は、精製のためにC末端またはN末端のヒスチジンタグで操作され、精製後にタグまたは融合タンパク質を切断することができるように、タバコエッチウイルスプロテアーゼまたはPrescissionプロテアーゼ切断部位を含んでいる。

【0399】

複数膜貫通型タンパク質用のcDNAは、大規模な発現と精製に適した選択された宿主中での発現に適しているベクターにクローン化される(例えば、細菌細胞、または真核細胞。哺乳動物細胞または昆虫細胞は、ヒトの複数膜貫通型タンパク質に特に適している)。

【0400】

実施例5 - 薬理学(細胞に基づくアッセイ)

薬物化合物のスクリーニングまたは結晶化において使用前の複数膜貫通型タンパク質の機能が評価され、これはタンパク質が生物学的に関連する形態で折り畳まれているという証拠を与える。受容体の機能は、アゴニストまたはアンタゴニスト特性(リガンド)を用いて、小分子化合物、ペプチド、あるいはタンパク質結合剤に対するその反応を測定することにより決定される。これは、HEK293またはCOSなどのインビトロの培養された真核細胞系において膜タンパク質を発現することにより行われる。追加されたモジュレーターに対する機能的反応は、環状アデノシンリン酸(cAMP)またはカルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )の量の蓄積または減少などの測定可能な代謝産物のその後の産生を引き起こす、1つ以上の直接的なエフェクタータンパク質の活性化を介して評価される、細胞生理学に対するイオンチャネルポリペプチドなどの修飾された複数膜貫通型タンパク質の効果は、例えば、電気化学ポテンシャル勾配の変動によって測定される。

【0401】

追加されたリガンドによるGPCRなどの修飾された複数膜貫通型タンパク質の活性化は特定のGタンパク質シグナル伝達経路を作動させることがあり、これは、cAMPの産生の増加または減少を引き起こす。アゴニストリガンドによるGPCRの活性化は、EC50として知られている50%の応答を達成するのに必要な有効濃度を決定するために使用されるcAMPレベルの増加を引き起こすことがある。アンタゴニストリガンドは産生cAMPを阻害することがあり、このことは、50%の抑制濃度(IC50)として発現される、アゴニストリガンドシグナル伝達による競合を示している。EC50とIC50の値は、リガンドの相対的効力をアゴニストまたはアンタゴニストの特性と比較するために使用される。

【0402】

修飾された複数膜貫通型タンパク質の薬理的な機能の評価は、既知のアゴニストの存在に応じた細胞内の $Ca^{2+}$ レベルの測定を介して行われる。GPCRあるいは著しい $Ca^{2+}$ 透過性を備えたイオンチャネルを安定的にまたは一時的に発現する哺乳動物の細胞株に、細胞透過性であり、かつ細胞内の $Ca^{2+}$ に対する反応で蛍光を発する染料をあらかじめ充填する。既知のリガンドでの刺激後、蛍光は、プレートリーダーまたは蛍光イメージングプレートリーダー、あるいは蛍光活性化細胞選別(FACS)に基づく $Ca^{2+}$ 動員検出技術によって測定される。

【0403】

既知のリガンドに応じた膜電位の変動も、イオンチャネルを安定的にまたは一時的に発

10

20

30

40

50

現する哺乳動物の細胞株において、細胞内部の正の荷電イオンに従う際に蛍光シグナルを増加させ、逆に、細胞外部での正の荷電イオンに従う際に蛍光シグナルを減少させる染料を使用して測定される。

【0404】

実施例6 - サンプル精製とQC

サンプル精製

【0405】

複数膜貫通型タンパク質（本明細書では「使用可能な膜タンパク質」あるいは「EMP」とも呼ばれる）は、洗浄薬を使用して、および、クロマトグラフィー方法を使用して、リガンド（化合物、ペプチド、あるいは抗体）を用いてまたは用いずに精製された。100 kDaの分子量カットオフを備えたVivascience（登録商標）回転カラムを使用してサンプルを濃縮した。サンプル精製工程の略図が図5Aで例証される。

10

【0406】

サンプルQC

【0407】

複数膜貫通型ポリペプチドの精製収率、均質性、オリゴマー状態、および安定性を検証し、タンパク質 - 洗浄薬複合体の形態で分析的なサイズ排除クロマトグラフィー（図5Bと図5C）によって評価されるような野生型の複数膜貫通型タンパク質と比較した。純度は、Coomassie染色または他の染色と組み合わせてSDS-PAGEを使用して評価された。タンパク質の安定性は、熱蛍光測定アッセイ、例えば、図5Dで示されるようなCPMアッセイを使用して評価された。

20

【0408】

EMPサンプルの品質と収率は、タンパク質 - 洗浄薬複合体の形態で分析的なサイズ排除クロマトグラフィーによって評価された。タンパク質の安定性はCPMアッセイを使用して評価された。すべてのEMPは、eGFP部分を含む融合タンパク質として生成された。

【0409】

実施例7 - 表面プラズモン共鳴（SPR）を使用しりEMP結合および動力学的データ結合データ

【0410】

表面プラズモン共鳴（SPR）は、両分子の相互作用の親和性をモニタリングするために使用された（会合と解離の速度定数の分析、両分子の相互作用動力学的モデリング、平衡結合分析、およびリガンド特異性研究）。NHS/EDCカップラー（図6A）を使用して、例証的なEMP-005をBiacoreチップに連結した。HIS標識したEMP-005をNTAチップ（図6B）に連結した。両方のセンサーグラムは、EMP-005サンプルの最適な結合特性を示す。

30

【0411】

動力学的データ

【0412】

2つの小分子化合物（～450Da）を用いて、EMP-005の品質と結合動力学を判定した。センサー表面は、両方の小分子化合物（図6C）の結合動力学（Ka、Kd、KD）を観察および測定するために十分な密度であった。2つの化合物の1つだけのための実証的なデータが図6Cで示される。化学的に結合した受容体は非共有的に捕獲された受容体に等しく機能的であり、このことは、タンパク質がカップリング化学検査に耐えることを示す。

40

【0413】

実施例8 - ナノテクノロジーに基づくDNA送達系を使用するGPR55 EMPs（商標）クローン012を用いる免疫処置

遺伝子免疫処置とタンパク質を用いる追加免疫

【0414】

50

いくつかの実施形態において、EMP s (商標)は、野生型または内在性のGPCR標的に対する抗体の生成を可能にする。GPR55 EMP s (商標)の免疫原性は、インビボのDNA免疫処置と、その後の精製されたEMP s (商標)タンパク質を用いるタンパク質の追加免疫を用いて、マウスにおいて試験された。

【0415】

遺伝子免疫処置は、In-Cell-Art (Nantes, France)でNanoTaxi (登録商標)を使用して行われた。NanoTaxi (登録商標)は、送達された遺伝物質が脂質とポリマーの様々な化学ファミリーの混合物とともに製剤される遺伝子免疫処置に最適化されたDNA送達系である。

【0416】

GPR55受容体のEMP012に対応するcDNAはpCMVベースのベクターへクローン化され、細胞表面発現は免疫原投与の前にHEK293TとHeLaの細胞の一時的なトランスフェクションによって確認された。

【0417】

C57BL6マウスを、一次攻撃誘発のためにNanoTaxi (登録商標)へ製剤された50µgのEMP012 cDNA構築物で免疫化し、その後、2回の週ごとの間隔で同じNanoTaxi (登録商標)ベースの製剤を用いて50µgの2回の追加免疫を行い、その後、IFAアジュバント中の精製されたEMP012タンパク質50µgを用いて1回追加免疫した。いくつかの例では、追加免疫は1次抗体応答の体細胞の超突然変異によってインビボの親和性成熟のために実行された。免疫反応のレベルは、無関係なGPCR (左のパネル)またはWT-GPR55 (右のパネル)でトランスフェクトされたHeLa細胞を使用して、FACS分析によって等間隔で評価された(図7)。

【0418】

GPR55受容体のEMP012は、FACS分析(図7)によって野生型のGPR55トランスフェクトされたHEK293細胞を特異的に認識するポリクローナル抗体によって示されるようにWT-GPR55に対する頑強かつ特異的な免疫反応をもたらした。

【0419】

野生型のGPR55とGPR55-EMP-012の配列がそれぞれ図9と図10で例証される。

【0420】

実施例9 - 固定されたEMP (商標)はELISAフォーマットでWT受容体に特異的な抗体と結合する。

精製されたケモカイン受容体(EMP (商標))は、ELISAフォーマットでのWT受容体に特異的な抗体の結合を試験するために使用された。蛍光標識抗体を使用するとき、凍結/解凍の事象およびその両方が同一の優れた蛍光シグナルを与えた前後に、抗体の結合を測定した(図8)。

【0421】

実施例10 - 薬理学(タンパク質に基づくアッセイ)

複数膜貫通型タンパク質の結合薬理学は、発現された修飾された複数膜貫通型タンパク質に対するアゴニストリガンドまたはアンタゴニストリガンド(小分子、ペプチド、あるいはタンパク質)の結合を、直接的または間接的にモニタリングする方法によってタンパク質レベルで評価される。所望の複数膜貫通型タンパク質を発現する真核生物または原核生物の宿主から精製された細胞性膜の調合物は単離され、結合アッセイフォーマットで使用され、ここで、所望の修飾された複数膜貫通型タンパク質を含む細胞膜は放射標識された化合物でインキュベートされ、残余に結合した化合物は、過剰な標識を除去するためにサンプルを洗浄した後に測定される。残余結合標識の放射能の測定はシンチレーション計数器によって測定される。

【0422】

洗浄薬で可溶化および精製された修飾された複数膜貫通型タンパク質に対する小分子化合物、ペプチド、およびタンパク質の結合は、シンチレーション近接アッセイを使用して

10

20

30

40

50

判定される。原核生物または真核生物の宿主中で発現された修飾された複数膜貫通型タンパク質は、洗浄薬を用いて細胞膜から抽出され、その後、修飾された複数膜貫通型タンパク質は精製され、シンチレーション近接ビーズに結合される。放射標識されたりガンドをビーズでインキュベートし、その後、洗浄して未結合のりガンドを除去し、シグナルをシンチレーションカウンターで読み取る。

#### 【0423】

##### 実施例11 - 突然変異誘発の複数回ラウンド

同定された修飾された複数膜貫通型タンパク質コード化遺伝子は、異なる複数膜貫通型タンパク質の物理化学的性質へさらなる利点を与える新たな突然変異を同定するために、後に一連の突然変異誘発を経験する。

10

#### 【0424】

多くの同定された修飾された複数膜貫通型タンパク質コード化遺伝子は混ぜ合わされ、DNAシャフリングと選択を経験することで、前もって同定されていたものの様々な修飾された複数膜貫通型タンパク質遺伝子中に存在する協同突然変異を同定した。こうした協同突然変異は、異なる複数膜貫通型タンパク質の物理化学的性質へさらなる利点を与える。

#### 【0425】

修飾された複数膜貫通型タンパク質の遺伝子と野生型遺伝子の混合物を使用してDNAシャフリングを行うことにより、多くの突然変異を含む同定された修飾された複数膜貫通型タンパク質から、不必要な突然変異が除去される。選択宿主はこの生成物を用いて再度形質転換され、最後の選択ラウンドは、元々の修飾された複数膜貫通型タンパク質の物理化学的性質を維持することができると最小限の突然変異セットを同定するために行われる。

20

#### 【0426】

##### 実施例12 - 結晶化と構造決定

結晶化試行については、精製および濃縮されたサンプルは、クリスタラント(crySTALLANT)緩衝液と混ぜ合わされ、特定の温度において蒸気拡散状態でインキュベートされる。代替的に、タンパク質サンプルは、脂質立方相を形成するために脂質と混ぜ合わされ、後に、合わせガラスプレートに分配され、ここで、LCPは特定の温度でのインキュベーションの前にクリスタラント緩衝液と接触する。

30

#### 【0427】

結晶はナイロンループを使用して収穫され、蒸気拡散結晶化方法の場合には、結晶を移し、凍結防止剤を含む母液にひたして、液体窒素中で急速冷凍させる。代替的に、LCPマトリックスから結晶を収穫し、液体窒素中で直接、急速冷凍させる。

#### 【0428】

データセットはシンクロトロンビームラインで集められ、モデルの構成および改善のように、データを結晶学的なソフトウェアを使用して処理する。構造は、RCSPプロテインデータバンク(PDB)から、得られたサーチモデルとして既知で、かつ、構造上同様の膜タンパク質から原子の座標を使用して、分子の交換によって例えば解決される。

40

#### 【0429】

##### 実施例13 - 修飾された複数膜貫通型タンパク質を用いる追加免疫処置方法タンパク質を用いる遺伝子免疫処置と追加免疫

対応する修飾された複数膜貫通型タンパク質をコードするcDNAは、特殊な遺伝子免疫処置ベクターへクローン化され、細胞表面発現は、遺伝子銃または他のDNA送達系を用いる他の免疫処置ルートにより皮内投与の前に、HEK293、HEK293T、Cos-7、またはHeLa細胞の一時的なトランスフェクションによって確認される。免疫処置は、受託試験機関の固有の免疫処置を使用し、ベクターあるいは内部で開発された遺伝子免疫処置ベクターをスクリーニングして、受託試験機関によって行われる。

#### 【0430】

免疫学的に関連するTヘルパー(Th)エピトープは、マウス免疫処置の手順を最適

50

化するために免疫処置ベクター配列に含まれる。さらに、免疫処置とスクリーニング用のベクターは検出タグを含むように操作され、それにより、例えば、全細胞上での血清の蛍光活性化細胞選別 (FACS) 分析によって、免疫処置の発現の成功と発現構築物との間の判別が可能となる。

#### 【0431】

Balb-cマウスとウイスターラットを含む様々な種を、一次攻撃誘発のために複数膜貫通型ポリペプチドcDNA構築物50-100 $\mu$ gで免疫化し、その後、2回の週ごとの間隔をおいて同じ複数膜貫通型ポリペプチドのcDNA50-100 $\mu$ gを3-6回追加免疫し、その後さらに、50 $\mu$ gの精製された複数膜貫通型ポリペプチドを用いて1-3回の追加免疫処置を行った。

#### 【0432】

追加免疫処置は、1次抗体応答の体細胞超突然変異によるインビボの親和性の成熟に必要とされる。免疫応答のレベルはFACS分析とELISAによって等間隔で評価される。

#### 【0433】

FACSによる免疫応答における血清力価の評価

細胞を発現する修飾された複数膜貫通型タンパク質上での免疫化された動物における誘発された免疫応答をモニタリングするために、マウス、ラット、あるいはウサギからの免疫前の血清サンプルは一時的な出血と比較される。FACS分析を使用して、修飾された複数膜貫通型タンパク質を発現する細胞VS無関係のcDNAでトランスフェクトされた細胞およびトランスフェクトされていない細胞によって、免疫化されたコホートでの免疫応答の有意差を観察して、免疫応答の特異性をモニタリングする。

#### 【0434】

平均の蛍光強度(MFI)は、マウスまたはラットの血清サンプルに関するヒストグラムプロフィールを用いて、各血清サンプルについて棒グラフとしてプロットされている。これは、免疫応答が特異的な抗体反応を起こしたことを実証する。

#### 【0435】

ELISAによる免疫応答における血清力価の評価

Histタグ付けした修飾された複数膜貫通型タンパク質は、96ウェルのニッケルキレート化合物プレート上に固定され、血清サンプルを分析のために希釈化して、複数膜貫通型ポリペプチドとそのWT対応物への結合を定量化および評価する。マウスでは、修飾された複数膜貫通型タンパク質に追加免疫を行うことで、力価を同じレベルで維持するか、力価を増大させる。

#### 【0436】

免疫蛍光検査法

免疫蛍光検査データは、対応する野性型受容体で観察されたデータと比較して、修飾された複数膜貫通型タンパク質の発現と細胞内での局在性を実証するために使用される。宿主細胞(例えば、HEK293、HEK293T、Cos-7、またはHela)は、修飾された複数膜貫通型タンパク質あるいは対応するWTコード化遺伝子のいずれかで、一時的にあるいは安定的にトランスフェクトされる。マウスとラットの血清サンプルは、修飾された複数膜貫通型タンパク質を発現する細胞、WT、および、トランスフェクトされていない細胞でインキュベートされ、結合された血清は、抗マウスAlexa Fluor 488と抗ラットAlexa Fluor 488をそれぞれ使用して検知される。

#### 【0437】

実施例14 - アゴニストまたはアンタゴニストの立体構造での修飾された複数膜貫通型タンパク質遺伝子免疫処置

アゴニストまたはアンタゴニスト立体構造を保持するためにインビボの選択された修飾された複数膜貫通型タンパク質のコード化DNA配列は、遺伝子免疫処置ベクターへとクローン化され、細胞表面発現は、例えば、遺伝子銃アプローチを使用して皮内投与の前に、HEK293、Cos-7、HelaまたはHEK293T細胞の一時的または安定的

10

20

30

40

50

なトランスフェクションによって確認される。Balb-cまたはC57BL/6マウスは、一次攻撃誘発のために50-100 $\mu$ gの複数膜貫通型ポリペプチドcDNA構築物、あるいはWT cDNAで免疫化され、2回の週ごとの間隔で50-100 $\mu$ gのcDNAの3-6回の追加免疫を行った。免疫応答のレベルはFACS分析によって等間隔で評価される。

【0438】

HEK293、Cos-7、HeLa、またはHEK293Tの細胞における細胞表面発現の確認

修飾された複数膜貫通型タンパク質の発現は、抗FLAG抗体によって検知され、第1の結合曲線によって表され、陰性対照(無関係のcDNA)は第2の結合曲線によって表される。

10

【0439】

FACS分析を使用する修飾された複数膜貫通型ポリペプチドに対する免疫応答における血清力価の評価

第1の結合曲線は、修飾された複数膜貫通型タンパク質cDNA、あるいは修飾された複数膜貫通型タンパク質発現細胞に結合する精製されたタンパクによって免疫化されたマウスからの血清を表し；第3の曲線は対応する野生型膜受容体発現細胞に結合する同じ血清サンプルを表し；第4の曲線は、無関係のcDNAでトランスフェクトされた細胞を表す。

【0440】

免疫化されたコホートにおける有意な免疫応答は、野生型かつ修飾された複数膜貫通型タンパク質に同様に結合するマウスのポリクローナル血清を特徴とする。

20

【0441】

FACS分析を使用して対応するWT受容体で免疫化されたマウス

第1の結合曲線は、修飾された複数膜貫通型タンパク質発現細胞に結合するWT cDNAによって免疫化されたマウスからの血清を表し；第3の結合曲線は野生型の修飾された複数膜貫通型タンパク質発現細胞に結合する同じ血清サンプルを表し；第4の結合曲線は、無関係のcDNAでトランスフェクトされた細胞を表す。

【0442】

免疫化されたコホートにおける有意な免疫応答は、野生型かつ修飾された複数膜貫通型タンパク質受容体に同様に結合するマウスまたはラットのポリクローナル血清を特徴とする。

30

【0443】

ELISA分析

血清サンプルは、ニッケルキレート化合物プレート面に固定された関連する修飾された複数膜貫通型タンパク質の可溶化された膜調合物に対する結合について分析される。検出はTMB基質を含む抗マウスHRP抱合体を用いて行われ、陽性対照は、抗膜タンパク質ポリクローナルによって、抗モルモットまたは他の種のHRP抱合体を使用して、提供される。

【0444】

ELISAデータは、以前のFACS分析を反映する、例えば、修飾された複数膜貫通型タンパク質に基づくDNA免疫処置は、WT DNA免疫処置と同様の抗体応答を与え、血清力価の増加は、出血前を、一時的な出血(IB)、例えば、(IB1)、(IB2)、および最終的な出血と比較することより示されるような追加免疫期間中に検知される。血清サンプルは、様々な希釈(1:50、1:100、1:500、1:1000、および1:5000)で評価される。実施例15-修飾された複数膜貫通型タンパク質のワクチンとしての使用を示す関数データワクチンとしての修飾された複数膜貫通型タンパク質は、修飾された複数膜貫通型タンパク質の機能的な活性に影響を与えるまたは該活性を試験するポリクローナル抗体を誘発する。

40

【0445】

50

修飾された複数膜貫通型タンパク質またはそのコード化遺伝物質の効果的なワクチンとしての使用は、宿主の免疫応答で生成された機能的な活性、つまり、ポリクローナル抗体によって実証される。修飾された複数膜貫通型タンパク質コード化遺伝子を使用して、主に遺伝子銃による予防接種/免疫処置によって、様々な動物種を免疫化する。

【0446】

結果として生じる血清の機能的な活性を評価するために使用される1つの呼び出しは、cAMPシグナル伝達への影響である。

【0447】

AC-cAMP-PKA経路の活性化からのCRE応答が読み出しである場合、CRE-lucリポーターアッセイが使用される。

【0448】

その後の分析は、アッセイがWTトランスフェクトされたHEK293または他の細胞株上で行われるとき、ポリクローナル血清が、対応するアゴニスト化合物とのアゴニスト相乗作用と、アゴニスト活性のみの両方を実証したことを明らかにするものである。この活性は、ウサギの分析から生成されたデータによって実証されるように、かつ、免疫前の血清と比較されるように、免疫処置プロトコルで早期に検知される。活性は免疫前の血清サンプルのいずれでも検知されない。標的特異性は、トランスフェクトされていないか、または、無関係の複数膜貫通型受容体をコードするDNAでトランスフェクトされたHEK293あるいは他の細胞株を使用して、示される。

【0449】

実施例16 - アジュバントを用いる修飾された複数膜貫通型タンパク質に対する免疫応答の増強 GM-CSFによる免疫応答の増強

GM-CSFまたはサイトカインベースの分子アジュバント(例えば、IL-4、IL-10、IL-17、IFN-、IFN- など)は、免疫応答を増強するために、DNA、つまり、遺伝子アジュバントをコードする修飾された複数膜貫通型タンパク質とともに同時投与される。これは種特異的であり得るが、ヒト以外の霊長類の表皮へ投与されたH1N1インフルエンザDNAワクチンの粘膜および全身的な免疫原性を増大させることが実証されている。使用される免疫応答を増強する他の方法は、例えば、アジュバントとしての破傷風とジフテリアのトキソイドであり、げっ歯類におけるPADRE ThエピトープとオバルブミンThエピトープについて示されているように、Thエピトープの使用が発現構築物の一部として組み込まれた。他のCD4+エピトープは患者または免疫化した集団から同定され、HIVとマラリア熱のワクチン開発で組み込まれるか、さらにモノホスホリルリピドAなどの最近開発されたアジュバントにも組み込まれている。アジュバントの実施のために使用された戦略は、複数膜貫通型タンパク質完全性と適合する化合物の遺伝成分または製剤の形態をとる。

【0450】

大腸菌GroELを使用する免疫応答の増強

GroELのアジュバント活性は、起こりうる標準的な免疫担体効果に加えて、ツール様受容体4による炎症性サイトカインメディエーターを推定上含む。GroELを使用するDNA免疫処置は、機能分析のために、あるいは、修飾された複数膜貫通型タンパク質に対する抗体を引き起こすために、抗体を産生するための方法として使用される。修飾された複数膜貫通型タンパク質は、大腸菌GroELあるいはGroELフラグメントに縮合されるか、あるいはGroELまたはGroELフラグメントをコードするDNA配列を同時注入される。

【0451】

C末端で大腸菌(E. coli) GroELに縮合された修飾された複数膜貫通型タンパク質をコードするプラスミドによるマウスまたはラットのDNA免疫処置は、WTと修飾された複数膜貫通型タンパク質に対する特異的な抗体反応の誘発に関して試験される。修飾された複数膜貫通型タンパク質と、GroELあるいはGroEL発現遺伝子との同じ組み合わせを発現するプラスミドの同時注入も試験される。修飾された複数膜貫通型タ

10

20

30

40

50

ンパク質は、H s p 7 0 または F c フラグメントに縮合されるか、あるいは H s p 7 0 または F c フラグメントをコードする D N A 配列を同時注入される。

【 0 4 5 2 】

修飾された複数膜貫通型タンパク質は、樹状細胞による取り込みを増強するために、H s p 7 0 または F c フラグメントに縮合されるか、あるいは H s p 7 0 あるいは F c フラグメントをコードする D N A 配列を同時注入される。F c の、C D 9 1 を有するその F c g R s および / または H s p のタンパク質との相互作用は、抗原提示に關与する表面分子とサイトカインをアップレギュレートすることにより、樹状細胞を活性化する。さらに、樹状細胞表面受容体経路の利用は、クロスプレゼンテーションの十分に特徴づけられたメカニズムによって ( M H C クラス I I に加えて ) 樹状細胞による効率的な M H C クラス I 拘束性抗原提示のための特権的な抗原内在化ルートを表すこともある。

10

【 0 4 5 3 】

s F l t - 1 に縮合されたか、s F l t - 1 をコードする D N A 配列を同時注入された、修飾された複数膜貫通型タンパク質

修飾された複数膜貫通型タンパク質はさらに、免疫療法 / 抗血管新生抑制併用療法において、s F l t - 1 に縮合される。腫瘍の増殖を遅らせ得る免疫療法のみあるいは抗血管新生療法のみ適用とは対照的に、2 つの治療の組み合わせは腫瘍の増殖の完全な阻害をもたらす機会を有する。抗血管新生療法と同時の組み合わせでの免疫療法による腫瘍標的化を用いることで、固形腫瘍の処置により効率的な戦略が提供される。修飾された複数膜貫通型タンパク質は、フラジェリン、T L R 5 アゴニストなどの活性な T L R アゴニストに縮合されるか、あるいは、フラジェリンまたは T L R 5 をコードする D N A 配列を同時注入される。

20

【 0 4 5 4 】

サルモネラからの第 1 相フラジェリン ( F l i C と呼ばれる ) はモノマーサブユニットタンパク質であり、細菌の鞭毛を形成するために重合する。それは大規模に研究されており、T L R 5 相互作用に必要なフラジェリンの領域と残基が定義されている。T h 1 様の応答を誘発する事象のカスケードに影響を与える D N A コード化 A g s を用いて感染症への免疫応答を強化することができることが実証されているが、特定の状況下では、T h 2 様の応答の誘発も観察されている。これらの観察は、F l i C が T L R 活性化に似た炎症性の免疫応答を引き起こすことを示す。

30

【 0 4 5 5 】

カルレティキュリン ( C R T ) に縮合されるか、C R T をコードする D N A 配列を同時注入される修飾された複数膜貫通型タンパク質

野生型の A g をコードする D N A でトランスフェクトされた D C によって生成された弱い免疫応答を補う戦略：これらの戦略のいくつかは、カルレティキュリン ( C R T ) に対する、あるいはリソソームに関連する膜タンパク質 1 ( L A M P - 1 ) の選別シグナルに対する T A A 抗原の融合を含む。

【 0 4 5 6 】

実施例 1 7 - 修飾された複数膜貫通型タンパク質を用いる追加免疫処置

リガンド結合アッセイを使用して、修飾された複数膜貫通型タンパク質安定性に対するアジュバント / 修飾された複数膜貫通型タンパク質製剤の効果を試験する。

40

単離させた修飾された複数膜貫通型タンパク質は、多くの様々なアジュバントと組み合わせられ、リガンド結合アッセイで 2 時間にわたって 3 7 ° C でその安定性について調べられた。評価されるアジュバントとしては、モノホスホリルリピド A ( M P L )、M M ( マウスモノクローナル G e r b u の生成のために市販されている ) および P h a r m a ( G e r b u )、T i t e r M a x ( 登録商標 ) C l a s s i c A d j u v a n t ( T i t e r M a x アメリカ / S i g m a - A l d r i c h )、A d j u P r i m e ( 商標 ) I m m u n e M o d u l a t o r ( P i e r c e ) が挙げられる。アジュバントはすべて複数膜貫通型ポリペプチドと組み合わせられて試験され、対照の未製剤サンプルと比較して、リガンド結合アッセイにおいて 2 時間が 3 7 ° C でのインキュベーション後に、様々な安

50

定度を示す。リガンド結合アッセイ試験条件は、体温での精製された複数膜貫通型タンパク質免疫原との試験された免疫アジュバントの相対的な適合性を示すように設計されている。FACSとELISAを使用して、引き起こされた免疫応答に対するアジュバント/修飾された複数膜貫通型タンパク質製剤の効果を試験する。

【0457】

修飾された複数膜貫通型タンパク質は、1:1の比率を使用して多くのアジュバントを用いて製剤される。Balb-cマウスとウイスターラットは腹腔内注射によって結果として生じた様々な抗原/アジュバント製剤を用いて免疫化され、免疫処置プロトコルは一時的な出血1(4×50μgの修飾された複数膜貫通型タンパク質)までタンパク質の初回抗原刺激と追加免疫を使用し、その後、臨時の出血2(2×50μgの複数膜貫通型タンパク質)までタンパク質を使用する短い追加免疫相を用いた。様々な実験条件下での免疫応答は、FACSとELISAによって免疫化された動物からの血清の様々な希釈を試験して評価される。修飾された複数膜貫通型タンパク質への機能的な抗体産生応答もウサギにおいて生成される。

10

【0458】

アゴニストおよびアンタゴニストの抗体は、タンパク質免疫処置、遺伝子免疫処置、および遺伝子とタンパク質免疫処置の戦略の組み合わせを用いて、第3の宿主種(ニュージランドホワイトウサギ)において生成される。初期のDNAまたはタンパク質の攻撃(免疫初回抗原刺激)+タンパク質の追加免疫には、その後、短い一時的な追加免疫期間と最終のタンパク質の追加免疫を伴う。免疫化された動物からの血清は、精製されたWTと、修飾された複数膜貫通型タンパク質WTと、修飾された複数膜貫通型タンパク質との結合についてELISAによって評価され、WTと修飾された複数膜貫通型コード遺伝子で一時的あるいは安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞への細胞表面結合について、FACSを使用して評価される。誘発された血清のアゴニスト活性は、細胞ベースのリポーターアッセイを用いて機能評価として試験される。頑強な免疫応答が見られ、機能的な活性は第1の一時的な出血と同じくらい早い段階で検知されている。

20

【0459】

いくつかの例では、修飾された複数膜貫通型タンパク質を使用する免疫処置は、例えば、ウシ抗体、サメ抗体、ラクダ科抗体、ヒト自己抗体、あるいはヒト抗HIV抗体のCDR-H3領域に似ている先天的に長いCDR-H3領域を有する抗体を生成するために使用される。場合によっては、拡張CDR-H3領域を有する抗体は、GPCR、イオンチャンネル、および他の複数膜貫通型タンパク質などの結合するのが困難なエピトープを標的とするために使用される。場合によっては、拡張CDR-H3領域を有する抗体はさらに、本明細書に記載される修飾された複数膜貫通型タンパク質を標的とするヒト化抗体を生成するためにヒト化プロセスを経験する。

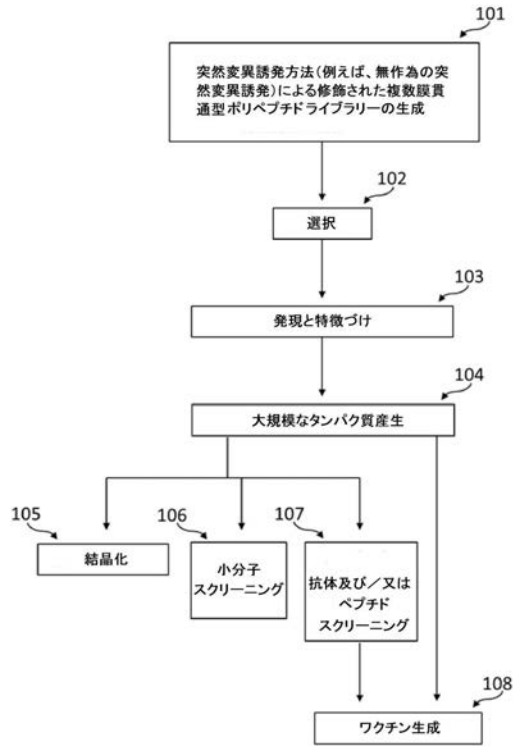
30

【0460】

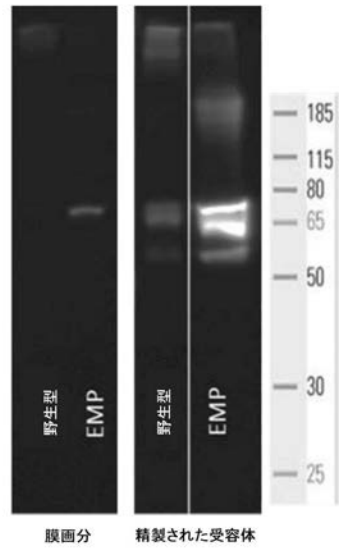
本開示の好ましい実施形態が本明細書で示され記載されてきたが、こうした実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは当業者にとって明白である。多くの変更、変化、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者の心に思い浮かぶであろう。本明細書に記載される本開示の実施形態の様々な代替物が、本開示の実施において利用されることもあることを理解されたい。以下の請求項は本開示の範囲を定義するものであり、この請求項とその均等物の範囲内の方法がそれに包含されるものであるということが意図されている。

40

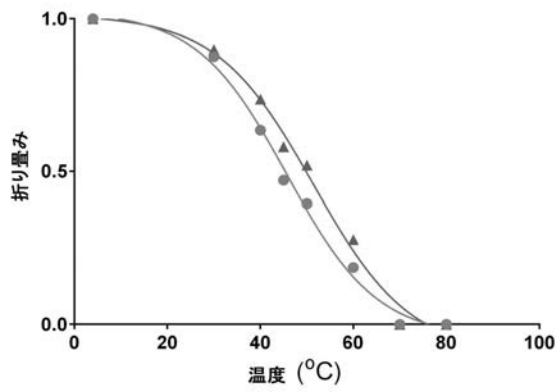
【 図 1 】



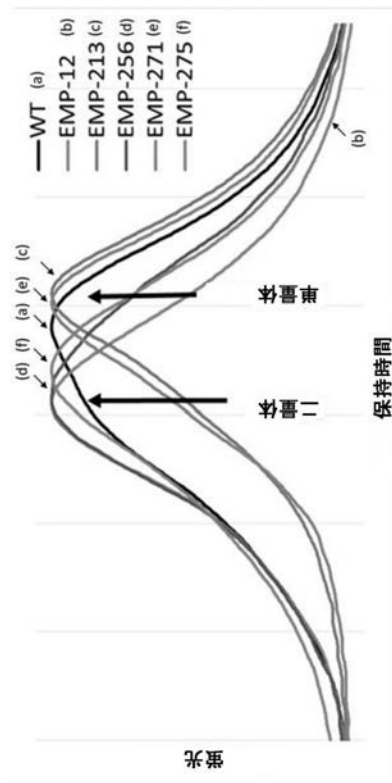
【 図 2 】



【 図 3 】



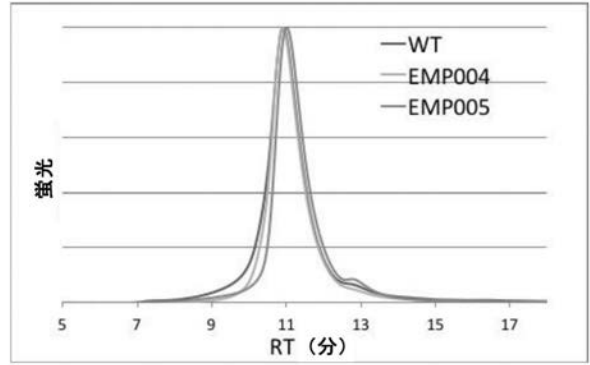
【 図 4 】



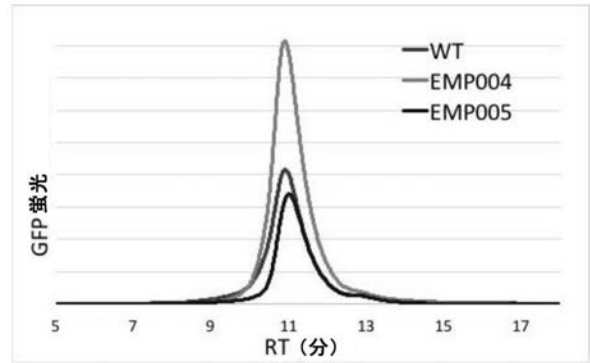
【 図 5 A 】



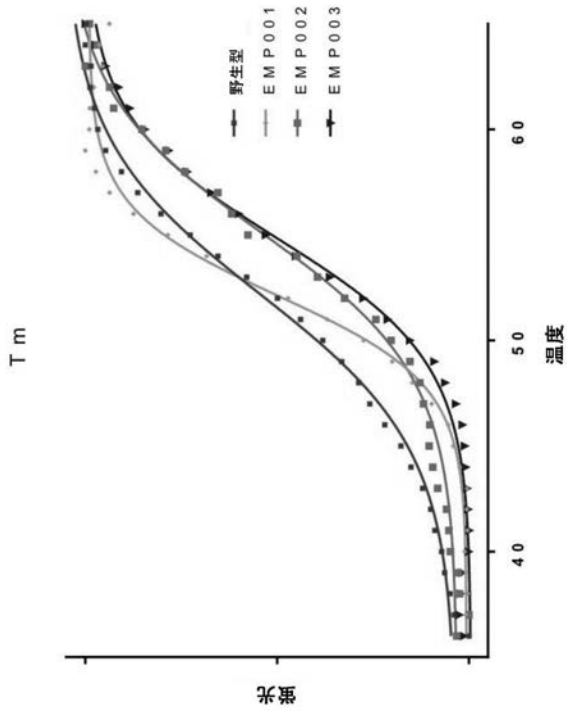
【 図 5 B 】



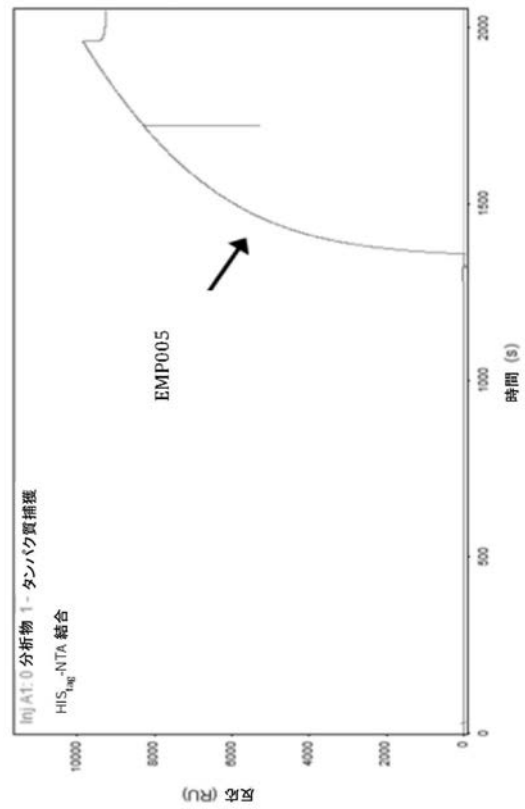
【 図 5 C 】



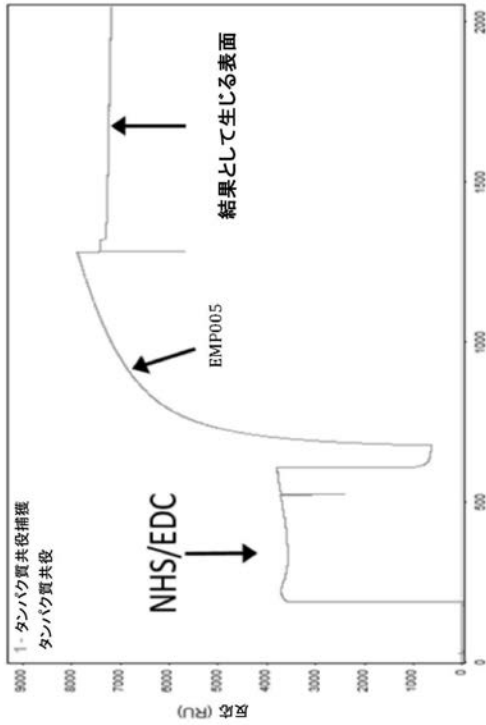
【 図 5 D 】



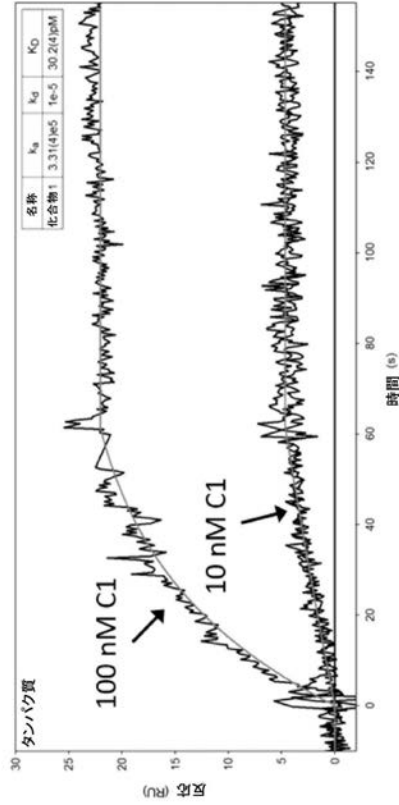
【 図 6 A 】



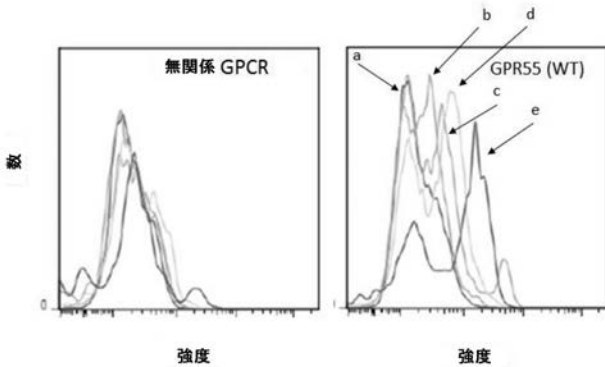
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 7 】



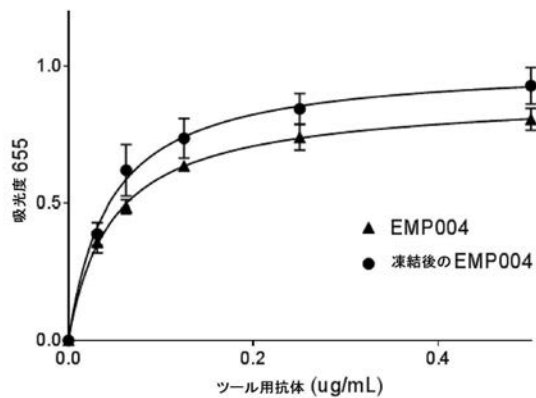
【 図 9 】

>GPR55-WT  
 MSQQNTSGDCLFDG~~V~~NELMKTLQFAVHIPTFVLG~~L~~L~~L~~NLLAIHG~~F~~STFLK~~N~~RWPDYAA  
 TSIYMINLAVFDLLVLSL~~P~~FKM~~V~~LSQVQSPF~~P~~SLCTLVECLYFVSMYGSVFTICFISMDR  
 FLAIRYPLL~~V~~SHLRS~~P~~RKIFGIC~~T~~IWV~~V~~LTGSIPIYSFHGKVEKYMCFHNMSDDTWSA  
 KVFFLEVF~~G~~FLLPMGIM~~G~~FCCSR~~S~~IHILLGRRDHTQDWVQKACIYSIAASLAVFVVSF  
 LPVHLGFFLQFLVRNSFIVECRAKQ~~S~~ISFFLQLSMCF~~S~~NVNCCLDVFCYYFVIKEFRMNIR  
 AHRPSRVQLVLQDTTISR~~G~~AG  
 (SEQ ID NO: 1)

【 図 10 】

>GPR55-EMP-012  
 MSQQNTSG~~N~~C~~L~~FDG~~M~~NELMKTLQFAVHIPTFVLG~~L~~L~~L~~NLLAIHG~~F~~STFLK~~N~~RWPDYAA  
 TSIYMINLAVFDLLVLSL~~P~~FK~~V~~LSQVQSPF~~P~~SLCTLVECLYFVSMYGSVFTICFISMDRF  
 LAIRYPLL~~V~~SHLRS~~P~~RKIFGIC~~T~~IWV~~V~~LTGSIPIYSFHGKVEKYMCFHNMSDDTWSAK  
 VFFLEVF~~G~~FLLPMGIM~~G~~FCCSR~~S~~IHILLGRRDHTQDWVQKACIYSIAASLAVFVVSFL  
 PVHLGFFLQFLVRNSFIVECRAKQ~~S~~ISFFLQLS~~K~~CFS~~N~~VNCCLDVFCYYFVIKEFRMNIRA  
 HRPSRVQLVLQDTTISR~~G~~AG  
 (SEQ ID NO: 2)

【 図 8 】



【配列表】

2019527065000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/030874
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 17/00; C12N 1/16; C12N 1/21 (2017.01) CPC - C07K 2319/00; C12N 15/01; C12N 15/1034 (2017.02)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/440; 435/7.21; 435/252.3 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<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	✓ SCARSELLI et al. "Multiple Residues in the Second Extracellular Loop Are Critical for M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Activation", The Journal of Biological Chemistry, 09 March 2007 (09.03.2007), Vol. 282, Pgs. 7385-7396. entire document	1-3, 9, 11, 14, 16-19, 31, 41-43, 45-47, 50-53
-		
Y		4-8, 10, 12, 13, 15, 23, 24, 32, 33, 48, 49, 54-67, 69-75, 84, 85, 120, 121
Y	US 2006/0275288 A1 (GRIHALDE et al) 07 December 2006 (07.12.2006) entire document	4-8, 54-67
Y	US 2014/0258918 A1 (SANOFI) 11 September 2014 (11.09.2014) entire document	7, 8
Y	US 2012/0302461 A1 (CAMPS et al) 29 November 2012 (29.11.2012) entire document	10, 23, 24, 32, 78-85, 92-95, 97-102, 105-110, 114-121, 123, 124
Y	✓ MYERS et al. "A Yeast Genetic Screen Reveals a Critical Role for the Pore Helix Domain in TRP Channel Gating," Neuron, 08 May 2008 (08.05.2008), Vol. 58, Pgs. 362-373. entire document	12, 13, 57, 58, 64, 65, 72, 73, 80, 81, 116, 117, 123, 124
Y	✓ BROWN et al. "Pharmacology of GPR55 in Yeast and Identification of GSK494581A as a Mixed-Activity Glycine Transporter Subtype 1 Inhibitor and GPR55 Agonist", J Pharmacol Exp Ther, 13 January 2011 (13.01.2011), Vol.337, Pgs. 236-246. entire document	15, 60, 67, 75, 83, 118
Y	US 2013/0052646 A1 (TRIPATHI et al) 28 February 2013 (28.02.2013) entire document	33, 108
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 July 2017		Date of mailing of the international search report <b>27 JUL 2017</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2017/030874

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SEITZ et al. "Enhancing the Stability and Solubility of the Glucocorticoid Receptor Ligand-Binding Domain by High-Throughput Library Screening," J. Mol. Biol. 17 September 2010 (17.09.2010), Vol. 403, Pgs. 562-577. entire document	48, 49
Y	US 2004/0265274 A1 (WEI et al) 30 December 2004 (30.12.2004) entire document	69-75
Y	US 2010/0099169 A1 (BOWIE et al) 22 April 2010 (22.04.2010) entire document	78-85, 92-95, 97-102, 105-110, 114-121, 123, 124

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/030874

**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.: 20-22, 25-30, 34-40, 44, 68, 76, 77, 86-91, 96, 103, 104, 111-113, 122, 125, 126  
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:

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 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.:

**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.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
C 4 0 B 40/08 (2006.01)	C 4 0 B 40/08	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
G 0 1 N 33/553 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	C 4 0 B 30/04	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B r i j
2. S P A N
3. I G E P A L

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB30 DA36 FA37 FB03  
 4B029 AA09 AA27 BB02 BB11 BB20 CC01 DG08 FA15  
 4B063 QA01 QA20 QQ08 QQ13 QQ42 QR48 QS05 QS07  
 4B064 AG01 AG20 AG27 AG31 BJ12 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24  
 DA01  
 4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01 BA02 BB01 BD16 BD21 BD50 CA23  
 CA24 CA25 CA44 CA45  
 4C085 AA03 BA01 BB11 CC01 CC08 DD31 DD62 EE01 EE06 FF13  
 4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA50 DA76 DA86 EA20 EA31 FA74

专利名称(译)	制备多种跨膜蛋白的方法和平台		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019527065A</a>	公开(公告)日	2019-09-26
申请号	JP2019510562	申请日	2017-05-03
发明人	ミレニ,マウロ ビレッタ,ロサリオ		
IPC分类号	C12Q1/02 C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/65 C12N5/10 C40B40/08 C07K16/00 C12P21/02 C12M1/34 C12N1/21 C07K16/28 A61P37/04 A61K39/00 A61K39/39 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 C40B30/04		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/65 C12N5/10 C40B40/08 C07K16/00 C12P21/02.C C12M1/34.F C12N1/21 C07K16/28 A61P37/04 A61K39/00.Z A61K39/39 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/543.541.A G01N33/553 C40B30/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 4B029/AA09 4B029/AA27 4B029/BB02 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/DG08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR48 4B063/QS05 4B063/QS07 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BD16 4B065/BD21 4B065/BD50 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA01 4C085/BB11 4C085/CC01 4C085/CC08 4C085/DD31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/FA74		
优先权	62/331628 2016-05-04 US		
其他公开文献	JP2019527065A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文公开了用于产生修饰的多跨膜多肽的方法，平台，抗体，疫苗，构建体和试剂盒。在一些实例中，本文公开了用于产生修饰的离子通道多肽的方法，平台，抗体，疫苗，构建体和试剂盒。在一些情况下，本文还公开了用于产生GPCR的方法，平台，抗体，疫苗，构建体和试剂盒。[选型图]图1

