

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5526448号  
(P5526448)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月25日(2014.4.25)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 0 7 K 1 6 / 2 8 (2006.01)</b>	C O 7 K 1 6 / 2 8 Z N A
<b>C 1 2 N 1 5 / 0 2 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1 5 / 0 0 C
<b>C 1 2 P 2 1 / 0 8 (2006.01)</b>	C 1 2 P 2 1 / 0 8
<b>G O 1 N 3 3 / 5 3 (2006.01)</b>	G O 1 N 3 3 / 5 3 Z
<b>G O 1 N 3 3 / 1 5 (2006.01)</b>	G O 1 N 3 3 / 1 5 Z

請求項の数 17 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2011-511458 (P2011-511458)  
 (86) (22) 出願日 平成22年4月28日(2010.4.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/057631  
 (87) 国際公開番号 W02010/126115  
 (87) 国際公開日 平成22年11月4日(2010.11.4)  
 審査請求日 平成23年12月21日(2011.12.21)  
 (31) 優先権主張番号 特願2009-110994 (P2009-110994)  
 (32) 優先日 平成21年4月30日(2009.4.30)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成20年度文部科学省科学技術  
 試験研究委託事業「抗体を用いた膜蛋白質結晶化技術の  
 確立」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受  
 ける特許出願

前置審査

(73) 特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
 (74) 代理人 110001139  
 S K特許業務法人  
 (74) 代理人 100130328  
 弁理士 奥野 彰彦  
 (74) 代理人 100130672  
 弁理士 伊藤 寛之  
 (72) 発明者 日野 智也  
 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学  
 法人京都大学大学院医学研究科内  
 (72) 発明者 村田 武士  
 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学  
 法人京都大学大学院医学研究科内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】膜蛋白質の立体構造を認識するモノクローナル抗体のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a') 固相担体と、前記固相担体に結合しているリポソームと、前記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備えたりポソーム/膜蛋白質複合体に対する、被検抗体の結合性を検査し、前記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有する抗体を選抜する工程を含み、

前記膜蛋白質のループ部分の少なくとも一部が前記リポソームの外側表面に露出している、

膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、スクリーニング方法。

【請求項2】

前記膜蛋白質が7回以上膜を貫通する膜蛋白質である、  
 請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項3】

b') 前記膜蛋白質またはその複製物を変性させ、変性型膜蛋白質を調整する工程、および

c') 前記変性型膜蛋白質に対する、前記被検抗体または前記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有する抗体の結合性を評価する工程、

をさらに含む、請求項1または2に記載のスクリーニング方法。

【請求項4】

前記膜蛋白質が、受容体蛋白質または輸送体蛋白質である、

10

20

請求項1～3いずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項5】

前記膜蛋白質が、G蛋白質共役受容体である、  
請求項1～4いずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項6】

前記膜蛋白質が、アデノシン受容体A2aまたはヒト糖核酸トランスポーターである、  
請求項1～5いずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項7】

前記膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体が、前記膜蛋白質のループ部分を認識する抗体である、

10

請求項1～6いずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項8】

前記工程b')および前記工程c')を含む工程が、  
ドットプロット法、ウエスタンプロット法、免疫プロット法、またはELISA法を用いた工程を含む、

請求項3に記載のスクリーニング方法。

【請求項9】

固相担体と、前記固相担体に結合しているリポソームと、前記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、

前記膜蛋白質のループ部分の少なくとも一部が前記リポソームの外側表面に露出している、

20

膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、スクリーニング用材料。

【請求項10】

前記抗体が、前記膜蛋白質のループ部分を認識する抗体である、  
請求項9に記載のスクリーニング用材料。

【請求項11】

前記膜蛋白質が、7回以上膜を貫通する膜蛋白質である、  
請求項9または10に記載のスクリーニング用材料。

【請求項12】

d') 請求項1に記載のスクリーニング方法によって得られる抗体の、複製物を作製する工程、

30

を含む、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の生産方法。

【請求項13】

リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、脂質と、リンカーと、固相担体と、  
からなる、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、スクリーニング用キット

【請求項14】

リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、脂質と、リンカーと、固相担体と、蛋白質変性剤と、

ドットプロット法、ウエスタンプロット法、免疫プロット法、またはELISA法のいずれかの方法に使用する試薬と、

40

からなる、スクリーニング用キット。

【請求項15】

e') 脂質溶液とリンカーと膜蛋白質と界面活性剤とを含有する水溶液を混合し、混合液を作製する工程、

f') 前記混合液に界面活性剤除去剤を加え、前記混合液中の前記界面活性剤を前記界面活性剤除去剤に吸着させ、前記リンカーおよび前記膜蛋白質が埋め込まれているリポソームを生成する工程、

g') 前記リポソームを前記リンカーを介して固相担体に結合させる工程、  
を含む、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングするためのリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法。

50

## 【請求項 16】

固相担体と、前記固相担体に結合しているリポソームと、前記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、

前記膜蛋白質のループ部分の少なくとも一部が前記リポソームの外側表面に露出している、

膜蛋白質とともに共結晶化するための化合物の、スクリーニング用材料。

## 【請求項 17】

p') 固相担体と、前記固相担体に結合しているリポソームと、前記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備えたりポソーム/膜蛋白質複合体に対する、被検化合物の結合性を検査し、前記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有する化合物を選抜する工程を含み、

前記膜蛋白質のループ部分の少なくとも一部が前記リポソームの外側表面に露出している、

膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する、膜蛋白質とともに共結晶化するための化合物のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体、そのリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法、その抗体のスクリーニング方法、その抗体のスクリーニング用キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

膜蛋白質は、細胞膜における情報の伝達、物質の輸送、エネルギーの生産、細胞骨格の結成など、生命活動を支える蛋白質として重要な役割を果たしている。特にヒトゲノムが解読されて以来、得られたDNA情報をもとに世界中で膜蛋白質の研究が加速している。また、現在市販されている医薬品の50%以上が膜蛋白質をターゲットにしていることから、膜蛋白質研究の重要性は高い。

## 【0003】

膜蛋白質の形態としては、1回膜貫通型タンパク質、複数回膜貫通型蛋白質、表在性膜蛋白質、膜貫通チャネルを形成する蛋白質などが存在している。脂質修飾を受けていたり、糖鎖修飾を受けていたりもする。また、各種のゲノムプロジェクトの結果により、高等生物のゲノムにコードされている蛋白質の内、30%近くが膜貫通ヘリックスを有する内在性膜蛋白であることがわかっている。

## 【0004】

膜蛋白質の中でも、一般的に受容体と総称されるグループは、細胞膜や細胞質や核内に分布し、細胞外からの各種生理活性物質の情報を細胞内やDNAに伝達している。たとえば、サイトカインや神経伝達物質、ホルモン、薬などの生理活性物質と結合することで情報を伝達し、生命活動を支えている。また、受容体蛋白質に直接的に作用する医薬品として、一般名：クロピドグレル、サルメテロール/フルチカゾン、リツキシマブ、エボエチン、バルサルタンなどが、ブロックバスターとして世界中で高い売上げを誇っている。

## 【0005】

特に、哺乳類の受容体の中でもっとも種類の多いものが、G蛋白質共役受容体(GPCR)に分類される受容体であり、これまでにGPCRをターゲットとして多くの医薬品が創製されている。例えば、上記クロピドグレルは、GPCRの1つであるアデノシン二リン酸受容体(ADP受容体)をターゲットとした医薬品である。一般的にGPCRは、シグナル情報を細胞内に伝える際に、G蛋白質と呼ばれる三量体蛋白質を介してシグナル伝達を行う受容体の総称であり、細胞がインスリンを取り込む反応、光を感じる反応、喘息などのアレルギー反応、HIVが細胞に感染する反応などにも関与している。GPCRは、現在の基礎研究、創薬研究において最も注目されている蛋白質群であるといえる。

10

20

30

40

50

## 【0006】

このように、膜蛋白質は非常に重要なターゲットであるため、世界中で多くの研究者達が、膜蛋白質の機能解析、構造解析、生産、精製、製品化研究に日夜取り組んでいる。しかし、その必要性とは裏腹に、膜蛋白質は疎水性領域に富んだ蛋白質であるために、可溶化（水溶液に溶けている状態で、かつ実験に使用できる状態にすること）が必要になる場合が多く、また、可溶化後においても正常な構造を維持することは難しく、その研究は多くの困難を乗り越える必要がある。

## 【0007】

本願発明者らは、膜蛋白質の立体構造解析において最も重要なステップである、結晶化の方法について研究している。構造解析の標準的な方法であるX線結晶構造解析法では、一連の単位格子の反復によって形成される格子に蛋白質分子を整列させて、その結果生じる結晶にX線を透過し、得られた回折パターンからその立体構造を解析する。しかしながら、蛋白質の格子は比較的弱い相互作用によって結合しているため、その結晶は、一般に脆弱で環境条件に極めて敏感である。したがって、安定した結晶化のためにはこうした環境条件を最適レベルに調整する必要がある。また、データ収集に適した結晶を成長させるには、早くても数時間、通常は数日、長いものでは数か月を要する。このため、蛋白質の立体構造解析において、結晶化のステップの高精度化、効率化が求められている。

## 【0008】

特に、膜蛋白質の結晶化においては、一般的な可溶性蛋白質にない困難な要素を含んでおり、成功例は少ない。可溶化に用いる界面活性剤との相性や、可溶化状態の膜蛋白質が一般的な可溶性蛋白質とは異なる挙動を示すことが、膜蛋白質の結晶化工程を複雑にし、困難にしている。また、得られた結晶は、可溶性蛋白質の結晶に見られない特徴を備えている。第一に結晶中の蛋白質間の隙間が、溶媒だけでなく界面活性剤のミセルによっても占められている点である。ミセル自身は原子分解能での構造をとっておらず、結晶中では溶媒の一部と考えられる。ただしミセルのサイズは重要で、蛋白質間の隙間をちょうど埋めるようなミセルサイズの界面活性剤が結晶を安定化する。第二の特徴は良好な結晶を得るのに必須な蛋白質間の相互作用が、ミセルに覆われていない極性表面のみでおこっていることである（ミセル同士の相互作用は非特異的で結晶の原子分解能での並びに大きくは寄与しない）。このことから明らかな様に、膜の中に全て埋まっている疎水的な蛋白質からは良好な結晶が得にくく、膜の外に多くのサブユニットを持つような膜蛋白質からは比較的良好的な結晶が得やすい。また界面活性剤のミセルのサイズが小さい方が、一般的に良好な結晶が得られる傾向がある。

## 【0009】

そして、膜蛋白質の結晶化を効率化させる目的で、本願発明者らは、報告されている膜蛋白質の結晶化条件からデータベースを作り、それに基づき膜蛋白質（膜貫通ヘリックス型）の結晶化に適したスクリーニングキットを作製している（非特許文献1）。

## 【0010】

一方で、本願発明者らは1995年に世界で初めて、膜蛋白質の親水性表面の立体構造を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体を、膜蛋白質に結合させた状態で結晶化させる手法（共結晶化）を用いて、膜蛋白質である、細菌シトクロム酸化酵素の結晶化と、立体構造解析に成功している（非特許文献2）。一般に、膜蛋白質を結晶化するには、界面活性剤で膜から可溶化し、そのミセルの中に取り込んでから結晶化する。この状態では膜蛋白質の疎水的な表面は特定の構造を持たないミセルで覆われているため、結晶格子が形成されにくい。非特許文献2では、膜蛋白質に抗体を結合させることによって、膜蛋白質のある特定のコンフォメーションを安定化させるとともに、膜蛋白質/抗体複合体の全体としての親水性表面が拡大して結晶性を向上させている。これは、抗体を用いることによって、結晶化の非常に困難な膜蛋白質を効率よく結晶化させることに成功した、革新的な研究結果である。

## 【0011】

また、後にMackinnonらによって カリウムチャンネル及び塩素イオンのチャンネルの立体

10

20

30

40

50

構造解析も、同様の方法を用いて行われた（非特許文献3、4）。これらの膜蛋白質は抗体なしでも3.5程度の構造が得られていたが、抗体を用いることにより分解能を2.5以上に向上させることに成功している。さらに、結晶化に使う抗体の産生に非常に時間がかかるのがこの手法の欠点だが、抗体を使う代わりにファージディスプレイや類似の技術を用い、人工的な結合蛋白質を作る研究も行われている（非特許文献5）。

【0012】

なお、共結晶化を行うには、事前に膜蛋白質に結合する抗体を取得する必要がある。膜蛋白質に結合する抗体の一次スクリーニングをハイスループットに行う方法としては、Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay法（ELISA法）が多用されている。この方法では疎水的な相互作用を利用して抗原をプラスチックプレートへ固相化し、固定化された抗原に対し特異的に結合する抗体を検出する。

10

【0013】

ELISA法とは別の手法で膜蛋白質に結合する抗体をスクリーニングした事例が、非特許文献6に記載されている。非特許文献6では、膜を3回貫通しているチャンネル蛋白質を用いている。アビジンコートしたチューブにビオチン化リポソーム/GluRD蛋白質複合体を固定化させ、さらにGluRD蛋白質を含む混合溶液で免疫したマウス由来のファージ抗体ライブラリーをパンニングして、特異的抗体ファージをスクリーニングしている。得られた抗体は、GluRD蛋白質の中でも膜貫通領域から離れた領域にある、蛋白質N末端近くのXドメインを特異的に認識して結合していることが記載されている。

【0014】

なお、膜蛋白質に結合する抗体の研究は、上記のような共結晶化や、結合部位の特定といった基礎研究の現場にとどまらず、創薬研究においても重要である。特に近年、製薬企業において抗体医薬品の売上げが顕著に伸びており、抗体医薬品関連の自社開発投資やライセンス契約、M&A等によって、研究技術や開発パイプラインを強化させる動きが目立ってきている。すでに販売されている膜蛋白質に結合する抗体医薬品としては、たとえば、一般名：リツキシマブ、トラスツズマブ、セツキシマブ、エゼチミブ、パニツムマブなどが存在する。

20

【0015】

また、受容体を固相担体に固定し、該受容体に特異的に結合するリガンドの結合様態を調べる方法が、特許文献1に記載されている。特許文献1では、上皮成長因子受容体（EGFR）を発現している膜の断片を固相担体に固定化させ、該膜の断片に、該EGFRのリガンドであるEGFが結合することを確認している。一方で、蛋白質を固相担体に固定し、該蛋白質に特異的に結合する抗体の結合様態を調べる方法が、特許文献2に記載されている。特許文献2では、リポソーム/リボヌクレオプロテイン複合体を固相担体に固定し、該複合体に抗リボヌクレオプロテイン抗体が結合することを確認している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】特表2005-517905号公報

【特許文献2】特表2000-509494号公報

40

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H.: Nature 376, 660-669 (1995).

【非特許文献2】"Methods and Results in Membrane Protein Crystallization" (2003). Edited by Iwata S., International University Line, La Jolla, California.

【非特許文献3】Dutzler, R., Campbell, E.B., MacKinnon, R: Science. 300, 108-112 (2003).

【非特許文献4】Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R.: Nature, 414, 43-48 (2001).

50

【非特許文献5】Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., et al.: Nat. Biotechnol., 5, 575-582 (2004).

【非特許文献6】Lene K. Jespersen, Arja Kuusinen, Adelina Orellana, Kari Keinaanen and Jan Engberg1: Eur. J. Biochem. 267, 1382-1389 (2000).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

しかしながら、上記文献記載の従来技術は、以下の点で改善の余地を有していた。

上記文献記載の従来技術では、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、スクリーニングに使用する物質、スクリーニングに使用する物質の生産方法、スクリーニング方法、スクリーニングに使用する物質を含むキットが明らかになっていない。そのため、膜蛋白質を共結晶化するためには、実際に数多くの抗体を膜蛋白質に結合させ、共結晶化が可能かどうかを試行錯誤する必要がある、効率が悪かった。

10

【0019】

たとえば、ELISA法を用いて抗体をスクリーニングする場合は、精製した膜蛋白質を抗原として使用するとき、界面活性剤存在下での操作となるため、効率的に固相化することができない。あるいは、固相化できたとしても界面活性剤を含むバッファーによる繰り返し洗浄等の操作によって膜蛋白質が変性してしまい、その結果、生きた細胞の表面に提示されている天然構造を保ったままの膜蛋白質を認識する抗体、特に立体構造を認識し高親和性かつ非常に高い特異性を有する抗体を取得することは困難である。

20

【0020】

また、非特許文献6においては、エピトープを探索する目的で、ビオチン化リポソーム/GluRD蛋白質複合体を作製して、膜蛋白質に結合する抗体をスクリーニングしている。しかしながら、スクリーニングされた抗体の結合部位が、膜貫通領域から離れた領域でかつ蛋白質N末端近傍の親水性領域に限定されているため、一般的な膜蛋白質への汎用性が低い。例えば、膜蛋白質の蛋白質N末端が膜貫通領域からそれほど離れていない場合や、膜蛋白質のループ部分に結合する抗体のスクリーニング方法が明らかになっていない。さらには、蛋白質N末端（やC末端）のポリペプチドは特定の立体構造を有しない比較的自由な領域である。また膜蛋白質の蛋白質N末端（やC末端）に存在する親水性領域は、一般的に溶媒中において膜貫通領域に対する相対位置や方位に揺らぎが大きいことが多い。このような領域に抗体が結合したとしても、結晶中で規則的に並んだ定まった結晶格子を形成し得えず、したがって、蛋白質N末端（やC末端）近くに結合する抗体は結晶化に適さないということがいえる。

30

【0021】

また、非特許文献6においては、膜を3回貫通している膜蛋白質が用いられているが、一般的に貫通回数が多いほど各種実験工程における取り扱いが難しくなるので、4回以上膜を貫通している場合には、非特許文献6に記載の方法は適用できない。

【0022】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体を、提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体を、生産する方法を提供することである。さらに、本発明の他の目的は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法を提供することである。そして、もう1つの本発明の別の目的は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体を含む、スクリーニング用キットを提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明によれば、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポ

50

ソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部がリポソームの外側表面に露出している、リポソーム/膜蛋白質複合体が提供される。

【0024】

この構成は、後述する実施例で、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、または膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングする際に使用できることが実証されている、リポソーム/膜蛋白質複合体を含む。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングすることが可能となる。

10

【0025】

また、本発明によれば、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム複合体を生産する方法であって、a) 脂質溶液とリンカーと上記膜蛋白質と界面活性剤とを含有する水溶液を混合し、混合液を作製する工程と、b) 上記混合液に界面活性剤除去剤を加え、上記混合液中の上記界面活性剤を上記界面活性剤除去剤に吸着させ、上記リンカーおよび上記膜蛋白質が埋め込まれているリポソームを生成する工程と、さらに、c) 上記リポソームを上記リンカーを介して上記固相担体に結合させ、上記リポソーム複合体を生産する工程と、を含む、リポソーム複合体の生産方法が提供される。

20

【0026】

この生産方法は、後述する実施例で、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、または膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングする際に使用できることが実証されている、リポソーム/膜蛋白質複合体を生産できることが実証されている。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングすることが可能となる。

【0027】

また、本発明によれば、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法であって、d) 膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム複合体に、被検抗体を接触させる工程と、e) 工程d) で結合した抗体を検出する工程と、f) 上記膜蛋白質を変性させる工程と、g) 工程f) で変性した変性型の膜蛋白質に、被検抗体を接触させる工程と、h) 工程g) で結合した抗体を検出する工程と、を含む、スクリーニング方法が提供される。

30

【0028】

このスクリーニング方法によれば、後述する実施例で、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、または膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングできることが実証されている。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングすることが可能となる。

40

【0029】

また、本発明によれば、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法であって、i) 請求項1乃至8いずれかに記載のリポソーム複合体に、抗体ライブラリーを接触させる工程と、j) 工程i) で結合した抗体を選抜する工程と、k) 上記膜蛋白質を変性させる工程と、l) 工程k) で変性した変性型の膜蛋白質に、工程j) で選抜した抗体を接触させる工程と、m) 工程l) で結合した抗体を除外する工程と、を含む、スクリーニング方法が提供される。

【0030】

50

このスクリーニング方法によれば、後述する実施例で、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、または標的膜蛋白質への親和性が高い抗体をスクリーニングできることが実証されている。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングすることが可能となる。

【0031】

また、本発明によれば、抗体の生産方法であって、上記スクリーニング方法によって、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされた上記膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の生産方法が提供される。

【0032】

この生産方法は、後述する実施例で、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体を効率的に生産するために使用できることが実証されている。そのため、この生産方法を用いれば、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体を効率的に得ることができる。

【0033】

また、本発明によれば、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング用キットであって、膜蛋白質と脂質とリンカーと固相担体と、を含む、スクリーニング用キットが提供される。

【0034】

この構成は、後述する実施例で、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、または膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングできることが実証されている、リポソーム/膜蛋白質複合体の構成要素を含む。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングすることが可能となる。

【0035】

また、本発明によれば、リポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しており、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体をスクリーニングする際に用いられる、リポソーム/膜蛋白質複合体が提供される。

【0036】

このリポソーム/膜蛋白質複合体は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリポソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体を効率的に得ることができる。

【0037】

また、本発明によれば、抗体のスクリーニング方法であって、抗体産生細胞から、被検抗体を作製する工程と、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に対する、上記被検抗体の結合性を検査し、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリポソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体を選抜する工程、を含む、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体のスクリーニング方法が提供される。

【0038】

このスクリーニング方法は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリポソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体を効率的に得ることができる。

【0039】

また、本発明によれば、抗体の生産方法であって、上記スクリーニング方法によって、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされ

10

20

30

40

50

た上記膜蛋白質のループ部分を認識する抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体の生産方法が提供される。

【0040】

この生産方法は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体を効率的に生産するために使用できることが実証されている。そのため、この生産方法を用いれば、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体を効率的に得ることができる。

【0041】

また、本発明によれば、リポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しており、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体をスクリーニングする際に用いられる、リポソーム/膜蛋白質複合体が提供される。

10

【0042】

このリポソーム/膜蛋白質複合体は、後述する実施例で、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリポソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、上記抗体を効率的に得ることができる。

20

【0043】

また、本発明によれば、抗体のスクリーニング方法であって、抗体産生細胞から、被検抗体を作製する工程と、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に対する、上記被検抗体の結合性を検査し、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリポソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体を選抜する工程、を含む、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体のスクリーニング方法が提供される。

【0044】

このスクリーニング方法は、後述する実施例で、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリポソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、上記抗体を効率的に得ることができる。

30

【0045】

また、本発明によれば、抗体の生産方法であって、上記スクリーニング方法によって、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされた上記抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体の生産方法が提供される。

40

【0046】

この生産方法は、後述する実施例で、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗

50

体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体を効率的に生産するために使用できることが実証されている。そのため、この生産方法を用いれば、上記抗体を効率的に得ることができる。

【0047】

また、本発明によれば、リボソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリボソームと、上記リボソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リボソームの外側表面に露出しており、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物をスクリーニングする際に用いられる、リボソーム/膜蛋白質複合体が提供される。

【0048】

このリボソーム/膜蛋白質複合体は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリボソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物を効率的に得ることができる。

【0049】

また、本発明によれば、抗体のスクリーニング方法であって、抗体産生細胞から、被検抗体を作製する工程と、上記リボソーム/膜蛋白質複合体に対する、上記被検抗体の結合性を検査し、上記リボソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリボソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体を選抜する工程、を含む、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物のスクリーニング方法が提供される。

【0050】

このスクリーニング方法は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物をスクリーニングするために使用できることが実証されている。そのため、このリボソーム/膜蛋白質複合体を用いれば、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物を効率的に得ることができる。

【0051】

また、本発明によれば、抗体の生産方法であって、上記スクリーニング方法によって、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物をスクリーニングする工程と、スクリーニングされた上記膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物の、複製物を作製する工程と、を含む、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物の生産方法が提供される。

【0052】

この生産方法は、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物を効率的に生産するために使用できることが実証されている。そのため、この生産方法を用いれば、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物を効率的に得ることができる。

【0053】

また、本発明によれば、アデノシン受容体A2a(以下「A2a受容体」と称することもある)の立体構造を認識する、アデノシン受容体A2a結合性抗体(以下「A2a受容体結合性抗体」と称することもある)が提供される。このA2a受容体結合性抗体は、後述する実施例で、A2a受容体との共結晶化に使用できることが実証されている。そのため、このA2a受容体結合性抗体を用いれば、A2a受容体を結晶化させるために好適に使用できる。

【0054】

また、本発明によれば、糖トランスポーターの立体構造を認識する、糖トランスポーター結合性抗体が提供される。この糖トランスポーター結合性抗体は、後述する実施例で、糖トランスポーターとの共結晶化に使用できることが実証されている。そのため、この糖トランスポーター結合性抗体を用いれば、糖トランスポーターを結晶化させるために好適に使用できる。

【発明の効果】

【0055】

本発明によれば、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、膜蛋白質のループ部分を認識する抗体、または、膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングする際に使用できることが実証されている、リポソーム/膜蛋白質複合体を提供する。そのため、膜蛋白質とともに共結晶化するために好適に使用できる抗体が、公知技術に比べて、極めて効率的に得られる。同様の理由で、膜蛋白質とともに共結晶化するために好適に使用できる抗体の、スクリーニング方法を組み立てることができる。または、種々の目的に応じてリポソーム/膜蛋白質複合体を利用したスクリーニング系、生産方法、またはその生産方法によって得られる化合物が得られる。

10

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1は、リポソーム-ELISA法の概念図である。

【図2】図2は、リポソーム-ELISA法によって、A2a受容体再構成リポソームへのmouse由来anti FLAG-M2抗体(Sigma社)の結合様態を測定した結果のグラフである。

【図3】図3は、A2a受容体とハイブリドーマ上清を用いた、リポソーム-ELISA法と変性ドットプロット法の抗原?抗体反応の比較図である。

【図4】図4は、A2a受容体とマウス由来Fabフラグメントのゲル濾過溶出プロファイルである。

20

【図5】図5は、マウス由来FabフラグメントによるA2a受容体の熱安定性上昇効果の測定結果の図である。

【図6】図6は、キメラA2a受容体の模式図である。

【図7】図7は、上部は、キメラA2a受容体とその変異体の一群の発現結果を蛍光検出で確認した結果の図である。下部は、キメラA2a受容体とその変異体の一群に対する抗原-抗体反応をウエスタンブロットにより検出した結果の図である。

【図8】図8は、ヒト糖核酸トランスポーターとレコンビナントFabフラグメント複合体の蛍光ゲル濾過分析のグラフである。

【図9】図9は、A2a受容体とFabの複合体結晶の写真である。

【図10】図10は、A2a受容体とFabの結晶構造を示した図である。

30

【図11】図11は、ラット糖トランスポーターとFvの複合体結晶の写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

<発明の経緯>

本願発明者らは、膜蛋白質の立体構造解析を行うために、そのボトルネックとなっている膜蛋白質の結晶化のステップの改善策を研究している。特に、非特許文献1において、膜蛋白質を抗体とともに共結晶化すると結晶化の効率が上がることをすでに明らかにしている。しかしながら、共結晶化に使用するための抗体は、膜蛋白質に結合すればどのような特性のものでも良いわけではなく、共結晶化ができる抗体とできない抗体が存在していた。

40

【0058】

そのため、本願発明者らは、膜蛋白質と共結晶化するための抗体をスクリーニングする方法を研究した。そして、膜蛋白質との共結晶化に適している抗体として、以下のような条件を想定した。

【0059】

膜蛋白質と抗体を共結晶化する際には、使用する膜蛋白質と抗体の複合体は、高純度であることが好ましい。そのため、使用する抗体は結合特異性の高い抗体が適している。

【0060】

膜蛋白質と抗体を共結晶化する際には、生成する結晶に含まれる膜蛋白質は、天然型の立体構造を有していることが好ましい。そのため、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体

50

は、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して結合特異性の高い抗体が適している。

【0061】

また、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、精製や結晶化等の工程の間、膜蛋白質との結合を持続する必要がある。そのため、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質に対して高い親和性を有する抗体が適している。

【0062】

また、蛋白質の結晶化には親水的な表面が必須であるが、膜蛋白質はその大半が界面活性剤で覆われているため、水溶性蛋白質に比べて極端に結晶化が困難である。そのため、使用する抗体は、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の、親水性領域を拡大させる抗体が適している。

10

【0063】

また、一般的に膜蛋白質は不安定であり、生体膜からの精製、結晶化の段階で変性してしまうものも多々ある。特に、医学的にも重要なほ乳類由来の膜受容体や輸送体はその傾向が著しい。そのため、使用する抗体は、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の、熱安定性を上昇させる抗体が適している。

【0064】

そして、それらを充足するためには、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識して結合する抗体が適していると想定した。

【0065】

さらには、膜蛋白質のループ部分の立体構造を認識して結合する抗体が適していると考えた。なぜなら、蛋白質N末端やC末端領域は、一般的に、溶媒中において膜貫通領域に対する相対位置や方位に揺らぎが大きい、比較的フレキシブルな領域である。このような領域に抗体が結合したとしても、結晶中で規則的に並んだ定まった結晶格子を形成し得ず、したがって、蛋白質N末端やC末端近くに結合する抗体は結晶化に適さない傾向があると考えられるからである。

20

【0066】

このような条件を鑑み、共結晶化に使用する抗体を得るための、抗体のスクリーニング方法を検討した。そして、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング用キットを明らかにし、本発明を完成した。

30

【0067】

<用語の説明>

本明細書および特許請求の範囲において、各種用語の説明を以下の通り定義する。

【0068】

(1) G蛋白質共役型受容体(GPCR)

「GPCR」は、細胞におけるシグナル伝達を担う蛋白質の主要なクラスを構成する。GPCRは、以下の3つの構造ドメインを有する：アミノ末端細胞外ドメイン、7回膜貫通セグメント、3つの細胞外ループおよび3つの細胞内ループを含む膜貫通ドメイン、ならびにカルボキシ末端細胞内ドメイン。GPCRの細胞外部分に対してリガンドが結合するときに、細胞の生物学的特性または生理学的特性における変化を生じるシグナルが細胞内で変換される。GPCRは、G蛋白質およびエフェクター(G蛋白質によって調節される、細胞内酵素およびチャネル)とともに、細胞外インプットに細胞内第2メッセンジャーの状態を接続するモジュラーシグナル系の構成要素である。

40

【0069】

(2) 輸送体蛋白質(トランスポーター蛋白質)

「輸送体蛋白質」は、生体膜を貫通し、膜を通して物質の輸送をするタンパク質の総称である。親油性の低分子化合物は、生体膜を通して高濃度側から低濃度側へ自発的に(濃度勾配に従って)移動する。しかし親油性の低い物質はそのように自発的には移動しない

50

。また低濃度側から高濃度側への（濃度勾配に逆らう）移動は自発的には進行せず自由エネルギーの供給が必要である。これらの非自発的な輸送を司るのが膜輸送体である。膜輸送体による輸送は上のように2つに分けられ、このうち親油性の低い物質の移動を促進拡散（受動輸送の一種）という。またエネルギーを要する低濃度側から高濃度側への移動を能動輸送という。

#### 【0070】

以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。なお、同様な内容については、繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

#### 【0071】

本明細書において、リポソーム-ELISA法は、一般的なELISA法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）の原理を応用し、リポソーム/膜蛋白質複合体を固相担体に固定し、該膜蛋白質に反応する被検化合物をスクリーニングする方法である。概念図を図1に示す。

#### 【0072】

##### <実施形態1：リポソーム/膜蛋白質複合体>

本実施形態に係るリポソーム/膜蛋白質複合体は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出している。そして、該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッキング法のような膜蛋白質の変性を伴う検出操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、より高い精度でスクリーニングできる効果がある。

#### 【0073】

本明細書において、膜蛋白質は、膜と相互作用している蛋白質であれば限定せず、たとえば、受容体蛋白質、チャネル蛋白質、輸送体蛋白質、接着分子、または膜結合性酵素を含む。後述する実施例より、受容体蛋白質、または輸送体蛋白質を使用した際に、ともに共結晶化するために使用できる抗体が得られていることから、受容体蛋白質、または輸送体蛋白質が好ましい。特に、受容体蛋白質は、受容体蛋白質をターゲットにした医薬品が数多く開発されており、医学的、創薬学的に重要なターゲットであることからより好ましい。さらに、受容体蛋白質の中でも最も種類が多く、医学的、創薬学的に重要なターゲットであるGPCRであることが好ましい。

#### 【0074】

本明細書において、膜蛋白質は、膜を貫通している回数に制限はなく、1～20回膜貫通の膜蛋白質を含む。後述する実施例より、7回または10回膜を貫通している膜蛋白質を使用した際に、膜蛋白質とともに共結晶化するために使用できる抗体が得られていることから、膜を貫通している回数は、10回以下が好ましく、7回および10回がより好ましい。

#### 【0075】

本明細書において、リポソームの構成物質は、脂質二重層の形成を阻害しない限り特に限定されるものではなく、例えば、リン脂質、蛋白質、核酸、糖鎖、ビオチン化脂質、レクチン、膜安定化剤、抗酸化剤、荷電物質等が挙げられる。またリン脂質としては、一般的に用いられている各種のリン脂質であれば、いずれも利用可能である。その具体例としては、フォスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルエチレングリコール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、カルジオリピン等のリン脂質、またはこれらの水素添加物、セファリン、セレブロシド、セ

10

20

30

40

50

ラミド、スフィンゴミエリン、ガングリオシド等の糖脂質が挙げられ、これらのうち1種または2種以上を使用することができる。リン脂質は、卵黄、大豆その他の動植物に由来する天然脂質（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン等）、合成脂質又は半合成脂質のいずれであってもよい。

【0076】

また、本明細書において、リポソームの構成物質は、固相担体と結合するリンカーを備えていても良い。リンカーとしては、たとえば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、酵素、基質、補酵素、補欠分子族、抗体、抗原、核酸、アプタマー、多糖類、レクチン、金属イオン、金属キレート剤、受容体、それらに結合能を有する化合物からなる群から選ばれる化合物、または化合物断片を含む。結合能力が優れていることから、ビオチン

10

【0077】

本明細書において、固相担体は、本発明の方法により固定化されるリポソーム/膜蛋白質複合体を担持するための、反応媒体に不溶な固体の支持体である。形状としては、プレート、ビーズ、チューブ、またはファイバー等の任意の形状をとることができる。固相担体の素材としては、ガラス、プラスチック、金属その他を用いることができる。後述する実施例より、膜蛋白質とともに共結晶化するために使用できる抗体が得られていることから、プラスチックの場合が、本発明の効果が最も発揮される。プラスチックとしては、バックランドを抑えるために蛍光発生量の少ない熱可塑性樹脂が好ましい。たとえばポリエチレン、ポリプロピレン等の直鎖状ポリオレフィン、環状ポリオレフィン、含フッ素樹脂等を用いることが好ましく、耐熱性、耐薬品性、低蛍光性、成形性に特に優れる飽和環状ポリオレフィンを用いることがより好ましい。ここで飽和環状ポリオレフィンとは、環状オレフィン構造を有する重合体単独または環状オレフィンと  $\alpha$ -オレフィンとの共重合体を水素添加した飽和重合体をさす。

20

【0078】

また、該固相担体は、上記リンカーと結合する、リンカー結合化合物を備えていても良い。たとえば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、酵素、基質、補酵素、補欠分子族、抗体、抗原、核酸、アプタマー、多糖類、レクチン、金属イオン、金属キレート剤、受容体、それらに結合能を有する化合物からなる群から選ばれる化合物、または化合物断片を含む。結合能力が優れていることから、ビオチンまたはアビジンであることが好ましい。

30

【0079】

本明細書において、抗体は、抗原上の特定のエピトープに特異的に結合することができる分子を指し、モノクローナル抗体を含む。また、抗体は様々な形態で存在することができ、例えば、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体などが挙げられる。

【0080】

本明細書において、「膜蛋白質の天然型の立体構造」とは、膜蛋白質が生体内において正常に機能している状態の立体構造と同じ立体構造、またはそれと実質的に同じ立体構造を含む。

40

【0081】

本明細書において、「結合する」とは、物質間の連結を意味する。連結は共有結合または非共有結合のいずれであってもよく、たとえば、イオン結合、水素結合、疎水性相互作用、または親水性相互作用が挙げられる。

【0082】

本明細書において、「埋め込まれている」とは、ある物質の中に、別の物質の一部またはすべてが挿入されている状態を含む。

【0083】

本明細書において、「結晶化」とは、蛋白質を結晶として析出させることである。結晶化によって得られる結晶は、X線結晶構造解析を行うことで、X線を当て散乱したX線の

50

回折像から該蛋白質の3次元構造を解析できる。蛋白質の3次元構造の解析に用いる結晶は、一般的に純度が高いことが好ましい[Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Structure, 357-359 (1994)]。蛋白質の3次元構造を解析した結果は、たとえば、蛋白質立体構造に基づく薬剤設計(SBDD; Structure Based Drug Design)に使用できる。そして、一般的に、SBDDの多くは蛋白質の天然型の構造から薬剤設計を行うので、結晶に含まれる蛋白質は、天然型の構造であることが好ましい。なお、蛋白質の結晶化法には、静止バッチ法、自由界面拡散法、微量透析法、蒸気拡散法などを含む。

#### 【0084】

蒸気拡散法は、一般的には、沈澱剤を含む蛋白質溶液を、より高濃度の沈澱剤を含む緩衝液の入った容器中に置き、密閉空間における飽和蒸気圧の差により結晶化を促す方法である。溶液の配置によりハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、サンドイッチドロップ法に分類できる。また、市販の沈澱剤または結晶化用キットを使用することもできる。

10

#### 【0085】

本明細書において、「共結晶化」とは、蛋白質に化合物を結合させた状態で、または蛋白質が含まれる水溶液中に化合物を混在させた状態で、蛋白質と該化合物をともに結晶化させることを含む。たとえば、膜蛋白質に該膜蛋白質に対する抗体を結合させた状態で、ともに結晶化させることを含む。

#### 【0086】

<実施形態2：リポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法>

20

本実施形態に係るリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法であって、a)脂質溶液とリンカーと上記膜蛋白質と界面活性剤とを含有する水溶液を混合し、混合液を作製する工程と、b)上記混合液に界面活性剤除去剤を加え、上記混合液中の上記界面活性剤を上記界面活性剤除去剤に吸着させ、上記リンカーおよび上記膜蛋白質が埋め込まれているリポソームを生成する工程と、さらに、c)上記リポソームを上記リンカーを介して上記固相担体に結合させ、上記リポソーム複合体を生成する工程と、を含む。この方法で生産したリポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られた化合物の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッティング法のような膜蛋白質の変性を伴う検出操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

30

#### 【0087】

本明細書において、界面活性剤は、水溶液中で膜蛋白質と接触することによって膜蛋白質を可溶化させることができる。また、リポソームを形成することができる。界面活性剤は実験目的によって適宜選択して使用されることが望ましく、従来公知のものがいずれも使用可能である。通常用いられる界面活性剤には、その電氣的性質により、非イオン性、陰イオン性、及び両性イオン性に大別される。非イオン性界面活性剤としては、ジギトニン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(Brij系)、ポリオキシエチレンソルビタン(Tween系)、 $\alpha$ -ドデシルマルチド、 $\alpha$ -オクチルグルコシド、 $\alpha$ -ノニルグルコシド、 $\alpha$ -ヘプチルチオグルコシド、 $\alpha$ -オクチルチオグルコシド、スクロースモノデカノエート、スクロースモノドデカノエート、オクチルテトラオキシエチレン、オクチルペンタオキシエチレン、及びドデシルオクタオキシエチレン等が挙げられる。陰イオン性界面活性剤としては、タウロデオキシコール酸等が挙げられる。両性イオン性界面活性剤としては、N,N-ジメチルデシルアミンN-オキシド、N,N-ジメチルドデシルアミンN-オキシド、N,N-ジメチルドデシルアンモニオプロパンスルホネート、及び(3-[ (3-コルアミドプロピル) -ジメチルアンモニオ ] -1-プロパンスルホネート(CHAPS)等が挙げられる。

40

50

## 【 0 0 8 8 】

本明細書において、「界面活性剤除去剤」とは、試料溶液中の界面活性剤を吸着する性質を持った物質を含む。試料溶液中に経時的に添加することにより、界面活性剤を徐々に吸着除去する方法等が知られている。

## 【 0 0 8 9 】

<実施形態3：リポソーム-ELISA法による膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法等>

本実施形態に係るリポソーム/膜蛋白質複合体を用いたスクリーニング方法は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法であって、d)膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム複合体に、被検抗体を接触させる工程と、e)工程d)で結合した抗体を検出する工程と、f)上記膜蛋白質を変性させる工程と、g)工程f)で変性した変性型の膜蛋白質に、被検抗体を接触させる工程と、h)工程g)で結合した抗体を検出する工程と、を含む。そして、このスクリーニング方法を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

10

## 【 0 0 9 0 】

本明細書において、f)上記膜蛋白質を変性させる工程と、g)工程f)で変性した変性型の膜蛋白質に、被検抗体を接触させる工程と、h)工程g)で結合した抗体を検出する工程は、ドットプロット法、ウエスタンプロット法、免疫プロット法、またはELISA法のような検出系を含む。特に、後述する実施例より、膜蛋白質とともに共結晶化するために使用できる抗体が得られていることから、ドットプロット法、またはウエスタンプロット法であることが好ましい。特に、ハイスループットに調査する場合には、操作が簡便なドットプロット法がより好ましい。

20

## 【 0 0 9 1 】

本明細書において、被検抗体は、ハイブリドーマの培養上精を含む。また、被検抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体であってもよい。さらに、被検抗体は様々な形態で存在することができ、例えば、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体などが挙げられる。さらに、被検抗体は、上記の被検抗体群から選ばれる1種もしくは2種以上の化合物の混合物でもよい。なお、抗体の単離、精製などの複雑な工程を省き、効率を上げるためには、ハイブリドーマの培養上精であることが好ましい。

30

## 【 0 0 9 2 】

ハイブリドーマの培養上精は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495(1975)に記載されているような方法を使用することで調製することができる。この方法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。免疫化剤は、典型的には膜蛋白質ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBLs」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培養培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠いていると、ハイブリドーマの培養培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物

40

50

質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0093】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現をサポートし、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も記載されている [Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

10

【0094】

次にハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、膜蛋白質に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイできる。ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は、好ましくは、免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合アッセイによって測定される。このような技術及びアッセイは、当該分野において既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)によるスキャッチャード分析法によって測定することができる。

20

【0095】

さらに、所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクロニングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

【0096】

そして、本明細書において被検抗体は、これらの工程の間において得ることのできる、ハイブリドーマの培養上清を用いることができる。

【0097】

また、サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離または精製できる。

30

【0098】

そして、モノクローナル抗体を、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本実施形態のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に組込むことができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の変換ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

40

50

## 【0099】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の断片、特にFab断片を生成するための抗体の消化は、当該分野において知られている定法的技術を使用して達成できる。

## 【0100】

さらにヒト化抗体又はヒト抗体であってもよい。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる[Jones等, Nature, 321: 522-525(1986); Riechmann等, Nature, 332: 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992)]。

## 【0101】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりWinter及び共同研究者[Jones等, Nature, 321: 522-525(1986); Riechmann等, Nature, 332: 323-327(1988); Verhoeyen等, Science, 239: 1534-1536(1988)]の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

## 【0102】

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ[Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227: 381(1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581(1991)]を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる(Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991))。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化してマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似している

10

20

30

40

50

ヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Mark等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)；Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)；Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)；Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

10

**【0103】**

また、抗体は上述した既知の選択及び/又は突然変異誘発法を使用し、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製された（一般的にマウス、ヒト化又はヒトの）出発抗体のものよりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

**【0104】**

また、二重特異性抗体であってもよい。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。この場合、結合特異性の一方は膜蛋白質に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

20

**【0105】**

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現に基づく[Milstein及びCuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り替えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTrauncker等, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991)に開示されている。

30

**【0106】**

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)を参照されたい。

40

**【0107】**

WO96/27011に記載された他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」は、大きなアミノ酸側鎖が小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えられた第2の抗体分子の界面に作り出される。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

50

## 【0108】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片（例えば、 $F(ab')_2$  二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229: 81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(ab')$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたFab断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。Fab-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりFab-チオールに再転換し、他のFab-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

10

## 【0109】

大腸菌からFab断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')$ 2分子の製造を記述している。各Fab断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

20

## 【0110】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し単離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のFab部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)により記述された「ダイアポディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(VL)に重鎖可変ドメイン(VH)を結合してなる。従って、一つの断片のVH及びVLドメインは他の断片の相補的VL及びVHドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttlら *J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

30

## 【0111】

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられた膜蛋白質ポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合することができる。あるいは、抗膜蛋白質ポリペプチドアームは、特定の膜蛋白質ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子（例えばCD2、CD3、CD28、又はB7）等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと結合することができる。また、二重特異性抗体は特定の膜蛋白質ポリペプチドを発現する細胞に細胞障害薬を局在化させるためにも使用することができる。これらの抗体は膜蛋白質-結合アーム及び細胞障害薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。対象の他の二重特異性抗体は膜蛋白質ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合できる。

40

50

## 【0112】

また、本明細書において被検抗体は、抗体ライブラリーを使用するこの分野で知られた種々の方法を用いて、事前に標的膜蛋白質に対して最適化していてもよい。この分野で知られた種々の方法としては、たとえば、ファージディスプレイ法が使用できる。最適化した被検抗体を用いると、より効率的に、結合特異性や親和性の高い被検抗体が得られる利点がある。

## 【0113】

ここで、「ファージディスプレイ法」とは、変異体ポリペプチドを、コートタンパク質への融合タンパク質として、ファージ、例えば繊維状ファージの粒子表面に表示する技術を含む。ファージディスプレイの有用性の1つは、ランダム化されたタンパク質変異体の大きなライブラリーを、標的分子に高い親和性で結合するそれらの配列を迅速かつ効率的に選別することができることである。ペプチドおよびタンパク質ライブラリーのファージ上のディスプレイは、数百万のポリペプチドを特異的な結合特性を有するものについてスクリーニングするのに使用されている。多価ファージディスプレイ法は、小さなランダムペプチドおよび小さなタンパク質を、一般に繊維状ファージのPIIIまたはPVIIIに融合させることによって表示するのに使用されている。WellsおよびLowman、*Curr. Opin. Struct. Biol.*、第3巻、355~362頁(1992年)、ならびにそこに引用された参考文献。一価ファージディスプレイでは、タンパク質またはペプチドライブラリーを、ファージコートタンパク質またはその一部に融合し、野生型タンパク質の存在下で低レベルで発現させる。結合活性効果は、多価ファージに対して低減され、それにより、選別は固有のリガンド親和性に基いており、DNA操作を単純化するファージミドベクターが使用される。LowmanおよびWells、*Methods: A companion to Methods in Enzymology*、第3巻、205~216頁(1991年)。また、ファージディスプレイには、抗体様分子を生成する技術が含まれる(C. Janeway、P. Travers、M. Walport、Shlomchik、(2001年) *Immunobiology*、第5版、Garland Publishing、ニューヨーク州、627~628頁)。

## 【0114】

ここで、「ファージミド」とは、細菌の複製起点、例えばColE1、およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターを含む。ファージミドは、糸状バクテリオファージおよび糸状バクテリオファージを含めた任意の既知のバクテリオファージに使用され得る。プラスミドはまた、一般に、抗生物質耐性に関する選択可能なマーカーも含むことになる。これらのベクターにクローニングされたDNAのセグメントは、プラスミドとして増殖させることができる。これらのベクターを内包する細胞に、ファージ粒子の産生に必要なすべての遺伝子が付与されたとき、このプラスミドの複製様式は、ローリングサークル複製に変化して、プラスミドDNAの一本鎖のコピーを生成し、ファージ粒子をパッケージングする。ファージミドは、感染性または非感染性ファージ粒子を形成し得る。この用語には、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面に現れるように遺伝子融合として異種ポリペプチド遺伝子に結合するファージコートタンパク質遺伝子またはそのフラグメントが含まれる

## 【0115】

本明細書において、リポソーム/膜蛋白質複合体中に含まれる膜蛋白質は、N末端領域が短くなるように切断されていてもよい。後述する実施例において、膜蛋白質のループ部分に結合する抗体が、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できることが示唆されている。そして、膜またはリポソームから突出しているN末端領域が短い場合は、抗体がN末端領域に結合する可能性が低くなり、膜蛋白質のループ部分に結合する可能性が高くなると考えられるためである。

## 【0116】

本明細書において、「膜蛋白質を変性させる工程」とは、膜蛋白質を変性させることができればその方法は特に限定しない。たとえば、界面活性剤や尿素のような蛋白質を変性

10

20

30

40

50

させる効果を持った化合物を接触させてもよく、熱や圧力を与えることによって変性させる工程を含んでいても良い。変性後に、ドットブロッキング法などの検出を行う際には、ドットブロッキング法などで汎用されている、SDS (sodium lauryl sulfate) を接触させることが好ましい。

【0117】

また本発明の他の実施形態は、抗体の生産方法であって、上記のスクリーニング方法によって膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされた膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体の生産方法である。この生産方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、膜蛋白質とともに共結晶化するための抗体を効率よく生産することができる。

10

【0118】

<実施形態4：リポソーム-ELISA法による膜蛋白質のループ部分を認識する抗体のスクリーニング方法等>

本発明の他の実施形態は、膜蛋白質のループ部分またはその立体構造を認識する抗体（以下「ループ部分認識抗体」と称することもある）をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しているリポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質のループ部分またはその立体構造を特異的に認識する抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分またはその立体構造に特異的に結合することが実証されているためである。また、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られた抗体の多くが、膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識していると考えられるためである。さらに、変性ドットブロッキング法のような膜蛋白質の変性を伴う検出操作を行うことにより、膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識する抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。なお、抗体が膜蛋白質のループ部分を認識する場合には、一次構造よりも立体構造を認識する方が好ましい。膜蛋白質の立体構造を認識する抗体は、親和性等の機能がより優れていることが期待できるためである。

20

30

【0119】

また本発明の他の実施形態は、抗体産生細胞から被検抗体を作製する工程と、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に対する上記被検抗体の結合性を検査し、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリポソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体を選抜する工程、を含む、ループ部分認識抗体のスクリーニング方法である。このスクリーニング方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、ループ部分認識抗体を効率よくスクリーニングすることができる。なお、上記抗体産生細胞は、上記リポソーム/膜蛋白質複合体を構成している膜蛋白質に対する抗体を産生可能な細胞を含む。

【0120】

またこのループ部分認識抗体のスクリーニング方法は、上記膜蛋白質またはその複製物を変性させ、変性型膜蛋白質を調整する工程と、上記変性型膜蛋白質に対する、上記被検抗体または上記リポソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体の結合性を検査し、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有し、上記変性型膜蛋白質に結合性を有しない抗体を選抜する工程と、をさらに含んでいてもよい。このスクリーニング方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、膜蛋白質のループ部分の立体構造を認識する抗体を、高い精度でスクリーニングできる。

40

【0121】

また本発明の他の実施形態は、抗体の生産方法であって、上記のスクリーニング方法によってループ部分認識抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされたループ部分認識抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、ループ部分認識抗体の生産方法である

50

。この生産方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、ループ部分認識抗体を効率よく生産することができる。例えば、後述する実施例の(3-3-1)においては、スクリーニングによって選抜されたループ部分認識抗体の複製物を、マウスで腹水化することによって作製している。この複製物は、スクリーニングによって選抜された抗体と同一、または実質的に同一の特性を有しているため、この生産方法によってループ部分認識抗体を効率よく生産できることになる。

#### 【0122】

また、上記複製物は、上記のループ部分認識抗体のスクリーニング方法において使用した抗体産生細胞を用いて、作製される複製物であっても良い。この場合、選抜されたループ部分認識抗体の複製物を、すでに研究者が所有している細胞から生産することができるため、効率的な生産方法であるといえる。例えば、後述する実施例の(3-3-1)において、腹水化に使用した細胞は、その前工程である(2-1)で使用したハイブリドーマのひとつである。

10

#### 【0123】

また、上記複製物は、上記のループ部分認識抗体のスクリーニング方法において使用した抗体産生細胞が含有する、ループ部分認識抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(以下「機能的ポリヌクレオチド」と称することもある)、またはその機能的変異体、を導入した細胞を使用して作製される複製物であっても良い。この生産方法は効率的な生産方法である。またこの生産方法を用いれば、抗体を産生する細胞に、抗体産生効率の良い細胞など、所望の細胞を使用することが可能である。なお、機能的ポリヌクレオチド、またはループ部分認識抗体のアミノ酸配列は、上記のループ部分認識抗体のスクリーニング方法において使用した抗体産生細胞から、PCR等の従来技術を利用することで取得可能である。本明細書において「機能的変異体」は、複製物のうちアミノ酸またはヌクレオチドから構成される化合物を意味する。

20

#### 【0124】

また、上記のようなループ部分認識抗体は、膜蛋白質と共結晶化するための抗体として好適に使用できる。例えば、蛋白質N末端やC末端領域は、一般的に、溶媒中において膜貫通領域に対する相対位置や方位に揺らぎが大きい、比較的フレキシブルな領域である。このような領域に抗体が結合したとしても、結晶中で規則的に並んだ定まった結晶格子を形成し得ず、蛋白質N末端やC末端近くに結合する抗体は結晶化に適さない傾向があると考えられる。また、膜貫通領域に結合した場合、周辺の膜が存在するため、膜蛋白質が天然構造を維持することが難しいと考えられる。従って、ループ部分認識抗体は、抗体と共結晶化するための抗体として好適に使用できる。

30

#### 【0125】

また、実際には種々の要因が錯交するために一概には言えないが、上記のようなループ部分認識抗体は、ループ部分またはその立体構造に結合することで膜蛋白質の機能に影響を与える可能性がある。ループ部分結合化合物が膜蛋白質の機能に影響を与える場合、その効果を利用した医薬品またはその候補品として、上記のループ部分認識抗体を活用できると考えられる。

#### 【0126】

本明細書において「膜蛋白質のループ部分」とは、膜蛋白質内に存在する2つの膜貫通領域間をつなぐ領域のことで、かつ、膜に埋もれていない領域のことを表す。

40

#### 【0127】

本明細書において「抗体産生細胞」は、抗体産生能を有していれば特に限定されない。例えば、ヒトや他の哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、サル、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスターなど)であってもよい。哺乳動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(CHO細胞)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(CHO(dhfr)細胞)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエロマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、ヒトHEK293細胞などが挙げられる。または、上記抗体産生細胞は微生物(Escherichia属菌、Bacillus属

50

菌、酵母など)、鳥類細胞、または昆虫細胞であってもよい。

【0128】

なお、抗体をコードするポリヌクレオチドの、細胞への導入と抗体の生産は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。ポリヌクレオチドの細胞への導入方法として例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスによる方法、レトロウイルスによる方法、またはマイクロインジェクションなどを使用できる[改訂第4版 新 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社(2003):152-179.]。抗体の細胞を用いた生産方法としては、例えば、[タンパク質実験ハンドブック, 羊土社(2003):128-142.]、[Shimamoto et al., Biologicals. 2005 Sep;33(3):169-174.]に記載の方法を使用できる。なおポリヌクレオチドは、一般にベクターまたはプラスミドと総称される形態で使用することができる。ポリヌクレオチドをプラスミドに連結させて使用する際には、例えば、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキウウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどを用いることができる。

10

【0129】

また細胞を用いて産生された抗体は、当該技術分野において公知の方法を用いて精製することができる。抗体の精製方法は、例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、プロテインA、プロテインG、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーなどを用いて達成され得る(タンパク質実験ハンドブック, 羊土社(2003):27-52.)。

20

【0130】

なお、本明細書において「複製物」とは、複製物を作製するきっかけとなる化合物(以下「親化合物」と称することもある)が存在し、且つその親化合物に対して特定の性質を比べたときに、同一または実質的に同一の性質を示す化合物のことを意味する。また、親化合物が抗体、蛋白質、核酸、糖鎖、または低分子化合物の場合、対応する複製物はそれぞれ抗体、蛋白質、核酸、糖鎖、または低分子化合物の形態をしている。例えば、親抗体が膜蛋白質のループ部分を認識する抗体であれば、複製物も膜蛋白質のループ部分を認識する抗体である。上記複製物の構造は、上述の定義の範囲内であれば特に限定しない。なお、化合物とは2種類以上の元素からできている物質のことである。

30

【0131】

例えば、親化合物が抗体(以下「親抗体」と称することもある)で複製物が抗体の場合には、親抗体と複製物の特定の性質を比べたときに、その性質が同一または実質的に同一であれば、複製物のアミノ酸配列は限定されない。なおこのとき、親抗体の重鎖CDRに対して、複製物の重鎖CDRは80%以上の相同性を有していることが好ましい。または、複製物の重鎖CDRは、親抗体の重鎖CDRのアミノ酸配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有していても良い。または、複製物の重鎖CDRは、親抗体の重鎖CDRをコードする塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジентな条件でハイブリダイズする核酸の塩基配列にコードされるアミノ酸配列を有していても良い。なぜならば、重鎖CDRは抗体の抗原に対する特異性を決める上で最も重要な部位であり、加えて、上記の条件のように一定以上の類似構造を有する抗体同士は、機能的な差異が生じにくいことが知られているためである。なお、抗体の軽鎖CDR、重鎖FR、または軽鎖FR等のアミノ酸配列においても、上記の重鎖CDR程ではないが抗体の特性に関与しうる領域であるため、複製物と親抗体の該当領域が一定以上の類似構造を有していることが好ましい。また、ここでは抗体の構造をアミノ酸配列で表したが、塩基配列で表した場合であっても基本的には同様である。抗体や蛋白質をコードする塩基配列は、縮重のために、アミノ酸配列よりも広範な配列を取り得る

40

50

ことが知られている。

【0132】

ここで上記「80%以上」は好ましくは85%以上であり、より好ましくは90%以上であり、さらに好ましくは95%以上であり、最も好ましくは98%以上である。なぜならば、相同性が高いほど、親化合物と複製物が近似した特性を有していることになるからである。また上記「1若しくは数個」は好ましくは50個以下であり、より好ましくは30個以下であり、より好ましくは15個以下であり、より好ましくは10個以下であり、より好ましくは5個以下であり、より好ましくは4個以下であり、より好ましくは3個以下であり、より好ましくは2個以下であり、さらに好ましくは1個である。なぜならば、欠失、置換若しくは付加が少ないほど、親化合物と複製物が近似した特性を有していること  
10

【0133】

また、上記「1若しくは数個」のアミノ酸が別のアミノ酸に置換している場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換していることが好ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩  
20

基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、および、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。これらの各グループ内のアミノ酸同士の置換は保存的置換と総称される。あるアミノ酸配列に対する1または複数個のアミノ酸残基の欠失、付加、または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Sep;81(18):5662-5666.、Zoller et al., Nucleic Acids Res. 1982 Oct 25;10(20):6487-6500.、Wang et al., Science. 1984 Jun 29;224(4656):1431-1433.)。

【0134】

また上記複製物は、上述の定義の範囲内であれば、親化合物の誘導体(derivative)を含む。本明細書において「誘導体」は、ある有機化合物を母体として考えたとき、官能基の導入、酸化、還元、または原子の置き換えもしくは原子の付加などによって、母体の構造や性質を大幅に変えない程度の改変がなされた化合物のことを意味する。なおその改変は実際の化学反応として行えることもあるが、机上のものでも構わない。また上記誘導体は、親化合物の塩、溶媒和物、異性体、またはプロドラッグ等(例えばエステル)の形態を含む。さらに上記誘導体は、被験体に投与すると、親化合物またはその活性代謝物もしくはその残基を(直接的または間接的に)提供される任意の他の化合物を含む。そしてこのような誘導体は、当業者であれば過度の実験を行なうことなく得ることができる。例えば、[Burger's Medicinal Chemistry And Drug Discovery, 5<sup>th</sup> Edition, Vol 1: Principles and Practice]を参照できる。なお上記誘導体の形態としては、好ましくは親化合物の塩または溶媒和物である。また上記誘導体は、好ましくは薬理的に許容される誘導体  
30

【0135】

本明細書において「塩」は、特に限定されないが、例えば任意の酸性(例えばカルボキシル)基で形成されるアニオン塩、または任意の塩基性(例えばアミノ)基で形成されるカチオン塩である。塩類には無機塩および有機塩を含み、[Berge, BighleyおよびMonkhouse, J.Pharm.Sci., 1977, 66, 1-19]に記載されている塩が含まれる。本明細書において「溶媒和物」は、溶質および溶媒によって形成される化合物である。溶媒和物については例えば、[J.Honig et al., The Van Nostrand Chemist's Dictionary P650 (1953)]を参照できる。溶媒が水であれば形成される溶媒和物は水和物である。この溶媒は、溶質  
40

50

の生物活性を妨げないものが好ましい。そのような好ましい溶媒の例として、限定するものではないが、水、エタノール、および酢酸が挙げられる。最も好ましい溶媒は、水である。本明細書において「異性体」は、分子式は同一だが構造が異なる分子を含む。鏡像異性体（エナンチオマー）、幾何（シス/トランス）異性体、または相互に鏡像ではない不斉中心を1個以上有する異性体（ジアステレオマー）を含む。本明細書において「プロドラッグ」は、前駆体である化合物であって、その化合物を被験体へ投与した際に、代謝過程または種々化学反応によって化学的变化を起こし、親化合物またはその塩もしくはその溶媒和物をもたらす化合物を含む。プロドラッグについては、例えば [T. Higuchi and V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Volume 14] を参照できる。

10

**【0136】**

また上記誘導体は、親化合物に対して、PubChemのCompound Structure Searchの類似度（tanimoto係数）を適用したときに80%以上の構造を有していても良い。なお、誘導体に含める上記類似度の下限値は特に限定されないが、好ましくは85%以上であり、より好ましくは90%以上であり、さらに好ましくは95%以上であり、最も好ましくは98%以上である。なぜならば、類似度が大きいほど、親化合物と複製物が近似した特性を有していることになるからである。なお、tanimoto係数の計算式は、ケモインフォマティクスの分野では最も頻繁に使われる権威ある化合物同士の類似係数である。tanimoto係数の計算式に関してはPubChemのWEBサイト（<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）から参照可能である。

20

**【0137】**

本明細書において「相同性」とは、2つもしくは複数間のアミノ酸配列の同一のアミノ酸数の割合を、当該技術分野で公知の方法に従って算定したものである。割合を算定する前には、比較するアミノ酸配列群のアミノ酸配列を整列させ、同一の割合を最大にするために必要である場合はアミノ酸配列の一部に間隙を導入する。また、いかなる保存的置換も同一と考えない。また、最適に整列した状態において、オーバーラップするアミノ酸を含めた全アミノ酸残基に対する、同一のアミノ酸数の割合を意味する。整列のための方法、割合の算定方法、およびそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該技術分野で従来からよく知られており、一般的な配列分析プログラム（例えば、GENETYX、GeneChip Sequence Analysisなど）を使用して測定することができる。また「相同性」は、2つ

30

**【0138】**

もしくは複数間のDNA鎖、または2つもしくは複数間のRNA鎖において、同一の塩基の割合を、上記と同様に当該技術分野で公知の方法に従って算定したものである。

本明細書において「ストリンジентな条件」とは、例えば（1）洗浄のための低イオン強度と高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いる、（2）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃において50%（vol/vol）ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH6.5）、および750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いる、または（3）42℃において50%ホルムアミド、5×SSC（0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理サケ精子DNA（50μg/ml）、0.1%SDS、および10%のデキストラン硫酸と、42℃において0.2×SSC（塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム）中での洗浄および55℃のホルムアミド、次いで55℃におけるEDTAを含む0.1×SSCにてストリンジентな洗浄を含む条件であっても良い。また中程度にストリンジентな条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%デキストラン硫酸、および20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中において、37℃で一晩インキュベーション、次いで1×SSC中37～50℃でのフィルター洗浄のような条件である。

40

50

なお、ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーは、当業者によって容易に決定でき、一般的にプローブ長、洗浄温度、および塩濃度に依存する。一般に、長いプローブは適当なアニーリングのために高温を必要とし、短いプローブは低温を必要とする。また一般に、ストリンジェンシーは塩濃度に逆比例する。

【0139】

本明細書においてポリヌクレオチドに適用される場合の「ハイブリダイズ」とは、ヌクレオチドの塩基間の水素結合等によってヌクレオチド間の対ができる性質のことを表す。塩基対はワトソン・クリック型塩基対、フーグスティーン型塩基対、または任意の他の配列特異的な形で生じうる。

【0140】

本明細書において抗原抗体反応における「認識する」とは、抗体工学分野で通常用いられる意味で使用できる。例えば、抗体が結合するために接触する行為を含む。

【0141】

本明細書において「結合性を有しない」とは、生命工学分野で通常用いられる意味で使用できる。また、結合性が顕著に低いこと、またはin vitro実験において無視できる程度に結合量が低いことを意味している。例えば、被検物質が対象物質への結合性を有しない場合とは、被検物質が対象物質に結合する分子数が、対象物質に結合性を有するコントロール化合物の場合に比べて、顕著に少ない場合を含む。この「顕著に」の程度は分子数の調査手法にもよるが、例えば0.5倍以下に設定してもよく、0.3倍以下に設定してもよく、0.1倍以下に設定してもよく、0.05倍以下に設定してもよく、0.01倍以下に設定してもよい。分子数の調査手法としては、例えばウエスタンブロッティング、質量分析法、または分子間相互作用解析等を挙げることができる。または、被検物質が対象物質への結合性を有しない場合とは、被検物質が対象物質に結合する分子数が、コントロール化合物の場合に比べて、有意差が認められる程に少ないかどうかで判定しても良い。有意差があるかどうかの判定としては、例えば母集団が正規分布に従うと仮定できる場合にはパラメトリック検定であるスチューデントのt検定(Student's t-test)において有意差があれば好ましい。即ち、スチューデントのt検定において片側検定で $p < 0.05$ となればよく、より好ましくは片側検定で $p < 0.03$ となればよく、最も好ましくは片側検定で $p < 0.01$ となればよい。なお、スチューデントのt検定は特に片側検定に限定するわけではなく、両側検定で行っても良い。さらに、母集団が正規分布に従うと仮定できない場合には、ノンパラメトリック検定として、マン・ホイットニーのU検定などを行って有意差の有無を検定してもよい。

【0142】

<実施形態5：リポソーム-ELISA法による機能性抗体のスクリーニング方法等>

本発明の他の実施形態は、リポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しており、機能性抗体をスクリーニングする際に用いられる、リポソーム/膜蛋白質複合体である。ここで、上記の機能性抗体とは、膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない抗体、膜蛋白質に対する解離定数が $1.0 \times 10^{-8}$  M以下の抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、および膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める抗体、からなる群から選ばれる1種以上の抗体のことを表す。このリポソーム/膜蛋白質複合体は、後述する実施例で実証されているように、機能性抗体をスクリーニングする際に好適に使用できる。

【0143】

また本発明の他の実施形態は、抗体産生細胞から被検抗体を作製する工程と、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に対する上記被検抗体の結合性を検査し、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリポソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体を選抜する工程、を含む、機能性抗体のスクリーニング方法である。このスクリーニング方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、機能性抗体を効率よくスクリーニングする

10

20

30

40

50

ことができる。

【0144】

またこの機能性抗体のスクリーニング方法は、上記膜蛋白質またはその複製物を変性させ、変性型膜蛋白質を調整する工程と、上記変性型膜蛋白質に対する、上記被検抗体または上記リボソーム/膜蛋白質複合体結合性抗体の結合性を検査し、上記リボソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有し、上記変性型膜蛋白質に結合性を有しない抗体を選抜する工程と、をさらに含んでいてもよい。このスクリーニング方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、機能性抗体を精度よくスクリーニングすることができる。加えて、抗原の立体構造を認識する特徴を有する機能性抗体を、高い精度でスクリーニングで

10

【0145】

また本発明の他の実施形態は、抗体の生産方法であって、上記のスクリーニング方法によって機能性抗体をスクリーニングする工程と、スクリーニングされた機能性抗体の、複製物を作製する工程と、を含む、機能性抗体の生産方法である。この生産方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、機能性抗体を効率よく生産することができる。例えば、後述する実施例の(3-3-1)においては、スクリーニングによって選抜された機能性抗体の複製物を、マウスで腹水化することによって作製している。この複製物は、スクリーニングによって選抜された抗体と同一、または実質的に同一の特性を有しているため、この生産方法によって機能性抗体を効率よく生産できることになる。

【0146】

また、上記複製物は、上記の機能性抗体のスクリーニング方法において、被検抗体を作製するために使用した抗体産生細胞を用いて作製される複製物であっても良い。この場合、選抜された機能性抗体の複製物を、すでに研究者が所有している細胞から生産することができるため、効率的な生産方法であるといえる。例えば、後述する実施例の(3-3-1)において、腹水化に使用した細胞は、その前工程である(2-1)で使用したハイブリドーマのひとつである。

20

【0147】

また、上記複製物は、上記の機能性抗体のスクリーニング方法において、被検抗体を作製するために使用した抗体産生細胞が含有する、機能性抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、またはその機能的変異体、を導入した細胞を使用して作製される複製物であっても良い。この生産方法は効率的な生産方法である。またこの生産方法を用いれば、抗体を産生する細胞に、抗体産生効率の良い細胞など、所望の細胞を使用することが可能である。

30

【0148】

ここで、得られる機能性抗体が膜蛋白質の野生型に対して結合性を有し、膜蛋白質のループ部分変異型に対して結合性を有しない特性を有している場合には、ループ部分を認識している抗体であると考えられる。そのためこの場合、得られる機能性抗体は上述したようなループ部分を認識している抗体に特有の効果を持った抗体であると考えられる。

【0149】

また、得られる機能性抗体が、膜蛋白質に対する膜蛋白質に対する解離定数が  $1.0 \times 10^{-8}$  M 以下の特性を有している場合には、抗原との親和性が従来の方法で得られる抗体に比べて高い抗体であるといえる。この場合、得られる機能性抗体は親和性が高いため、診断薬や医薬品として使用したときに、優れた効果を発揮することができると考えられる。また、膜蛋白質と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。

40

【0150】

また、得られる機能性抗体が、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる特性を有している場合には、膜蛋白質と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。なぜならば、膜蛋白質は結晶化のために必要な親水的な表面が、界面活性剤で覆われている場合が多いため、親水性領域を拡大させることが膜蛋白質の結晶化において重要であると考えられるためである。

50

## 【0151】

また、得られる機能性抗体が、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を高める特性を有している場合には、抗体と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。なぜならば、膜蛋白質は、結晶化の作業工程において熱によって変性し、良質な結晶ができない場合があるため、熱安定性を高めることが膜蛋白質の結晶化において重要であると考えられるためである。

## 【0152】

本明細書において「ループ部分変異型」は、ループ部分のアミノ酸配列が野生型に比べて1アミノ酸以上異なり、且つ野生型とは異なる立体構造を有していることを意味する。

## 【0153】

<実施形態6：リポソーム-ELISA法による化合物のスクリーニング>

本発明の他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する化合物をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しているリポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して特異的に結合する化合物をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られた化合物の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッティング法のような膜蛋白質の変性を伴う検出操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する化合物を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

## 【0154】

本明細書において、膜蛋白質とともに共結晶化する化合物は、膜蛋白質との共結晶化に使用できるのであれば、たとえば、核酸、ペプチド、糖であっても良い。後述する実施例より、膜蛋白質とともに共結晶化するために使用できる抗体が得られていることから、抗体であることが好ましい。

## 【0155】

<実施形態7：リポソーム-ELISA法による膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合する化合物のスクリーニング方法等>

本発明の他の実施形態は、リポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出しており、膜蛋白質のループ部分またはその立体構造に対して特異的に結合する化合物（以下「ループ部分結合化合物」）をスクリーニングする際に用いられる、リポソーム/膜蛋白質複合体である。このリポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、ループ部分結合化合物をスクリーニングできると考えられる。例えば、後述する実施例では化合物の種類として抗体を使用し、リポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質のループ部分またはその立体構造に特異的に結合する抗体が実際に得られている。さらに、変性ドットブロッティング法のような膜蛋白質の変性を伴う検出操作を行うことにより、ループ部分の立体構造に特異的に結合する化合物を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。なお、化合物が膜蛋白質のループ部分に特異的に結合する場合には、一次構造よりも立体構造に対して特異的に結合する方が好ましい。膜蛋白質の立体構造に対して特異的に結合する化合物は、膜蛋白質に対する結合特異性等の特性が、より優れていることが期待できるためである。

## 【0156】

また本発明の他の実施形態は、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に対する被検化合物の結合性を検査し、上記のリポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有するリポソーム/膜蛋白質複合体結合性化合物を選抜する工程、を含む、ループ部分結合化合物のスクリーニング方法である。このスクリーニング方法を利用すれば、ループ部分結合化合物を、効率

10

20

30

40

50

よくスクリーニングすることができると考えられる。例えば、後述する実施例では化合物の種類として抗体を使用し、このスクリーニング方法によって膜蛋白質のループ部分またはその立体構造に特異的に結合する抗体が実際に得られている。なお、この被検化合物は、膜蛋白質のループ部分に対して特異的に結合可能であれば限定されず、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、糖、低分子化合物、またはそれらの化合物ライブラリーであっても良い。

#### 【0157】

またこのループ部分結合化合物のスクリーニング方法は、上記膜蛋白質またはその複製物を変性させ、変性型膜蛋白質を調整する工程と、上記変性型膜蛋白質に対する、上記被検化合物または上記リポソーム/膜蛋白質複合体結合性化合物の結合性を検査し、上記リポソーム/膜蛋白質複合体に結合性を有し、上記変性型膜蛋白質に結合性を有しない化合物を選抜する工程と、をさらに含んでもよい。このスクリーニング方法を利用すれば、膜蛋白質のループ部分の立体構造に対して特異的に結合する化合物を、高い精度でスクリーニングできると考えられる。例えば、後述する実施例では化合物の種類として抗体を使用し、このスクリーニング方法によって膜蛋白質のループ部分の立体構造に特異的に結合する抗体が実際に得られている。

#### 【0158】

また本発明の他の実施形態は、化合物の生産方法であって、上記のスクリーニング方法によってループ部分結合化合物をスクリーニングする工程と、スクリーニングされたループ部分結合化合物の、複製物を作製する工程と、を含む、ループ部分結合化合物の生産方法である。この生産方法を利用すれば、後述する実施例で実証されているように、ループ部分結合化合物を効率よく生産することができる。例えば、後述する実施例の(3-3-1)においては、化合物の種類として抗体を使用し、スクリーニングによって選抜された膜蛋白質のループ部分を認識する抗体の複製物を、マウスで腹水化することによって作製している。得られたループ部分結合化合物が低分子化合物の場合は、NMRやMS等の従来技術でその低分子化合物の特性を解析し、その解析情報をもとに複製物を作成可能である。または、その解析情報をもとに、化合物群の中から抽出可能である。

#### 【0159】

また、実際には種々の要因が錯交するために一概には言えないが、上記のようなループ部分結合化合物は、ループ部分またはその立体構造に結合することで膜蛋白質の機能に影響を与える可能性がある。ループ部分結合化合物が膜蛋白質の機能に影響を与える場合、その効果を利用した医薬品またはその候補品として、上記のループ部分結合化合物を活用できると考えられる。

#### 【0160】

<実施形態8：A2a受容体結合性抗体>

本発明の他の実施形態は、A2a受容体の立体構造を認識する、A2a受容体結合性抗体である。このA2a受容体結合性抗体は、立体構造を認識しているため、A2a受容体と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこのA2a受容体結合性抗体は、立体構造を認識しているため、高親和性等の優れた性質を有したA2a受容体結合性抗体であると考えられる。そのため、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏すると考えられる。またこのA2a受容体結合性抗体は、A2a受容体の野生型に結合性を有し、変性型のA2a受容体に結合性を有しない、A2a受容体結合性抗体であっても良い。ここで変性型のA2a受容体とは、立体構造が野生型とは異なるA2a受容体であり、例えば、SDSのような変性剤によって調整できる。

#### 【0161】

本発明の他の実施形態は、A2a受容体のループ部分を認識する、A2a受容体結合性抗体である。このA2a受容体結合性抗体は、ループ部分を認識しているため、A2a受容体と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこのA2a受容体結合性抗体は、共結晶化の精度や種々の機能を高めるためには、ループ部分の立体構造を認識している抗体であることが好ましい。

## 【0162】

また上記A2a受容体結合性抗体のA2a受容体に対する解離定数は、特に限定しないが  $1.0 \times 10^{-8}$  M以下の抗体であっても良い。この解離定数は、好ましくは  $1.0 \times 10^{-8}$  M以下であり、より好ましくは  $9.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $8.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $7.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $6.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、さらに好ましくは  $5.0 \times 10^{-9}$  M以下である。なぜならば、解離定数が低いほど、上記A2a受容体結合性抗体を共結晶化、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏することが期待できるためである。

## 【0163】

本発明の他の実施形態は、A2a受容体の野生型に結合性を有し、A2a受容体のループ部分変位型に結合性を有しない、A2a受容体結合性抗体である。このA2a受容体結合性抗体は、ループ部分を認識しているため、A2a受容体と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこのA2a受容体結合性抗体は、共結晶化の精度や種々の機能を高めるためには、ループ部分の立体構造を認識している抗体であることが好ましい。

10

## 【0164】

本発明の他の実施形態は、A2a受容体の野生型に結合性を有し、ループ部分が変性しているA2a受容体に結合性を有しない、A2a受容体結合性抗体である。このA2a受容体結合性抗体は、ループ部分の立体構造を認識しているため、A2a受容体と共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこのA2a受容体結合性抗体は、立体構造を認識しているため、高親和性等の優れた性質を有したA2a受容体結合性抗体であると考えられる。そのため、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏すると考えられる。

20

## 【0165】

<実施形態9：糖トランスポーター結合性抗体>

本発明の他の実施形態は、糖トランスポーターの立体構造を認識する、糖トランスポーター結合性抗体である。この糖トランスポーター結合性抗体は、立体構造を認識しているため、糖トランスポーターと共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこの糖トランスポーター結合性抗体は、立体構造を認識しているため、高親和性等の優れた性質を有した糖トランスポーター結合性抗体であると考えられる。そのため、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏すると考えられる。またこの糖トランスポーター結合性抗体は、糖トランスポーターの野生型に結合性を有し、変性型の糖トランスポーターに結合性を有しない、糖トランスポーター結合性抗体であっても良い。ここで変性型の糖トランスポーターとは、立体構造が野生型とは異なる糖トランスポーターであり、例えば、SDSのような変性剤によって調整できる。

30

## 【0166】

本発明の他の実施形態は、糖トランスポーターのループ部分を認識する、糖トランスポーター結合性抗体である。この糖トランスポーター結合性抗体は、ループ部分を認識しているため、糖トランスポーターと共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこの糖トランスポーター結合性抗体は、共結晶化の精度や種々の機能を高めるためには、ループ部分の立体構造を認識している抗体であることが好ましい。

40

## 【0167】

また上記糖トランスポーター結合性抗体の糖トランスポーターに対する解離定数は、特に限定しないが  $1.0 \times 10^{-8}$  M以下の抗体であっても良い。この解離定数は、好ましくは  $1.0 \times 10^{-8}$  M以下であり、より好ましくは  $9.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $8.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $7.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $6.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $5.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、より好ましくは  $4.0 \times 10^{-9}$  M以下であり、さらに好ましくは  $3.0 \times 10^{-9}$  M以下である。なぜならば、解離定数が低いほど、上記糖トランスポーター結合性抗体を共結晶化、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏することが期待できるためである。

50

## 【0168】

本発明の他の実施形態は、糖トランスポーターの野生型に結合性を有し、糖トランスポーターのループ部分変位型に結合性を有しない、糖トランスポーター結合性抗体である。この糖トランスポーター結合性抗体は、ループ部分を認識しているため、糖トランスポーターと共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこの糖トランスポーター結合性抗体は、共結晶化の精度や種々の機能を高めるためには、ループ部分の立体構造を認識している抗体であることが好ましい。

## 【0169】

本発明の他の実施形態は、糖トランスポーターの野生型に結合性を有し、ループ部分が変性している糖トランスポーターに結合性を有しない、糖トランスポーター結合性抗体である。この糖トランスポーター結合性抗体は、ループ部分の立体構造を認識しているため、糖トランスポーターと共結晶化するための抗体として好適に使用できると考えられる。またこの糖トランスポーター結合性抗体は、立体構造を認識しているため、高親和性等の優れた性質を有した糖トランスポーター結合性抗体であると考えられる。そのため、診断薬、または治療薬等の用途で使用したときに、優れた効果を奏すると考えられる。

## 【0170】

以下、上記の実施形態に係る作用効果の一部を説明する。

## 【0171】

本発明の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出している、リポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットプロット法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

## 【0172】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、上記リポソームに埋め込まれているリンカーと、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出していて、上記リポソームが上記リンカーを介して上記固相担体に結合している、リポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットプロット法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

## 【0173】

他の実施形態は、上記膜蛋白質が、受容体蛋白質、チャネル蛋白質、輸送体蛋白質、接着分子、膜結合性酵素からなる群から選ばれる膜蛋白質、またはその塩である、リポソーム/膜蛋白質複合体である。これらの膜蛋白質は、医学的、創薬学的に重要なターゲットであるので、これらをターゲットにして共結晶化を行えば、治療薬や診断薬等の開発を進展させる効果がある。

10

20

30

40

50

## 【0174】

他の実施形態は、上記膜蛋白質が、複数回膜貫通型の膜蛋白質である、リポソーム/膜蛋白質複合体である。複数回膜貫通型の膜蛋白質は、医学的、創薬学的に重要なターゲットであるので、これらをターゲットにして共結晶化を行えば、治療薬や診断薬等の開発を進展させる効果がある。

## 【0175】

他の実施形態は、上記膜蛋白質が、7回以上膜を貫通している膜蛋白質である、リポソーム/膜蛋白質複合体である。7回以上膜を貫通している膜蛋白質には、GPCRや輸送体蛋白質など、医学的、創薬学的に重要なターゲットが多く、これらをターゲットにして共結晶化を行えば、治療薬や診断薬等の開発を進展させる効果がある。

10

## 【0176】

他の実施形態は、上記膜蛋白質がG蛋白質共役受容体である、リポソーム/膜蛋白質複合体である。G蛋白質共役受容体は、医学的、創薬学的に重要なターゲットであるので、これらをターゲットにして共結晶化を行えば、治療薬や診断薬等の開発を進展させる効果がある。

## 【0177】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する化合物をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも一部が、リポソームの外側表面に露出している、リポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する化合物をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られた化合物の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットプロット法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する化合物を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

20

## 【0178】

他の実施形態は、膜蛋白質のループ部分に特異的に結合する抗体を、スクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体であって、固相担体と、上記固相担体に結合しているリポソームと、上記リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、上記膜蛋白質の少なくとも1つのループ部分が、リポソームの外側表面に露出している、リポソーム/膜蛋白質複合体である。該リポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質のループ部分に特異的に結合する抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、後述する実施例で、膜蛋白質のループ部分に特異的に結合することが実証されているためである。さらに、変性ドットプロット法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質のループ部分の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

30

40

## 【0179】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する化合物をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体の生産方法であって、脂質溶液とリンカーと上記膜蛋白質と界面活性剤とを含有する水溶液を混合し、混合液を作製する工程と、上記混合液に界面活性剤除去剤を加え、上記混合液中の上記界面活性剤を上記界面活性剤除去剤に吸着させ、上記リンカーおよび上記膜蛋白質が埋め込まれているリポソームを生成する工程と、さらに、上記リポソームを上記リンカーを介して上記固相担体に結合させ、上記リポソーム複合体を生成する工程と、を含む、リポソーム複合体の生産方法である。この方法で生産したリポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の

50

天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッキング法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

#### 【0180】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング方法であって、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用するリポソーム/膜蛋白質複合体に、被検抗体を接触させる工程と、前工程で結合した抗体を検出する工程と、上記膜蛋白質を変性させる工程と、前工程で変性した変性型の膜蛋白質に、被検抗体を接触させる工程と、前工程で結合した抗体を検出する工程と、を含む、スクリーニング方法である。このスクリーニング方法を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

10

#### 【0181】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング用キットであって、膜蛋白質と脂質とリンカーと固相担体と、を含む、スクリーニング用キットである。このスクリーニング用キットで生産したリポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッキング法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

20

#### 【0182】

他の実施形態は、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体のスクリーニング用キットであって、膜蛋白質と脂質とリンカーと固相担体と、蛋白質変性剤と、ドットブロッキング法、ウエスタンブロッキング法、免疫ブロッキング法、またはELISA法のいずれかの方法に使用する試薬と、を含む、スクリーニング用キットである。このスクリーニング用キットで生産したリポソーム/膜蛋白質複合体を用いてリポソーム-ELISA法を行うことで、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングできる効果がある。なぜならば、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられるためである。また、さらに変性ドットブロッキング法のような膜蛋白質の変性を伴う操作を行うことにより、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を、高い精度でスクリーニングできる効果がある。

30

#### 【実施例】

40

#### 【0183】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0184】

<実施例1：リポソームを用いた天然型の膜蛋白質の提示と、リポソーム-ELISA法の評価>

(1-1) A2a受容体のビオチン化脂質含有リポソームへの再構成

N末端FLAG-tag及びC末端His10-tagを有するヒト由来アデノシン受容体A2a (A2a受容体)を、*Pichia pastoris*を宿主とする発現系よりTALON resinを用いたaffinityカラムを用いて精製した。リポソーム再構成の際に用いる脂質の種類と再構成方法を検討した結果、

50

鶏卵由来フォスファチジルコリンを脂質として用い、Bio-Beadsによる界面活性剤除去法が最適であることがわかった。精製したA2a受容体を、1%オクチルグルコシドを含むPBSにより可溶化した5 µg/mlの16:0 biotinyl CAP-PEを含む1mg/mlの鶏卵由来フォスファチジルコリン溶液に最終濃度0.1mg/mlとなるように加え30分氷上で静置した。次いで1mlに対し30mgのBio-Beadsを加え、4 で1時間攪拌する作業を2度行った。さらに1mlに対し100mgのBio-Beadsを加え1晩攪拌し、Bio-Beadsを取り除くことでビオチン化脂質含有A2a受容体再構成リポソームを作成した。再構成されたA2a受容体が天然構造を保っていることは、3HラベルされたLigandの結合活性を測定することにより確認した。

#### 【0185】

##### (1-2) 再構成リポソームを用いたリポソーム-ELISA法

上記のように作成したA2a受容体再構成リポソームをPBSで10倍希釈し、Immobilizer streptavidin coat plateへ100 µL添加し、1時間室温で静置した。200 µLのPBSで3回洗浄後、1%BSAを含むPBSを加え、1時間室温で静置することでブロッキングを行った。200 µLのPBSで3回洗浄後、mouse由来anti FLAG-M2抗体(Sigma社)の1%BSA-PBSによる希釈系列(50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 µg/ml)を加え1時間室温で静置した。200 µLのPBSで3回洗浄後、二次抗体として2000倍希釈anti-mouse IgG-HRP conjugateを加え1時間室温で静置した。PBSによる洗浄後、HRPの発色基質であるABTS溶液(Roche社)を100 µL加え15分反応させ、100 µLの1% SDSを加えることで反応を停止させた。次いでSpectraMax2e micro plate reader(Molecular device社)により405nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。

#### 【0186】

##### (1-2) 結果の考察

図2に示すように、リポソーム-ELISA法によって、0.01 µg/mlの抗体濃度においても有意なシグナルが得られており、非常にシグナル/ノイズ比の高い優れた結果が得られた。さらに、本方法により、天然構造を保持したままの膜蛋白質を高安定かつ強固にプラスチックプレート上に提示できた。このような膜蛋白質提示法を用いることで、ELISAでの用途に限らず、様々なハイスループットバイオアッセイが可能となる。

#### 【0187】

また、リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、リポソーム-ELISA法によって得られたモノクローナル抗体の多くが、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識していると考えられる。本願発明者らは実際にこの方法を用いて、ヒト由来アデノシン受容体A2aに関して200種類を超えるモノクローナル抗体を得ている。

#### 【0188】

<実施例2: リポソーム-ELISA法と変性ドットブロッキング法による、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体のスクリーニング>

(2-1) リポソーム-ELISA法を用いた、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の一次スクリーニング

リポソーム-ELISA法は、実施例1と基本的には同じ構成である。ただし、リポソーム溶液はPBSでさらに2倍希釈し、また、mouse由来anti FLAG-M2抗体(Sigma社)に代えて、モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清を1% BSAを含むPBSで50倍に希釈して使用した。これに伴いABTSの発色時間を1時間とした。

#### 【0189】

(2-2) 変性ドットブロッキング法による、天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体二次スクリーニング

ドットブロッキング法には、Bio-Rad社製Bio-Dotとニトロセルロース膜を用いた。抗原のヒト由来アデノシン受容体A2aは実施例1と同様に調製した。これを最終濃度100ng/mLとなるように1% SDSを含むPBSで希釈し、室温1時間静置することで変性させた。Bio-Dotを使用して、これを100 µLニトロセルロース膜で濾過することで膜に変性したA2a受容体を吸着させた。同様に1% BSAを含むPBST(0.05%のTween20を含むPBS)を200 µL濾過することでブロッキングを行い、200 µLのPBSTで3度の洗浄後、50倍希釈したモノクローナル抗

10

20

30

40

50

体を含むハイブリドーマ培養上清を100  $\mu$ L濾過した。再度200  $\mu$ LのPBSTで3度洗浄した後、PBSTで20,000倍希釈したanti mouse IgG-HRPを100  $\mu$ L濾過した。再度200  $\mu$ LのPBSTで3度の洗浄後、Immobilon Western HRP substrate(Millipore社)を用いて化学発光させ、LAS-1000 plus(Fuji Film社)を使用して検出した。以上の結果を図3に示す。リポソーム-ELISA法による発色を左の列、ドットブロッキング法による発色を右の列に、それぞれ同一の培養上清が隣に並ぶように表している。

【0190】

(2-3) 結果の考察

青枠で示したものはドットブロッキング法において強い結合を示している。これらのクローンは変性したA2a受容体にも強く結合することを示しており、N末端やC末端あるいはループ領域中のフレキシブルな部分を認識して結合していると考えられる。一方赤枠で示したクローンはリポソーム-ELISA法で抗体の結合が認められるのにも関わらず、変性したA2a受容体には結合しないあるいは結合力が低い抗体であることを示している。このような抗体は、A2a受容体の親水性表面の立体構造を認識して結合していると考えられる。

10

【0191】

つまり、変性ドットブロッキング法による二次スクリーニングによって、A2a受容体の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体のみを得ることに成功した。二次元であるアミノ酸配列のバリエーションよりも、三次元である立体構造の方がバリエーションが豊富に存在する。そのため、天然型の立体構造を認識するということは、アミノ酸配列のみを認識する抗体に比べて、抗体の結合特異性が高いことを意味する。

20

【0192】

なお、膜蛋白質と抗体を共結晶化する際には、使用する膜蛋白質と抗体の複合体は、高純度であることが好ましい。また、結晶に含まれる膜蛋白質は、天然型の構造を有していることが好ましい。そのため、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して結合特異性の高い抗体が適している。そして、上記結果より、本実施例で得られたモノクローナル抗体は、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して結合特異性が高いため、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。さらに、このスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

【0193】

また、今回は評価を行うクローン数が多かったため、よりハイスループットなドットブロッキング法を行ったが、通常のWestern blottingにおいても同様な評価は可能であることを確認している。また、本願発明者らは、本技術によりヒト由来アデノシン受容体A2aの立体構造認識性抗体を14種類得ることに成功している。

30

【0194】

<実施例3：膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の結合親和性の測定>

(3-1) Biacore測定による解離定数測定

表面プラズモン共鳴原理を基盤としたBiacore T-100を用いて抗体の結合、解離速度を評価した。HBS-DDM緩衝液(10mmol/L HEPES pH7.4、150mmol/L 塩化ナトリウム、0.05% w t/volドデシルマルトシド)を用いて抗マウスFc抗体をCM5センサーチップにアミンカップリング法を用いて固定化した。このセンサーチップに、実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清をフローさせることにより、抗受容体抗体固定化チップを作成した。精製したヒト由来アデノシン受容体A2aを600nmol/L濃度となるようにHBS-DDMで希釈し、センサーチップにフローし、センサーグラムを得た。BiaEvaluationソフトウェアにより解析することで解離定数を見積もった。その結果、A2a受容体-mAb1 IgG間の解離定数は $4.4 \times 10^{-9}$ Mであった。

40

【0195】

(3-2) 結果の考察

A2a受容体-mAb1 IgG間の解離定数は $4.4 \times 10^{-9}$ Mであり、高い親和性を有する抗体を得る

50

ことに成功した。なお、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、精製や結晶化等の工程の間、膜蛋白質との結合を持続するために、高い親和性を有する必要がある。そして、上記の結果より、本実施例で用いたモノクローナル抗体（実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体）は、膜蛋白質との高い親和性を有するモノクローナル抗体であるので、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。さらに、実施例2のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

#### 【0196】

(3-3) A2a受容体とモノクローナル抗体Fabフラグメントのゲル濾過による結合の持続性の評価

10

##### (3-3-1) モノクローナル抗体のFabフラグメントの作成

実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体をマウス腹水より精製し、リン酸緩衝液中に2mg/mlとなるように調製した。2倍リン酸緩衝液に20mmol/L シス테인<sup>?</sup>塩酸、10mmol/L EDTAとなるように加え、ここに0.04mg/mlとなるようにパピンを可溶化し、37℃で30分間パピンを活性化した。活性化パピン溶液と抗体溶液を1対1で加え37℃1晩反応させることで抗体をフラグメント化した。0.3mol/L ヨードアセトアミドを抗体<sup>?</sup>パピン溶液に対し1/10量加え、パピンを不活性化した。1倍リン酸緩衝液に対し1晩透析を行った後、陽イオン交換カラムのフロースルーを回収することにより精製Fabフラグメントを得た。

#### 【0197】

20

##### (3-3-2) A2a受容体-Fabフラグメントのゲル濾過分析

精製したA2a受容体を1mgと、Fabフラグメント2mgを混合し氷上で1時間放置することでA2a受容体-Fab複合体を300 $\mu$ L調製した。HBS-DDM (20mmol/L Hepes pH7.5、150mmol/L NaCl、0.05% wt/vol DDM、0.01% wt/vol CHS)で平衡化したSuperose6 10/300にA2a受容体のみあるいはA2a受容体-Fab複合体をinjectし、0.5ml/minの流速で溶出した。溶出液の280nm光吸収をBioLogic FPLCシステムを用いて検出した。その結果を図4に示す。

#### 【0198】

##### (3-4) 結果の考察

A2a受容体単独でゲル濾過を行った場合には16mL程度での溶出であったのに対し、A2a受容体に対して過剰量のFabフラグメントを加えた場合では15mLでの溶出となった。また、A2a受容体単独状態での溶出位置には全くピークを検出できなかった。このことはゲル濾過の最中においてもA2a受容体-抗体間の結合が保たれていることを示しており、様々な用途においてもこの抗体が十分な結合能力を有していることを示唆する。

30

#### 【0199】

また、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、精製や結晶化等の工程の間、膜蛋白質との結合を持続する必要がある。そのため、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質に対して高い親和性を有する抗体が適している。そして、上記の結果より、本実施例で用いたモノクローナル抗体（実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体）は、膜蛋白質との高い結合の持続性を有するモノクローナル抗体であるので、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。さらに、実施例2のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

40

#### 【0200】

<実施例4：膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体と膜蛋白質の複合体の熱安定性測定>

##### (4-1) FabフラグメントとA2a受容体の複合体の熱安定性測定

実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体の受容体への結合に伴う、A2a受容体の熱安定性の変化について評価を行った。方法は、[A. I. Alexandrov et al. (2008) Structure 16, 351-359]に従った。即ち、シス테인残基に共有結合したときのみ蛍光を発する色素CPM (N-[4-(7-diethylamino-4methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide) を精製

50

した受容体あるいは、受容体と実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体のFabフラグメントとの複合体に加え、40℃でインキュベーションした。受容体が変性し高次構造が崩れるに従い疎水性部位のシステイン残基が溶媒に露出し、それに伴いシステイン残基とCPMが反応し蛍光強度が増していく過程を蛍光マイクロプレートリーダー上で検出した。図5に、A2a受容体単独、あるいはA2a受容体とフレキシブルな領域を認識する抗体クローンのFabフラグメントFab1との複合体、実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体クローンのFabフラグメントFab2との複合体での熱負荷変性過程を示す。この評価方法では、特に最大蛍光値の半分の蛍光値を示すまでの時間「Half Life;  $t_{1/2}$ 」を熱安定性の評価基準とする。

#### 【0201】

##### (4-2) 結果の考察

受容体単独状態での $t_{1/2}$ は25分と短かったのに対し、フレキシブルな領域を認識するFab1では $t_{1/2}$ が71分に伸びていた。一方、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識するFab2では $t_{1/2}$ が750分と前出の2つの状態に比べて格段に熱安定性が増していることが明らかになった。このことはフレキシブルな領域に抗体が結合した場合でもA2aの立体構造安定性が多少上昇はしたが、立体構造を認識する抗体が結合した場合はよりA2aの立体構造が安定化したことを意味する。立体構造を認識する抗体では、膜蛋白質のアミノ酸配列というよりはアミノ酸配置を認識し結合している。従って、抗体の結合した領域は、膜蛋白質に比べて非常に安定な抗体分子によって固められた状態となり、膜蛋白質全体が安定化したものと考えられる。

#### 【0202】

一般的に膜蛋白質は不安定であり、生体膜からの精製、結晶化の段階で変性してしまうものも多々ある。特に、医学的にも重要なほ乳類由来の膜受容体や輸送体はその傾向が著しい。また、蛋白質の結晶化には親水的な表面が必須であるが、膜蛋白質はその大半が界面活性剤で覆われているため、水溶性蛋白質に比べて極端に結晶化が困難である。

#### 【0203】

そして、上記のような、膜蛋白質の天然型の立体構造を認識する抗体と膜蛋白質の複合体は、熱安定性が上昇する点と親水性領域が拡大する点で、共結晶化に好適であると考えられる。このことは、本実施例で用いたモノクローナル抗体(実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体)が、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できることを示唆する。そして、実施例2のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

#### 【0204】

<実施例5：膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の膜蛋白質結合部位の決定>

実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体の、A2a受容体に対する抗体結合部位を調査した。多数回膜貫通型蛋白質、特に7回膜貫通型受容体の膜外領域にあたる一次配列に置換を施したキメラ変異体を調整し、その発現膜画分に対してウエスタンブロット解析を行う。変異操作に伴うシグナルの消失をもって抗体結合部位を判断する。

#### 【0205】

##### (5-1) キメラA2a受容体の作製

##### (5-1-1) キメラA2a受容体のアミノ酸配列

本実施例で使用したA2a受容体の野生型のアミノ酸配列は一文字表記で、MPIMGSSVYITVELAIAVLAII LGNVLCWAVWLNLSNLQNVNTNYFVVSLLAAADIAVGVLAI PFAITISTGFCAACHGCLFIACFVVLVTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKEGKQHSQCGEGQVACLFEDVVP MNMYVFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKSLAII VGLFALCWLPLHIIIN CFTFFCPDCSHAPLWMLYLAIVLSHTNSVWNPFYIAYRIRFRQTRFKIIRSHVLRQQEPFKA(配列番号1)である。

#### 【0206】

キメラA2a受容体の一群として、3-IMGSSV-8(配列番号2)をMPPSISAFQAA(配列番号3

10

20

30

40

50

)に置換したNterキメラ変異体、32-WLNSNLQNVNTNY-43(配列番号4)をKVNQALRDSTFC(配列番号5)に置換したi1キメラ変異体、70-FCAACHG-76(配列番号6)をITIHFYs(配列番号7)に置換したo1キメラ変異体、104-IAIRIPLRYNGLVTGT-119(配列番号8)をLRVKLTVR YKRVTTHR(配列番号9)に置換したi2キメラ変異体、146-CGQPKEGKQHSQGCQGVACLFEDVVP-173(配列番号10)をLSAVERAWAANGSMGEPVIKCEFVKVIS(配列番号11)に置換したo2キメラ変異体、205-RRQLQMESQPLPGERARSTLQKEVH-230(配列番号12)をKRQLQKIDKSEGRFH VQNLsQVEQDGRGTGHGLRRSSKFCLKEHK(配列番号13)に置換したi3キメラ変異体、261-DCSHA-265(配列番号14)をSCHK(配列番号15)に置換したo3キメラ変異体、297-QTFRKIIR SHVLRQEQPFKA-316(配列番号16)をVT(配列番号17)に置換したCterキメラ変異体を作製した。各キメラ変異体の対応図を図6に示す。

10

#### 【0207】

##### (5-1-2)キメラA2a受容体の作製

まず、制限酵素SmaIにより直鎖化処理された酵母用プラスミドpRS426GAL1-GFPと、PCR法により増幅されたA2a受容体またはその変異体の遺伝子配列を用いて、酢酸リチウム法により、出芽酵母株FGY217を形質転換した。形質転換処理された宿主株溶液を2%寒天プレートとして準備した2%グルコース含有ウラシル欠損最少培地に塗布し、30℃で3日静置しコロニーを形成させた。シングルコロニーを0.1%グルコース含有ウラシル欠損最少培地10mLの入った遠沈管2本に分注し、そのうち1本を菌体濃度が飽和するまで30℃で震盪培養したのち回収した。回収した菌体はグラスビーズ(商品名:Glass beads, acid-washed、Sigma社製)を用いて剪断し、得られた細胞抽出液からプラスミドミニプレップキット(Qiagen社)を用いてプラスミド溶液を獲得した。プラスミドをDNA配列解析することにより変異が適切に施されているのを確認した。

20

#### 【0208】

##### (5-2)キメラA2a受容体の生産

上記0.1%グルコース含有ウラシル欠損最少培地10mLのうち1本を30℃で震盪培養し、OD<sub>600</sub> 0.6となった時点で終濃度2%のガラクトースを添加した。30℃で20時間震盪培養を続けた後、培地を回収し、2000×gで沈殿させた菌体を、50mM Tris-HCl(pH7.6)、5mM EDTA、10%グリセロール、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル(Complete EDTA-free、Roche社)からなる緩衝液(YSB)700μLに懸濁させた。グラスビーズ200μL(Glass beads, acid-washed、Sigma社)を加えて4℃で30分間高速震盪し、菌体を剪断して得られた抽出液を14,000×g、1分間遠心して菌体死骸を除去した。上清を100,000×g、30分間小型超遠心分離器に通し、その沈殿(発現膜画分)を回収し、YSB 1mLで懸濁した。懸濁液2μLを50mM Tris-HCl(pH7.6)、5%グリセロール、5mM EDTA、0.02%プロモフェノールブルーからなる溶液2μLと混ぜて30分静置し、トリスグリシン12%ポリアクリルアミドゲル(Invitrogen社)を用いて100V、120分電気泳動し、組成物を展開した。展開したゲルを蛍光イメージアナライザ(商品名:LAS-1000、富士フィルム社)で撮影し、GFP融合変異体蛋白質に由来する単一バンドを確認した。

30

#### 【0209】

##### (5-3)キメラA2a受容体に対する、モノクローナル抗体の結合部位の決定

変異体懸濁液各1μLについて12%ポリアクリルアミドゲル(Tris-Glycine Gel、Invitrogen社)を用いて100V、120分電気泳動したのち、ゲル表面に親水化処理を施したPVDF膜に接触させ、0.3% Tris、1.5%グリシン、0.1%SDSからなる転写溶液を満たしたタンク式転写装置(Xcell; Invitrogen)内で30V、90分間で転写を行った。次いで2%スキムミルクを含むTBS-T(10mM Tris-HCl(pH7.6)、150mM NaCl、0.1%(v/v)Tween-20)に1時間膜を浸してブロッキングし、一次抗体として実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体、二次抗体としてHRP結合抗IgG抗体(商品名:goat anti-mouse IgG HRP conjugate:santa cruz社製)を作用させて、抗原-抗体反応を行った。化学発光試薬(商品名:Immobilon Western Detection Reagents、Millipore社製)を用いて二次抗体を検出し、検出されなかったバンドに相当する変異体において変異を施した箇所がエピトープ領域であると判断した。

40

#### 【0210】

50

図7上部にA2a受容体未変異体とその変異体の一群の発現結果を蛍光検出にて確認した結果を示す。また、図7下部にA2a受容体未変異体とその変異体の一群に対する抗原 - 抗体反応をウエスタンブロットにより検出した結果を示す。

#### 【0211】

##### (5-4) 結果の考察

図7に示されるように、i3キメラ変異体が展開されたレーンにおいて、i3キメラ変異体の発現は確認されているが(図7上部)、抗原 - 抗体反応に基づく発光は観測されなかった(図7下部)。そのため、実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体は、A2a受容体の細胞内側第三ループに位置する205-RRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVH-230(配列番号12)からなる配列を認識するものと判断できる。また、本願出願者らは同様に、実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体の膜蛋白質結合部位を複数調査する中で、A2a受容体のループ部分が認識されることが多く、特に細胞内側第三ループが認識されることが多いことを確認している。

10

#### 【0212】

一般的に膜蛋白質のN末端領域は、溶媒中において立体構造が不安定な、比較的フレキシブルな領域である。そのため、膜蛋白質のN末端領域を認識して結合する抗体は、立体構造ではなく、アミノ酸配列を認識している可能性が極めて高い。対して、本実施例で用いた抗体(実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体)は、ループ部分を認識しているため、立体構造を認識している可能性が高い。立体構造を認識するという事は、アミノ酸配列のみを認識する抗体に比べて、抗体の結合特異性が高いことを意味する。

20

#### 【0213】

なお、膜蛋白質と抗体を共結晶化するには、使用する膜蛋白質と抗体の複合体は、高純度であることが好ましい。また、結晶に含まれる膜蛋白質は、天然型の構造を有していることが好ましい。そのため、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して結合特異性の高い抗体が適している。そして、上記結果より、本実施例で用いた抗体(実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体)は、膜蛋白質の天然型の立体構造に対して結合特異性が高いため、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。

#### 【0214】

また、膜蛋白質の蛋白質N末端(やC末端)に存在する親水性領域は、一般的に溶媒中において膜貫通領域に対する相対位置や方位に揺らぎが大きいことが多い。このような領域に抗体が結合したとしても、結晶中で規則的に並んだ定まった結晶格子を形成し得えず、蛋白質N末端(やC末端)近くに結合する抗体は結晶化に適さないということがいえる。したがって、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、膜蛋白質のループ部分に対して結合特異性の高い抗体が適している。そして、上記結果より、本実施例で用いた抗体(実施例2の方法で得られたモノクローナル抗体)は、膜蛋白質のループ部分に対して結合特異性が高いため、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。さらに、実施例2のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

30

#### 【0215】

<実施例6:抗体ファージライブラリーを使用した、膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体のスクリーニングとその評価>

40

#### 【0216】

(6-1) ヒト糖核酸トランスポーターのビオチン化脂質含有リポソームへの再構成  
実施例1の(1-1)と基本的には同じ構成であるが、A2a受容体を、10回膜貫通型であるヒト糖核酸トランスポーターに代えて行った。

#### 【0217】

##### (6-2) 抗体ファージライブラリーの作製

リポソーム再構成したヒト糖核酸トランスポーター抗原(ビオチン化脂質非含有)をBALB/cマウスに免疫した。マウス血中抗体価の上昇を確認後、上記の脾細胞に由来する全RN

50

Aを抽出し、抗体遺伝子の可変領域 ( $V_H$ および $V_L$ )をコードするcDNAを可変領域特異的配列を有する混合プライマーを用いてRT-PCRにより増幅した。Barbasら (2001)の方法に従って、これらのRT-PCR産物をそれぞれヒト由来の定常領域  $C_H1$ および $C?$ のcDNAと連結したキメラH鎖、L鎖遺伝子を三段階のオーバーラップ PCRにより作製し、ファージディスプレイ用ベクターpComb3XSSに組み込むことで、Fab抗体ファージライブラリーを構築した。得られたライブラリーのサイズは概ね  $10^7 \sim 10^8$  クロンの規模であった。得られた各ライブラリーから無作為抽出した10クローンについて $V_H$ および $V_L$ 領域のシーケンス解析を行った結果、ライブラリーを構成するクローンにアミノ酸配列上の重複がないことを確認した。この方法により、マウスBリンパ球由来の $V_H$ および $V_L$ をコードするcDNA集団を、その配列多様性を維持したままファージライブラリーの形で回収することが可能となった。

10

## 【0218】

## (6-3) プロテオリポソームを用いた一次スクリーニング

Fabファージクローンの一次スクリーニングとして、ビオチン化プロテオリポソーム (ビオチン化リポソーム/ヒト糖核酸トランスポーター複合体) を固定化した磁気ビーズ Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (200  $\mu$ L) を用いたバイオパニングを行った。磁気ビーズを1% (w/v) BSAを含むTBSバッファーで8-15回洗浄後、プロテオリポソームに結合したファージを100  $\mu$ Lの100 mM Glycine-HCl (pH2.2)で溶出した。溶出ファージ液はすみやかに100  $\mu$ Lの1 M Tris-HCl (pH 9.9)を加えて中和後、大腸菌XL-1 Blue株に感染させ、100  $\mu$ g/mL アンピシリンと10  $\mu$ g/mL テトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗抹し37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。プレート上に生育したコロニーをLB培地に懸濁して回収し、VCSM13ヘルパーファージを感染させることによりファージレスキューを行い、さらに100  $\mu$ g/mL アンピシリン、10  $\mu$ g/mL テトラサイクリン、および70  $\mu$ g/mL カナマイシンを含むSB培地にて30  $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養することによって培養上清中にファージサブ集団を増幅・生産した。ファージは大腸菌培養上清に対して4% (w/v) PEG6000および3% (w/v) NaClを加えて沈殿させ、再度TBSバッファーに懸濁させて $10^{13} \sim 10^{14}$ 程度のファージを次のラウンドのバイオパニングに供した。以上のようなバイオパニング操作を4ラウンド繰り返すことにより、陽性候補の抗体ファージを数十~数百クローンにまで絞り込んだ。

20

## 【0219】

## (6-4) リポソームELISA法を用いた二次スクリーニング

上記一次スクリーニングで得られた抗体ファージから、Fabフラグメントを生産した。繊維状ファージのgene III product (gp3) が融合していないFabフラグメントを生産するときは 大腸菌TOP10株を宿主として用い、Fab-g3p融合蛋白質を生産するときは 大腸菌XL-1 Blue株を宿主として用いた。また、いずれの場合でも生産したFabのH鎖のC末端にHAタグが付加されている。陽性Fabクローンの大腸菌グリセロールストックを100  $\mu$ g/mL アンピシリンを含むSB培地 (50 mL) に接種し、37  $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。この前培養液を100  $\mu$ g/mL アンピシリンを含むSB培地 (5 L) に接種後、37  $^{\circ}$ Cで振盪にて本培養を開始した。培養液の600 nmにおける濁度 ( $OD_{600nm}$ )を経時的にモニターし、その値が0.5~0.8に達した時点で終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加した。その後、30  $^{\circ}$ Cにて振盪培養を16~18時間行い、遠心操作 (6,000 g、30分間、4  $^{\circ}$ C)にて菌体を回収した。ペリプラズム画分の抽出液の調製はリゾチーム処理および浸透圧ショックにより行った。菌体ペレットに等量のペリプラズム抽出用バッファーを加えて懸濁し、氷上で30分間放置した後、遠心操作 (6000 g、30分間、4  $^{\circ}$ C)により上清を回収しペリプラズム抽出液とした。Fabの精製は、硫酸塩析、透析、Ni-NTAアフィニティーカラム、Protein Gアフィニティーカラムによって行った。

30

40

## 【0220】

次に、得られたレコンビナントFabフラグメントを含む大腸菌粗抽出液を利用して、リポソームELISA法を行った。リポソームELISA法は、実施例1の(1-1)、(1-2)と基本的には同じ構成であるが、A2a受容体をヒト糖核酸トランスポーターに代え、さらにmouse由来anti FLAG-M2抗体(Sigma社)を、レコンビナントFab抗体フラグメントを含む大腸菌粗抽出液に代えて行った。そして、ビオチン化リポソーム/ヒト糖核酸トランスポータ

50

ー複合体に結合するレコンビナントFab抗体フラグメントを得た。

#### 【0221】

##### (6-5) 結果の考察

リポソーム中で膜蛋白質は天然型の立体構造を保っていると考えられるため、上記リポソーム-ELISA法によって得られたレコンビナントFab抗体フラグメントの多くが、ヒト糖核酸トランスポーターの立体構造を認識していると考えられる。また、続けて、実施例2の(2-2)の方法と同様のスクリーニングを行えば、より精度よく、ヒト糖核酸トランスポーターの天然型の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体のみを得ることができると考えられる。

##### (6-6) Biacore測定による解離定数測定

ELISAのようなエンドポイントアッセイでは膜蛋白質/抗体複合体形成のダイナミクス、とくに結合の安定性に関する情報が得られないため、表面プラズモン共鳴原理を基盤としたBiacore T-100を用いてFabフラグメントの結合・解離速度の評価技術を確認した。実施例5の(6-4)で得られたレコンビナントFab抗体フラグメントのH鎖C末端にはHAタグが付加されているため、Biacore SAチップ上に固定化したビオチン化抗HAタグIgGにキャプチャーすることが可能である。Biotin-conjugated anti-HA tag IgGをTBS-Dバッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.05% (w/v) DDM] に溶かして50 µg/mLの濃度とし、流速10 µL/minで120秒間フローセルに流すことによって、Biacore SAチップに固定化した。次に大腸菌で発現させたFabフラグメントに12 mg/mL BSAおよび12 mg/mL CM-デキストランを添加後、流速10 µL/minで300秒間フローセルに流すことによって、チップ上にFabを捕捉させた。最後にアナライトとしてTBS-Dバッファーに溶解したヒト糖核酸トランスポーター精製標品 (0、4、8、16、または32 µg/mLの各濃度) を流速30 µL/minで120秒間フローセルに流し、その直後の10分間の解離レスポンスを測定することによって、結合の安定性を評価した。対照フローセルにおいてはチップ上にFabフラグメントを捕捉させずに同様の実験を行い、両者の相互作用レスポンスの差を取ることでFabフラグメントと膜蛋白質との結合・解離動態を解析した。チップの再生に際しては10mM NaOH溶液を流速30 µL/minで30秒間フローセルに流すことにより捕捉されたFabフラグメントを解離させた。以上の方法により、多数のFabフラグメントの膜蛋白質に対する親和性を繰り返し自動測定することが可能である。

#### 【0222】

##### (6-7) 結果の考察

ヒト糖核酸トランスポーター - Fabフラグメント間の解離定数は $2.7 \times 10^{-9}$  Mであり、高い親和性を有する抗体を得ることに成功した。なお、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、精製や結晶化等の工程の間、膜蛋白質との結合を持続するために、高い親和性を有する必要がある。そして、上記の結果より、本Biacore測定で用いたモノクローナル抗体(実施例6の(6-4)で得られたレコンビナントFab抗体フラグメント)は、膜蛋白質との高い親和性を有するモノクローナル抗体であるので、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。さらに、実施例5のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できるモノクローナル抗体が、効率的に得られると考えられる。

#### 【0223】

(6-8) ヒト糖核酸トランスポーター/GFP融合蛋白質とFabフラグメントの複合体の蛍光ゲル濾過分析 (FSEC)

10 µgのヒト糖核酸トランスポーター/GFP融合蛋白質の精製標品に対して、実施例5の(6-4)で得られたレコンビナントFab抗体フラグメントの過剰量を混合し、氷上で1時間放置した。このとき試料中のDDM濃度は0.05% (w/v) に保った。得られた複合体試料 (300 µL) を、TBS-Dバッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.05% (w/v) DDM] で平衡化したSuperdex200 10/300にアプライし、0.4mL/minの流速で溶出した。一方、10 µgのヒト糖核酸トランスポーター/GFP融合蛋白質の精製標品単独の試料についても同様のゲル濾過を行った。分画された各フラクション (0.2mL) のGFP蛍光量 (Excitation 47

10

20

30

40

50

0nm、Emission 512nm) をSpectraMax2e Microplate Readerを用いて測定した。その結果を図8に示す。

【0224】

(6-9) 結果の考察

ヒト糖核酸トランスポーター/GFP融合蛋白質単独でゲル濾過を行った場合には14.5mL程度での溶出であったのに対し、ヒト糖核酸トランスポーター/GFP融合蛋白質に対して過剰量の上記レコンビナントFab抗体フラグメントを加えた場合では13.5mL程度での溶出となった。このことはゲル濾過の最中においてもヒト糖核酸トランスポーターと抗体間の結合が保たれていることを示しており、様々な用途においてもこの抗体が十分な結合能力を有していることを示唆する。

10

【0225】

また、膜蛋白質との共結晶化に使用する抗体は、精製や結晶化等の工程の間、膜蛋白質との結合を持続する必要がある。つまり、上記の結果より、この分析で用いたモノクローナル抗体(実施例6の(6-4)で得られたレコンビナントFab抗体フラグメント)は、膜蛋白質との高い結合の持続性を有するモノクローナル抗体であるので、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できると考えられる。そして、実施例6のスクリーニング方法を用いれば、膜蛋白質との共結晶化に好適に使用できる抗体フラグメントが、効率的に得られると考えられる。

【0226】

<実施例7: 膜蛋白質の共結晶化>

20

(7-1) A2a受容体の共結晶化

上記(3-3-2)と同様にゲル濾過を実施し、A2a受容体とFab複合体のフラクションを得た。このフラクションをアミコンウルトラ-4分画分子量100k(millipore)等で濃縮し、10mg/ml程度の蛋白濃度とした。この蛋白溶液をPEG400(Sigma)等を沈殿剤として、常法に従って蒸気拡散法で結晶化を実施した。その結果、図9に示すようなA2a受容体とFab複合体の結晶を得た。

【0227】

次に、得られた結晶に関して、X線回折実験を実施し、2.7程度の解像度の回折データを得た。集めた回折データを分子置換法で解析し、図10に示すような構造であることを明らかにした。

30

【0228】

(7-2) ラット糖トランスポーターの共結晶化

上記(6-1)~(6-8)において、ヒト糖核酸トランスポーターをラット糖トランスポーターに代え、同様の操作を行い、ラット糖トランスポーターとFv複合体のフラクションを得た。次に、上記(7-1)と同様の工程で、ラット糖トランスポーターの結晶化を実施した。その結果、図11に示すようなラット糖トランスポーターとFvフラグメントの複合体の結晶を得た。

【0229】

(7-3) 結果の考察

A2a受容体とラット糖トランスポーターを、それぞれ抗体と結合させることで結晶化することに成功した。このことは、リポソーム-ELISA法を行なうことで、共結晶化に好適な抗体が得られるということを示している。また図10より、A2a受容体のループ部分に抗体が結合していることが示唆された。これは、上記(5-1)の結果と一致していた。

40

【0230】

<結果の考察>

上記の実施例1~7の実験結果から、固相担体と、該固相担体に結合しているリポソームと、該リポソームに埋め込まれている膜蛋白質と、を備え、該膜蛋白質の少なくとも一部が該リポソームの外側表面に露出している、リポソーム/膜蛋白質複合体を、膜蛋白質とともに共結晶化する抗体をスクリーニングする際に使用することができることがわかる。

50

## 【 0 2 3 1 】

そして、得られた抗体は、標的膜蛋白質の天然型の立体構造を特異的に認識する抗体、標的膜蛋白質への結合特異性が高い抗体、標的膜蛋白質への親和性が高い抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の親水性領域を拡大させる抗体、膜蛋白質と抗体を合わせた全体の熱安定性を上昇させる抗体、または、膜蛋白質のループ部分を特異的に認識する抗体であることが実証されている。さらには、得られた抗体を用いて、膜蛋白質の共結晶化に成功している。そのため、上記リポソーム/膜蛋白質複合体を使用すれば、膜蛋白質とともに共結晶化するために好適に使用できる抗体が、公知技術に比べて、極めて効率的に得られると考えられる。同様の理由で、上記のような特性を有している抗体のスクリーニング方法または生産方法が明らかになった。

10

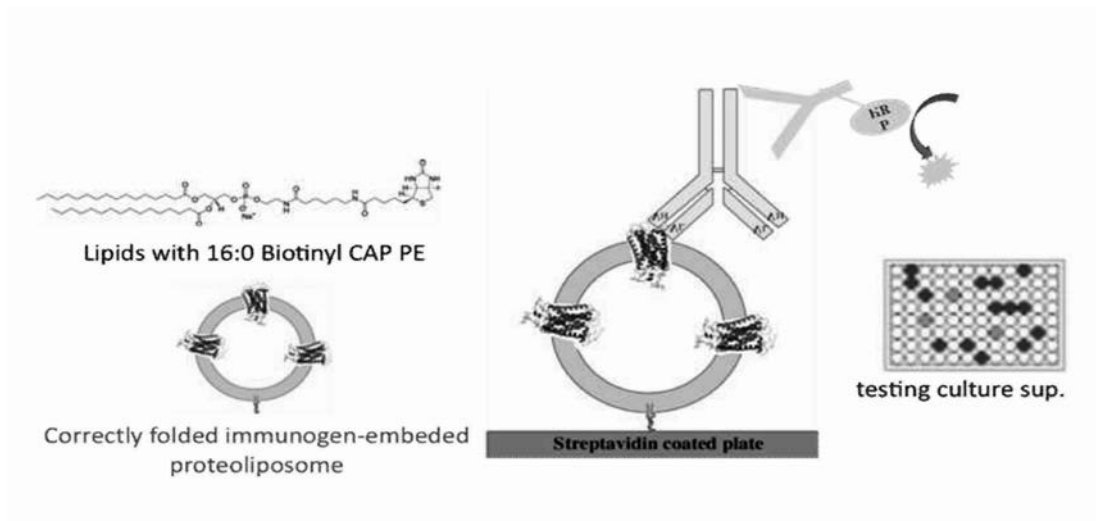
## 【 0 2 3 2 】

加えて、7回膜貫通型であるGPCRと、10回膜貫通型であるヒト糖核酸トランスポーターを用いた実施例に同様の結果が見られたことから、本発明は膜の貫通回数にほとんど影響を受けずに実施できることが示唆される。

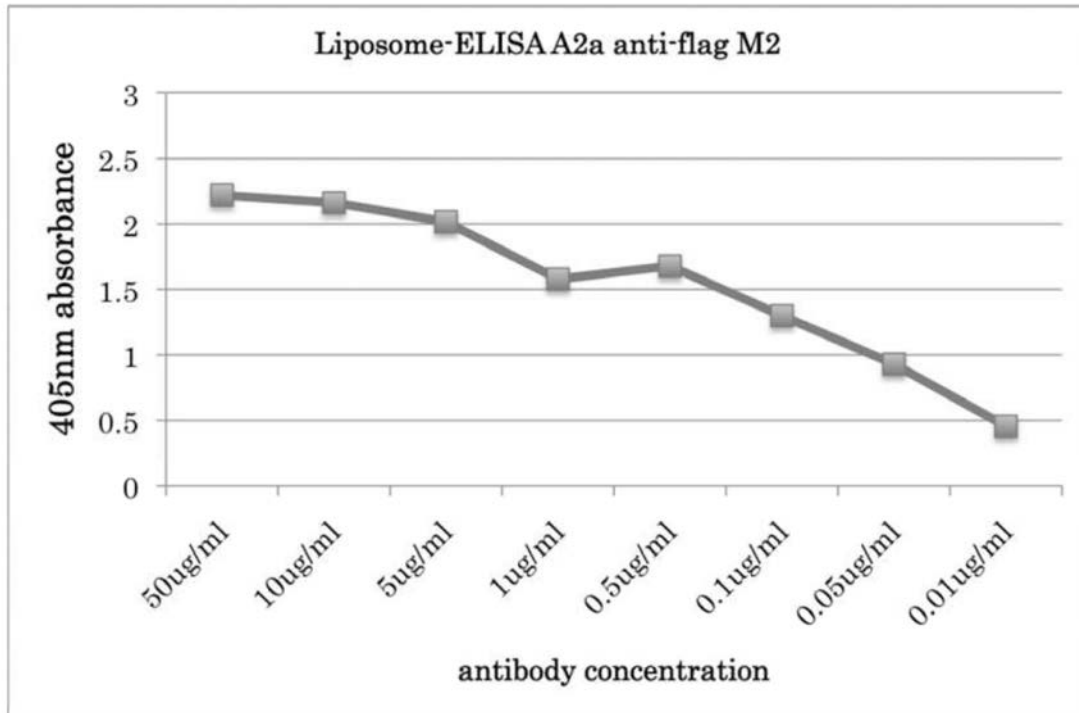
## 【 0 2 3 3 】

以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

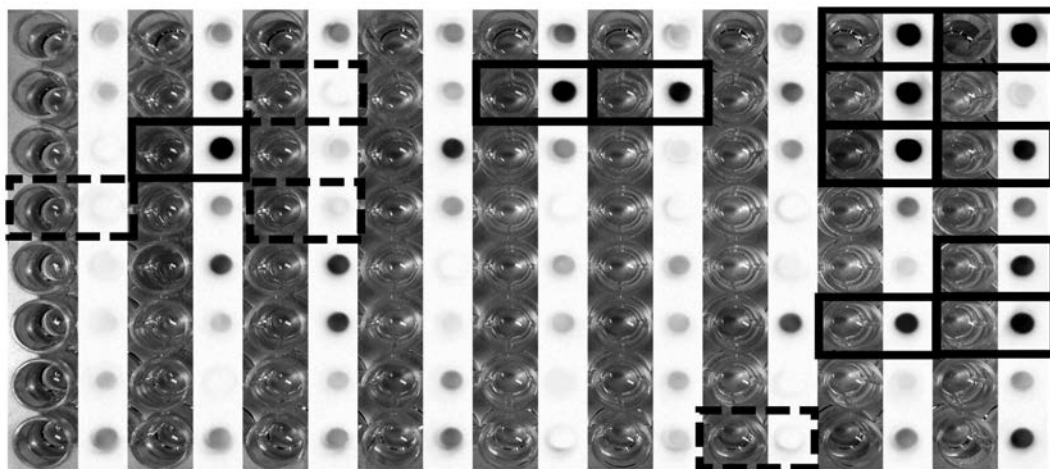
## 【 図 1 】





【 図 2 】



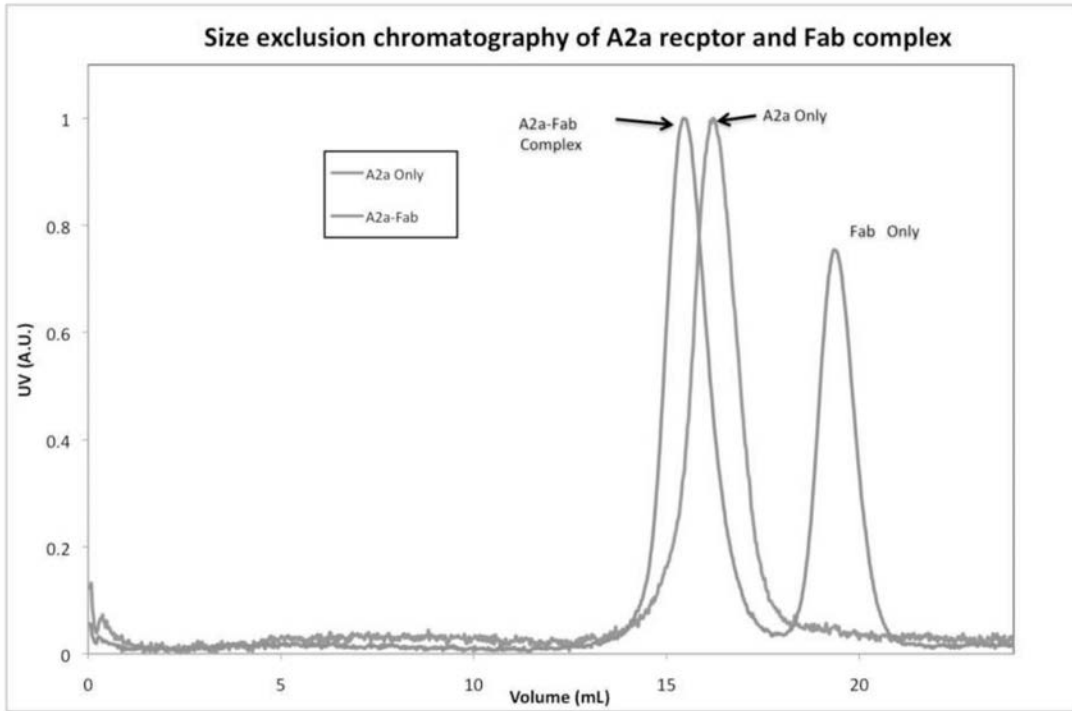
【 図 3 】



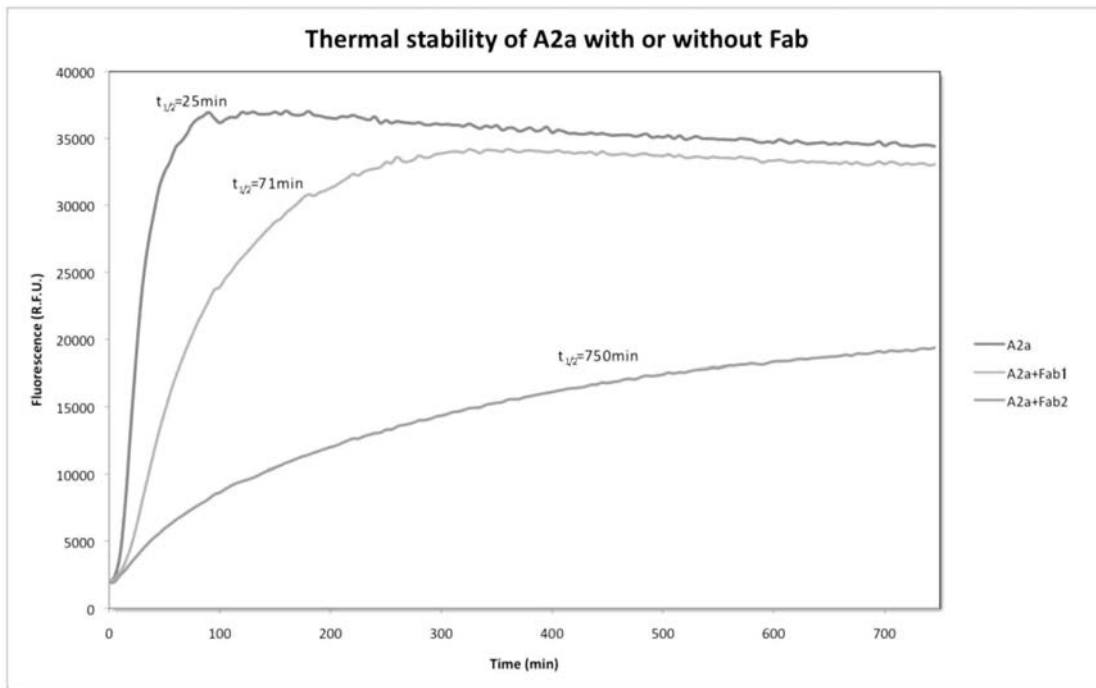
 ELISA + && Dot - = recognize native structure

 ELISA + && Dot + = recognize flexible region

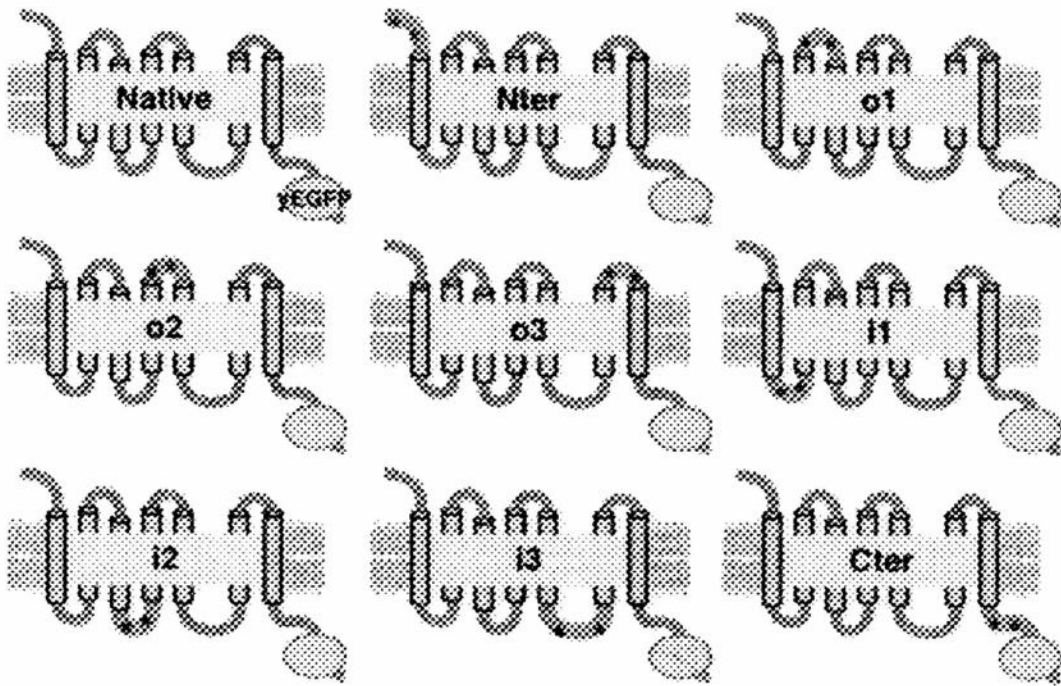
【 4 】



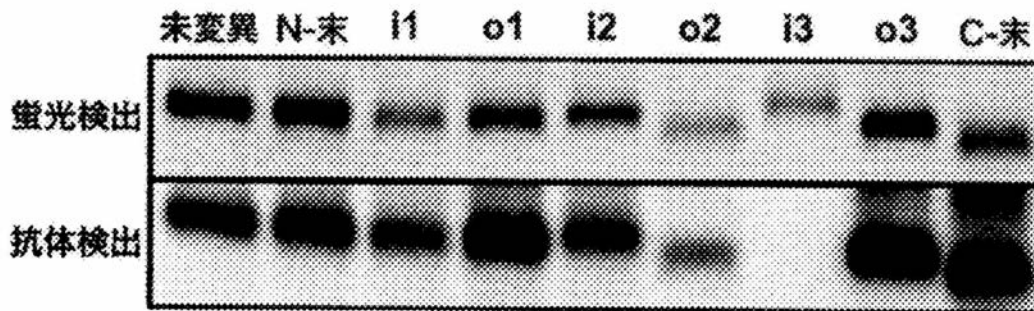
【 5 】



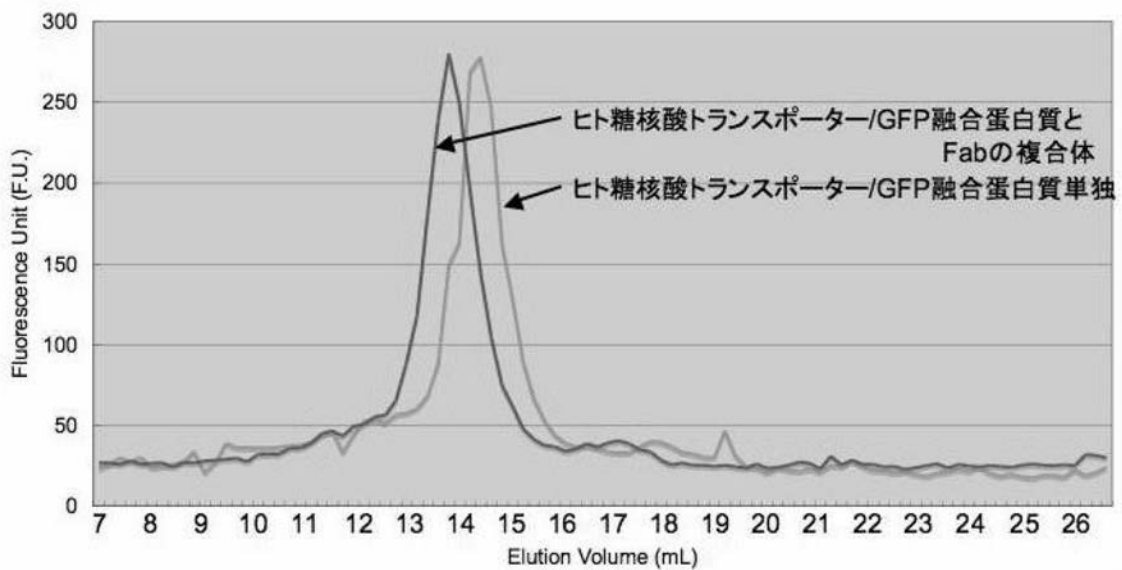
【 図 6 】



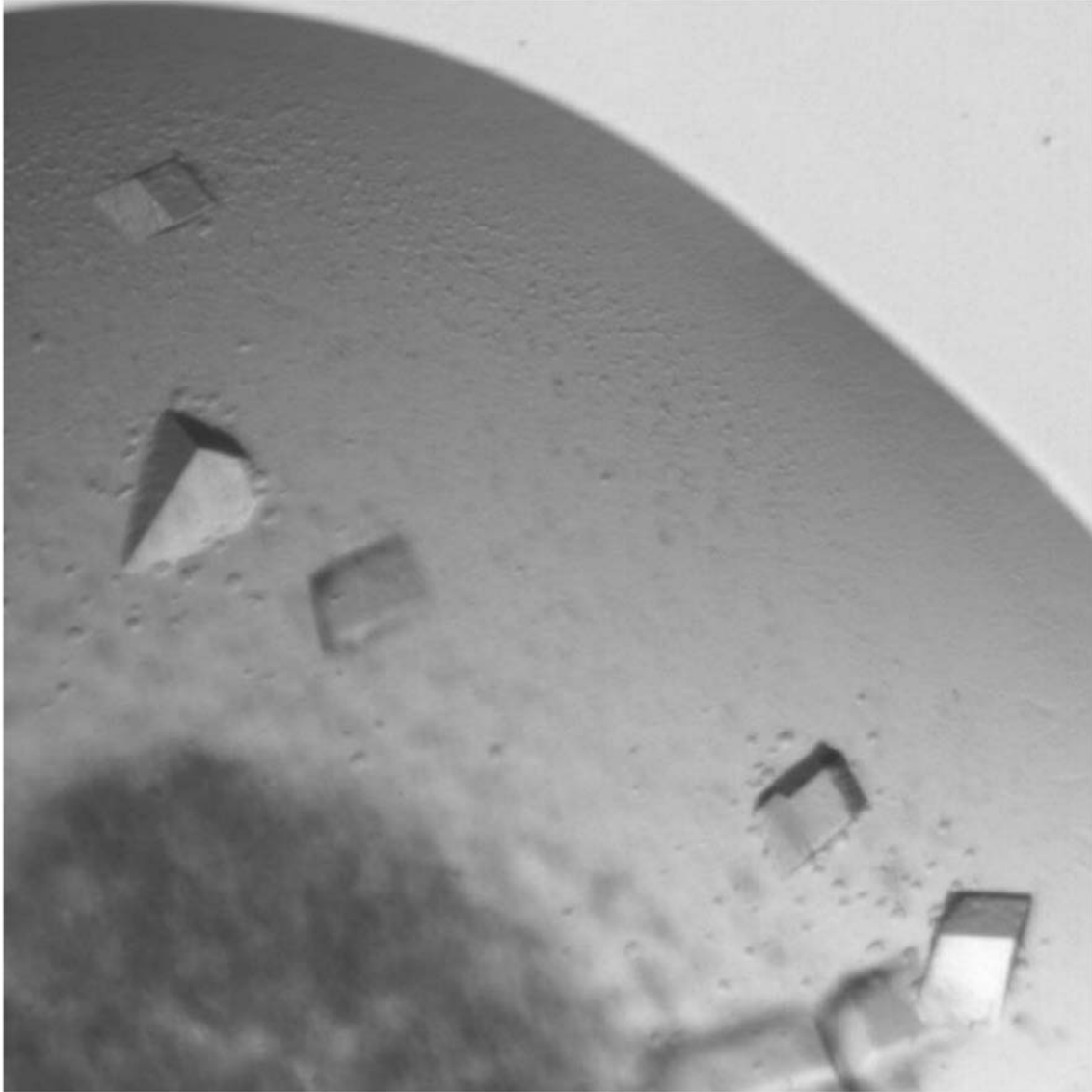
【 図 7 】



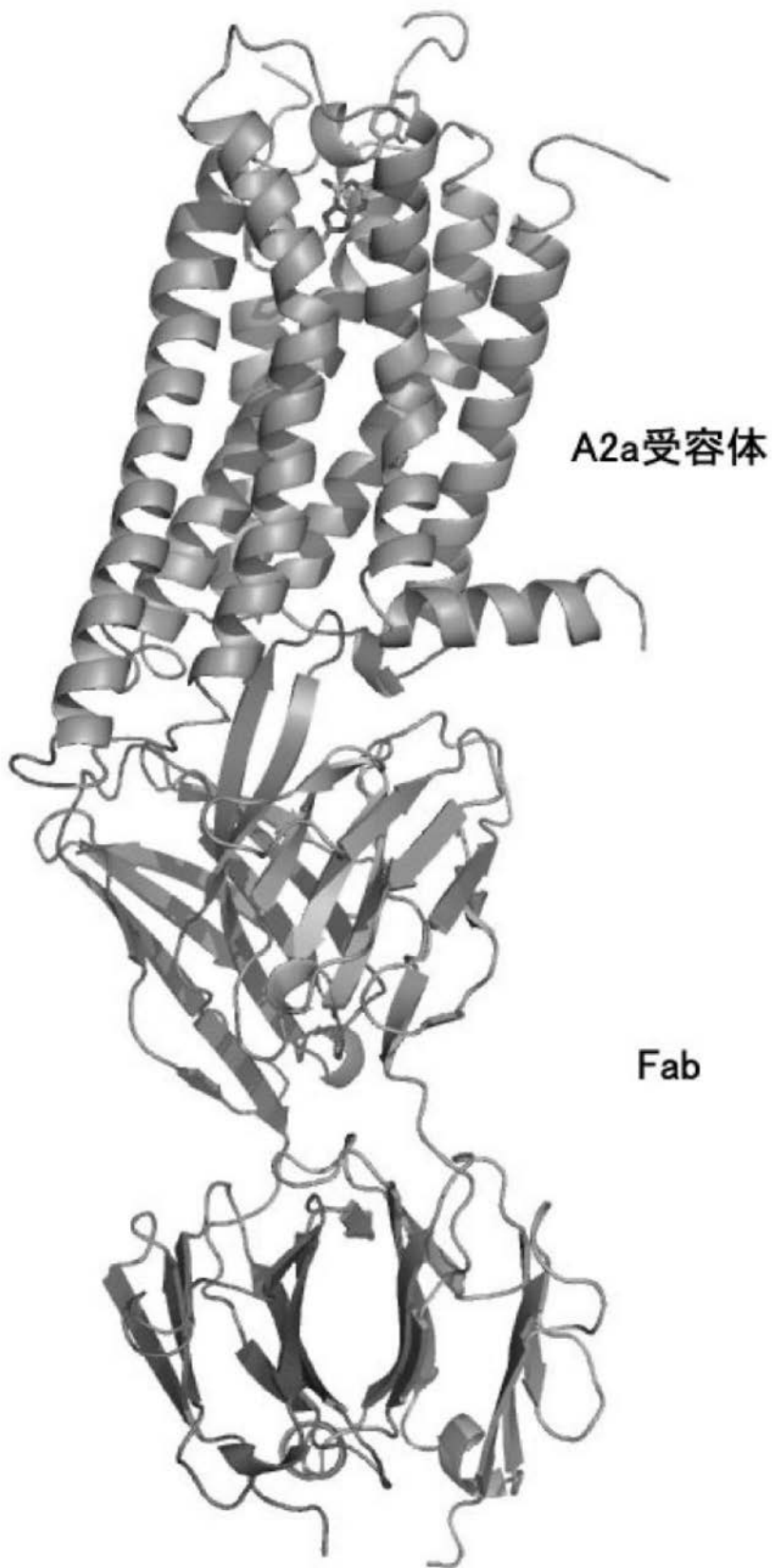
【 図 8 】



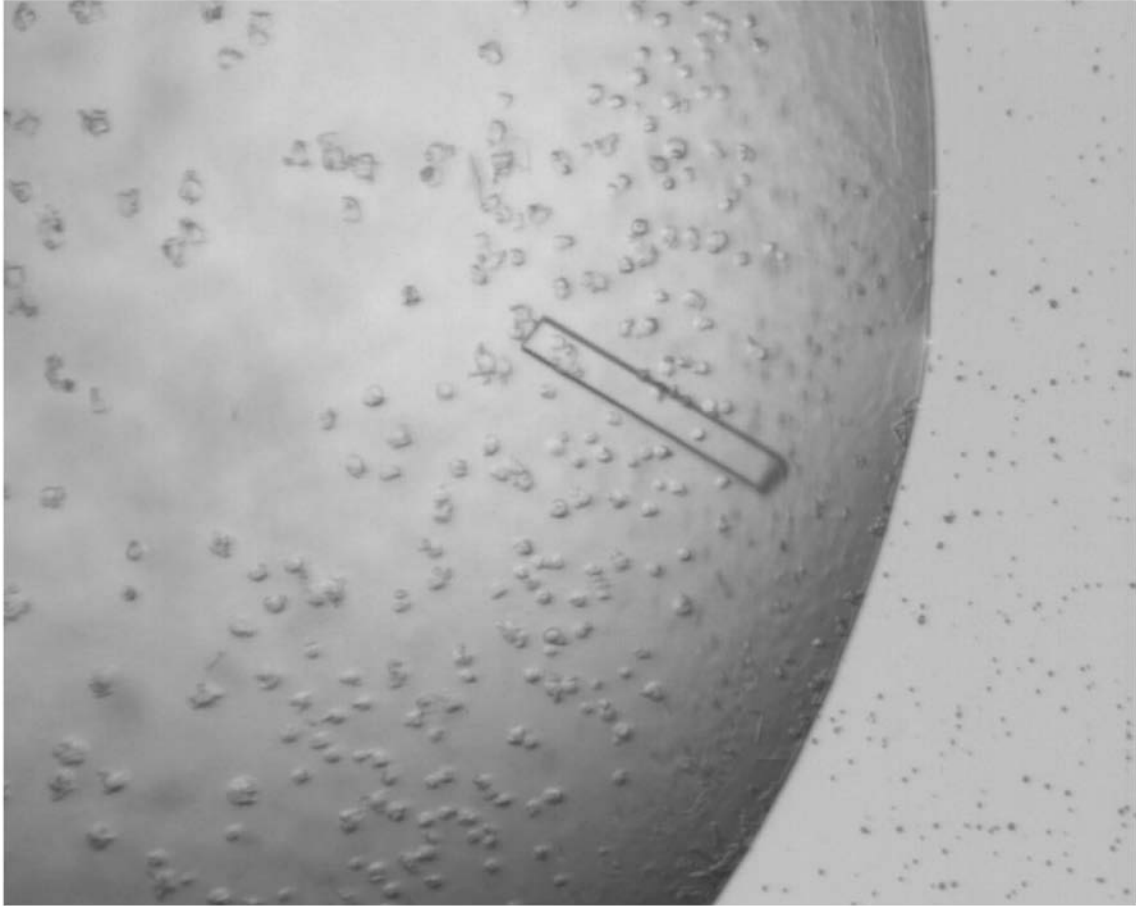
【 図 9 】



【図10】



【図 11】



【配列表】

0005526448000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 荒川 孝俊  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内
- (72)発明者 野村 紀通  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内
- (72)発明者 小林 拓也  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内
- (72)発明者 岩田 想  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 特開2008-280266(JP,A)  
Nature methods. 2007, Vol.4, No.11, p.927-929, supplementary information, supplementary information<<http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n11/extref/nmeth1112-S1.pdf>>  
European journal of biochemistry. 2000, Vol.267, No.5, p.1382-1389  
British journal of pharmacology. 2008, Vol.153, No. Suppl 1, p.S184-S190  
The Journal of biological chemistry. 2009 May(Epub 2009 Mar), Vol.284, No.18, p.12572-12583

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 19/00

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	筛选识别膜蛋白三维结构的单克隆抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5526448B2</a>	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	JP2011511458	申请日	2010-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
[标]发明人	日野智也 村田武士 荒川孝俊 野村紀通 小林拓也 岩田想		
发明人	日野 智也 村田 武士 荒川 孝俊 野村 紀通 小林 拓也 岩田 想		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/15		
CPC分类号	G01N33/5432 C07K16/00 G01N33/6854 G01N2500/00		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/53.Z G01N33/15.Z		
代理人(译)	伊藤裕之		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2009110994 2009-04-30 JP		
其他公开文献	JPWO2010126115A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

确定筛选与膜蛋白共结晶的抗体的方法。一种脂质体/膜蛋白复合物，用于筛选与膜蛋白共结晶的抗体，包括：固相载体，与固相载体结合的脂质体，和包埋在脂质体中的膜包含蛋白质的脂质体/膜蛋白复合物，其中所述膜蛋白的至少一部分暴露在脂质体的外表面上。

