

(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2017-520862

(P2017-520862A)

(43) 公表日 平成29年7月27日 (2017.7.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 6 F 19/16 (2011.01)	G O 6 F 19/16 Z N A	4 B O 6 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 4 O B 40/10 (2006.01)	C 4 O B 40/10	
C 4 O B 40/08 (2006.01)	C 4 O B 40/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-502928 (P2017-502928)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月21日 (2016. 11. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/022780
 (87) 国際公開番号 W02015/148820
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)
 (31) 優先権主張番号 61/971, 388
 (32) 優先日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/993, 783
 (32) 優先日 平成26年5月15日 (2014. 5. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/117, 550
 (32) 優先日 平成27年2月18日 (2015. 2. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596060697
 マサチューセッツ インスティテュート
 オブ テクノロジー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア
 ヴェニュー・77
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

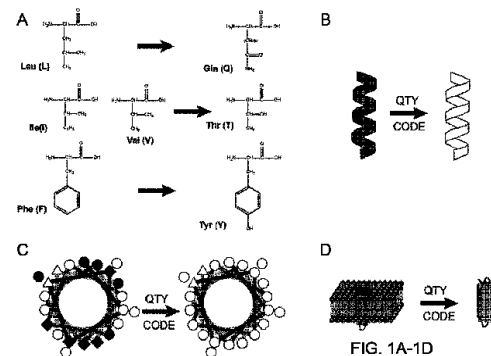
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水溶性膜タンパク質ならびにその調製および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、水溶性膜タンパク質、その調製方法およびその使用方法に関する。特に、本方法は、水不溶性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリンおよびフェニルアラニン）を非イオン性の水溶性アミノ酸（グルタミン、トレオニンおよびチロシン）に変更する「QTY原理」を用いる、GPCR変異体およびテトラスパニン膜タンパク質などの水溶性膜ペプチドのライブラリー的设计方法に関する。本発明は、それを必要とする対象における膜タンパク質の活性により媒介される障害または疾患の治療法であって、前記対象に有効量の本明細書に記載されている水溶性ポリペプチドを投与する工程を含む方法をさらに包含する

【選択図】 図1A～図1D



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 天然膜貫通タンパク質のヘリックス構造を予測して第1の膜貫通領域を同定する工程、

(2) ロイシン(L)、イソロイシン(I)、バリン(V)およびフェニルアラニン(F)からなる群から選択される複数の疎水性アミノ酸を、Q(または代わりとしてNまたはS)、T(または代わりとしてNまたはS)、T(または代わりとしてNまたはS)およびYからなる群から選択される非イオン性の極性アミノ酸でそれぞれ修飾して修飾された第1の膜貫通配列を得る工程、

(3) (2)の前記第1の修飾された膜貫通配列のヘリックス構造の傾向をスコア化して構造スコアを得る工程、

(4) (2)の前記第1の修飾された膜貫通配列の水溶性予測をスコア化して溶解性スコアを得る工程、

(5) 工程(2)~(4)を繰り返して推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体の第1のライブラリーを得る工程、

(6) 前記第1のライブラリー内の推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体のそれぞれの構造スコアおよび溶解性スコアを比較し、好ましくは前記推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体を、前記構造スコアおよび溶解性スコアを用いてランク付けする工程、

(7) 複数の推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体を選択して推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体の第2のライブラリーを得る工程、

(8) 前記タンパク質の第2、第3、第4、第5、第6、第7または好ましくは全ての膜貫通領域のために(1)~(7)を繰り返す工程、

(9) 工程(1)~(8)において修飾されたどの膜貫通領域にも含まれず、かつ前記タンパク質の任意の細胞外または細胞内ドメインを含む前記タンパク質のアミノ酸配列を同定する工程、および

(10) 推定上水溶性である修飾された膜貫通変異体のそれぞれおよび工程(9)で同定されたアミノ酸配列のそれぞれの核酸配列を同定する工程
の全てまたは実質的に全てを含む、水溶性膜貫通タンパク質の設計方法。

【請求項 2】

前記膜貫通タンパク質はGPCRである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

工程(7)の前記推定上水溶性である第1の修飾された膜貫通変異体は、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1からなる群から選択される整数Hである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法により修飾された前記膜貫通領域の合計は、7、6、5、4、3、2または1からなる群から選択される整数nである、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記膜貫通ドメイン内のロイシン(L)の全てまたは実質的に全てがグルタミン(Q)で置換されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記膜貫通ドメイン内のバリン(V)の全てまたは実質的に全てがトレオニン(T)で置換されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記膜貫通ドメイン内のイソロイシン(I)の全てまたは実質的に全てがトレオニン(T)で置換されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記膜貫通ドメイン内のフェニルアラニン(F)の全てまたは実質的に全てがチロシン(Y)で置換されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記膜貫通ドメイン内の内部 L、V、I および / または F の全てまたは実質的に全てが Q、T、T および Y でそれぞれ置換されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記膜貫通ドメイン内の 1 つ以上のイソロイシンは置換されていない、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメイン内の 1 つ以上のフェニルアラニンは置換されていない、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

工程 (7) において選択された前記 1 つ以上の膜貫通ドメインは、L、V、I および F からなる群から選択される 0、1、2 または 3 つの疎水性アミノ酸を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

工程 (4) の前記水溶性スコアは、前記水溶性膜貫通タンパク質の使用条件に必要な水溶性の予測に基づいて選択される、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記水溶性膜貫通タンパク質の前記使用条件は水性リガンド結合アッセイである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記使用条件に必要な水溶性の予測に満たない水溶性スコアを受け取る膜貫通ドメインを廃棄する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

a. 工程 (1) において同定された複数の核酸分子を調製する工程と、
b. 前記天然膜貫通タンパク質の細胞間および細胞外領域をコードする複数の核酸分子を調製する工程と、
c. 工程 a および b の前記核酸分子を含む複数の水溶性膜貫通タンパク質を発現させる工程と、

d. リガンド結合のために、工程 c で産生された前記水溶性膜貫通タンパク質の少なくとも一部をスクリーニングする工程と

をさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

工程 d においてリガンドに結合する少なくとも 1 種の水溶性膜貫通タンパク質を配列決定する工程をさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記水溶性膜貫通タンパク質のリガンド選択性をアッセイする工程をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

Hⁿ は約 2,000,000 未満である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 20】

スクリーニングされる変異体の数は Hⁿ の約 1% 未満である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法によって産生される水溶性膜貫通タンパク質。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法によって選択された 1 つ以上の膜貫通ドメインを含む水溶性膜貫通タンパク質。

【請求項 23】

配列番号 4 ~ 11、13 ~ 20、22 ~ 29、31 ~ 38、40 ~ 47、49 ~ 56 および 58 ~ 64 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

配列番号 4 ~ 11 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載のタンパク質

【請求項 25】

配列番号 13 ~ 20 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23 または請求項 24 に記載のタンパク質。

【請求項 26】

配列番号 22 ~ 29 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23、24 または 25 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 27】

配列番号 31 ~ 38 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23、24、25 または 26 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 28】

配列番号 40 ~ 47 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23、24、25、26 または 27 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 29】

配列番号 49 ~ 56 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23、24、25、26、27 または 28 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 30】

配列番号 58 ~ 64 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 23、24、25、26、27、28 または 29 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 31】

配列番号 3、12、21、30、39、48 および 57 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 23、24、25、26、27、28、29 または 30 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 32】

CXCRL4 リガンドに結合する、請求項 23 ~ 31 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 33】

配列番号 69 ~ 76、78 ~ 85、87、89 ~ 96、98 ~ 105、107 ~ 114 および 116 ~ 123 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 34】

配列番号 69 ~ 76 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33 に記載のタンパク質。

【請求項 35】

配列番号 78 ~ 85 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33 または請求項 34 に記載のタンパク質。

【請求項 36】

配列番号 87 を含む、請求項 33、34 または 35 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 37】

配列番号 89 ~ 96 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33、34、35 または 36 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 38】

配列番号 98 ~ 105 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33、34、35、36 または 37 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 39】

配列番号 107 ~ 114 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33、34、35、36、37 または 38 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 40】

配列番号 116 ~ 123 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 33、34、35、36、37、38 または 39 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 41】

配列番号 68、77、86、88、97、106、115 および 124 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 33、34、35、36、37、38、39 または 40 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 42】

CX3CR1 リガンドに結合する、請求項 33 ~ 41 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 43】

配列番号 128 ~ 135、137 ~ 144、146 ~ 153、155 ~ 162、164 ~ 171、173 および 175 ~ 182 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 44】

配列番号 128 ~ 135 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43 に記載のタンパク質。

【請求項 45】

配列番号 137 ~ 144 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43 または請求項 44 に記載のタンパク質。

【請求項 46】

配列番号 146 ~ 153 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43、44 または 45 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 47】

配列番号 155 ~ 162 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43、44、45 または 46 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 48】

配列番号 164 ~ 171 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43、44、45、46 または 47 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 49】

配列番号 173 を含む、請求項 43、44、45、46、47 または 48 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 50】

配列番号 175 ~ 182 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 43、44、45、46、47、48 または 49 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 51】

配列番号 127、136、145、154、163、172、174 および 183 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 43、44、45、46、47、48、49 または 50 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 52】

CCR3 リガンドに結合する、請求項 43 ~ 51 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 53】

配列番号 187 ~ 194、196 ~ 203、205 ~ 206、208、210 ~ 217、219 ~ 225、227 ~ 234 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、タンパク質。

【請求項 54】

配列番号 187 ~ 194 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53 に記載のタンパク質。

【請求項 55】

配列番号 196 ~ 203 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53 または 54 に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

配列番号 205、206 および 208 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53、54 または 55 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 57】

配列番号 210 ~ 217 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53、54、55 または 56 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 58】

配列番号 219 ~ 225 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53、54、55、56 または 57 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 59】

配列番号 227 ~ 234 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53、54、55、56、57 または 58 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 60】

配列番号 186、195、204、207、209、218、226 および 235 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 53、54、55、56、57、58 または 59 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 61】

CCR5 リガンドに結合する、請求項 53 ~ 60 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 62】

配列番号 236 ~ 243、245 ~ 252、254 ~ 261、263 ~ 270、272、274 ~ 281 および 283 ~ 290 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 63】

配列番号 236 ~ 243 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62 に記載のタンパク質。

【請求項 64】

配列番号 245 ~ 252 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62 または 63 に記載のタンパク質。

【請求項 65】

配列番号 254 ~ 261 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62、63、または 64 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 66】

配列番号 263 ~ 270 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62、63、64 または 65 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 67】

配列番号 272 を含む、請求項 62、63、64、65 または 66 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 68】

配列番号 274 ~ 281 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62、63、64、65、66 または 67 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 69】

配列番号 283 ~ 290 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 62、63、64、65、66、67 または 68 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 70】

配列番号 235、244、253、262、271、273、282 および 291 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 33、34、35、36、37、38、39 または 40 のうちの 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 71】

CXC3 リガンドに結合する、請求項 62 ~ 70 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

配列番号 2、67、126、185、327、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311、313、315、317、319、321、323 または 325 のいずれか 1 つに記載されている 1 つ以上の膜貫通ドメインを含むタンパク質。

【請求項 7 3】

前記タンパク質は水溶性であり、かつ相同な天然膜貫通タンパク質のリガンドに結合する、請求項 7 2 に記載のタンパク質。

【請求項 7 4】

請求項 1 ~ 2 0 に記載の方法の 1 つ以上を含む、コンピュータシステム上で実行されるコンピュータ実装方法。

10

【請求項 7 5】

コンピュータシステムに実行させると前記コンピュータシステムに請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法を実行させるコンピュータ実行可能命令が記憶されている非一時的コンピュータ可読媒体を備えるコンピュータシステム。

【請求項 7 6】

コンピュータシステムに実行させると前記コンピュータシステムに請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法を実行させるコンピュータ実行可能命令が記憶されている非一時的コンピュータ可読媒体。

【請求項 7 7】

20

a . メモリと、

b . 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法を実行させるように構成された、前記メモリに接続された少なくとも 1 つプロセッサとを備えるコンピュータシステム。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願)

本出願は、2014 年 3 月 27 日に提出された米国仮出願 No . 61 / 971 , 388 号に関する。この出願の教示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】**【0002】**

膜タンパク質は全ての生体系において重量な役割を担っている。配列決定されているゲノムのほぼ全てにおける全ての遺伝子のおよそ約 30 % が膜タンパク質をコードしている。しかし、本発明者らのそれらの構造および機能の詳細な理解は可溶性タンパク質の理解よりも大きく後れを取っている。2015 年 3 月の時点で、タンパク質構造データバンク ([http : / / www . r c s b . o r g / p d b / h o m e / h o m e . d o](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) には 100 , 000 種を超える構造が登録されている。しかし、28 種の G タンパク質共役受容体を含み、かつテトラスパニン膜タンパク質を含まない 530 種の固有の構造を有する 945 種の膜タンパク質構造しか登録されていない。 [http : / / b l a n c o . b i o m o l . u c i . e d u / m p s t r u c /](http://blanco.biomed.ucsf.edu/mpstruc/)

40

【0003】

膜受容体は非常に重要であるが、膜受容体の構造および機能ならびにそれらの認識およびリガンド結合特性を解明するにはいくつかの障害がある。最も重大かつ困難な課題は、ミリグラム量の可溶かつ安定な受容体を産生することが極めて難しいという点にある。安価な大規模産生方法が切実に求められており、従って、広範囲な研究の焦点となっている。これらの先行する障害を克服した場合にのみ詳細な構造研究を行うことができる。

【0004】

Zhang ら (米国特許第 8 , 637 , 452 号) (参照により本明細書に組み込まれる) は、膜貫通領域内に位置する特定の疎水性アミノ酸が極性アミノ酸によって置換され

50

た水溶性GPCRのための改良された方法について記載している。しかし、この方法は大きな労働力を要する。さらに、その修飾された膜貫通領域は水溶性判断基準を満たしているが、水溶性およびリガンド結合の改善が望まれている。従って、当該技術分野において、Gタンパク質共役受容体の改良された研究方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、水溶性膜タンパク質およびペプチドの設計、選択および/または産生方法、そこから設計、選択または産生されたペプチド（および膜貫通ドメイン）、前記ペプチドを含む組成物ならびにその使用方法に関する。特に、本方法は、水不溶性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリンおよびフェニルアラニンまたは単純な文字コードL、I、V、F）を非イオン性の水溶性アミノ酸（グルタミン、トレオニンおよびチロシンまたは単純な文字コードQ、T、Y）に変更する「QTY原理」を用いる、GPCR変異体およびテトラスパニン膜タンパク質などの水溶性膜ペプチドのライブラリーの設計方法に関する。さらに、F以外のL、IおよびVの置換のために2種類のさらなる非イオン性アミノ酸アスパラギン（N）およびセリン（S）を使用してもよい。以下で考察する実施形態では、アスパラギン（N）およびセリン（S）は、QおよびT（変異体として記載されている）あるいはL、IまたはV（天然タンパク質として記載されている）のために置換可能なものとして想定されていると理解されるべきである。但し簡潔性のために、本出願ではこれらの他の実施形態について明確に述べない。

10

20

【0006】

本発明は、修飾された、合成および/または天然に生じない1つ以上のヘリックスドメインおよびそのような修飾された1つ以上のヘリックスドメインを含む水溶性ポリペプチド（例えば、「sGPCR」）を包含し、ここでは、修飾された1つ以上のヘリックスドメインは、天然膜タンパク質のヘリックスドメイン内の複数の疎水性アミノ酸残基（L、I、V、F）が非イオン性の親水性アミノ酸残基（それぞれQ、T、Yまたは「Q、T、Y」）および/またはNおよびSで置換されているアミノ酸配列を含む。本発明は、天然膜タンパク質の1つ以上のヘリックスドメイン内の複数の疎水性アミノ酸残基（L、I、V、F）を非イオン性の親水性アミノ酸残基（Q、T、Y）で置換する工程を含む水溶性ポリペプチドの調製方法も包含する。本発明は、天然膜タンパク質のヘリックスドメイン内の複数の疎水性アミノ酸残基（L、I、V、F）を非イオン性の親水性アミノ酸残基（それぞれQ、T、Y）で置換して調製されたポリペプチドをさらに包含する。その変異体は、親すなわち天然タンパク質（例えば、CXCR4）の後に略語「QTY」が続く名前（例えば、CXCR4-QTY）によって特徴づけることができる。

30

【0007】

本発明は、それを必要とする対象における膜タンパク質の活性により媒介される障害または疾患の治療法であって、前記対象に有効量の本明細書に記載されている水溶性ポリペプチドを投与する工程を含む方法をさらに包含する。

【0008】

特定の実施形態では、当該水溶性ポリペプチドは当該膜タンパク質のリガンド結合活性を保持する。本発明の水溶性ペプチドを投与することによって治療することができる障害および疾患の例としては、限定されるものではないが、癌（例えば、小細胞肺癌、黒色腫、トリプルネガティブ乳癌）、パーキンソン病、心血管疾患、高血圧症および気管支喘息が挙げられる。

40

【0009】

本発明は、本発明の水溶性ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体または希釈液を含む医薬組成物も包含する。

【0010】

いくつかの態様では、当該ヘリックスドメインは、Gタンパク質共役受容体（GPCR）である天然膜タンパク質内の7つの膜貫通ヘリックスドメインのうちの1つである。本実施形態のいくつかの態様では、当該GPCRは、プリン受容体（P2Y₁、P2Y

50

₂、P2Y₄、P2Y₆）、M₁およびM₃ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンピン受容体〔プロテアーゼ活性化受容体（PAR）- 1、PAR - 2〕、トロンボキサン（TXA₂）、スフィンゴシン1 - リン酸（S1P₂、S1P₃、S1P₄およびS1P₅）、リゾホスファチジン酸（LPA₁、LPA₂、LPA₃）、アンジオテンシンII（AT₁）、セロトニン（5-HT_{2c}および5-HT₄）、ソマトスタチン（sst₅）、エンドセリン（ET_AおよびET_B）、コレシストキニン（CKK₁）、V_{1a}バソプレシン受容体、D₅ドーパミン受容体、fMLPホルミルペプチド受容体、GAL₂ガラニン受容体、EP₃プロスタノイド受容体、A₁アデノシン受容体、₁アドレナリン作動性受容体、BB₂ボンベシン受容体、B₂ブラジキニン受容体、カルシウム感知受容体、ケモカイン受容体、KSHV - ORF74ケモカイン受容体、NK₁タキキニン受容体、甲状腺刺激ホルモン（TSH）受容体、プロテアーゼ活性化受容体、神経ペプチド受容体、アデノシンA_{2B}受容体、P2Yプリン受容体、代謝性グルタミン酸受容体、GRK5、GPCR - 30およびCXCR4を含む群から選択される。なおさらなる実施形態では、当該天然膜タンパク質または膜タンパク質は必須膜タンパク質である。さらなる態様では、当該天然膜タンパク質は哺乳類のタンパク質である。本発明のタンパク質は好ましくはヒトのタンパク質である。簡潔にするために、具体的なGPCRタンパク質（例えば、CXCR4）の言及は、一般には哺乳類および選択的には具体的にヒトの両方を指すものとする。他の実施形態では、当該ヘリックスドメインは、文献内のどこかに記載されているように、リガンド結合を改善また変更するために例えば細胞外または細胞内ループにおいて修飾されたGタンパク質共役受容体（GPCR）変異体内の7つの膜貫通ヘリックスドメインのうちの1つである。本発明の目的のために、「天然」という言葉は、本明細書に記載されている方法に従って水可溶化する前のタンパク質（またはヘリックスドメイン）を指すものとする。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明の別の態様では、当該膜タンパク質は、4つの膜貫通ヘリックスを特徴とするテトラスパニン膜タンパク質であってもよい。およそ54種のヒトのテトラスパニン膜タンパク質が見直され、かつ注釈付けされている。多くは、細胞発生、活性化、増殖および運動性の制御において重要な役割を担う細胞間シグナル伝達イベントを媒介することが知られている。例えば、CD81受容体は、C型肝炎ウイルス侵入およびマラリア原虫感染のための受容体として重要な役割を担う。CD81遺伝子は癌抑制遺伝子領域に局在しており、癌悪性腫瘍を媒介するための候補になり得る。CD151は、細胞運動性、浸潤および癌細胞の転移の増加に関与している。CD63の発現は卵巣癌の侵襲性と相関している。テトラスパニン膜タンパク質の特徴は、第2すなわち大きな細胞外ループ内のシステイン - システイン - グリシンモチーフである。

【0012】

当該親水性残基（これは天然膜タンパク質のヘリックスドメイン内の1つ以上の疎水性残基を置換する）は、グルタミン（Q）、トレオニン（T）、チロシン（Y）およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。さらなる態様では、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、バリン（V）およびフェニルアラニン（F）から選択される疎水性残基は置換されている。具体的には、当該タンパク質のヘリックスドメインのフェニルアラニン残基はチロシンで置換されており、当該タンパク質のヘリックスドメインのイソロイシンおよび/またはバリン残基はトレオニンで置換されており、かつ/または当該タンパク質のヘリックスドメインのロイシン残基はグルタミンで置換されている。

【0013】

本発明の好ましい水溶性ポリペプチドは、野生型または天然膜タンパク質に正常に結合するリガンドに結合する能力を有する。好ましい実施形態では、天然膜タンパク質のリガンド結合部位候補内のアミノ酸は置換されておらず、かつ/または当該天然膜タンパク質の細胞外および/または細胞内ドメインの配列は同一である。

【0014】

なおさらなる実施形態では、本発明は、修飾されたヘリックスドメインを含む水溶性

ペプチドが形質移入された細胞を包含する。特定の実施形態では、当該細胞は、動物細胞（例えば、哺乳類、昆虫、鳥類、魚、爬虫類、両生類またはその他の細胞）、酵母または細菌細胞である。

【0015】

本発明は、本明細書に記載されている方法（またはその工程）のうちの1つ以上を含む、コンピュータシステム上で実行されるコンピュータ実装方法も含む。コンピュータシステムによって実行されるとコンピュータシステムに本方法を実行させるコンピュータ実行可能命令が記憶された非一時的コンピュータ可読媒体を備えたコンピュータシステム、およびコンピュータシステムによって実行されるとコンピュータシステムに本方法を実行させるコンピュータ実行可能命令が記憶された非一時的コンピュータ可読媒体も想定される。さらに、メモリと、メモリに接続された、本明細書に記載されている方法を実行するように構成された少なくとも1つプロセッサとを備えるコンピュータシステムが想定される。

10

【0016】

本発明の上記および他の目的、特徴および利点は、異なる図面を通して同様の符号が同じ部分を指している添付の図面に示す本発明の好ましい実施形態の以下のより詳細な説明から明らかになるであろう。これらの図面は必ずしも縮尺どおりではなく、その代わり、本発明の原理を示すことに重点を置いている。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～図1Dは、疎水性アミノ酸L、I、VおよびFをそれぞれQ、T、T、Yに体系的に置換するQTYコードの一般的な例示である。（図1A）アミノ酸であるロイシンおよびグルタミンの分子形状は類似しており、同様に、イソロイシンおよびバリンの分子形状はトレオニンと類似しており、フェニルアラニンおよびチロシンの分子形状は類似している。ロイシン、イソロイシン、バリンおよびフェニルアラニンは疎水性であり、水分子と結合することができない。対照的に、グルタミンは4つの水分子、すなわち2つの水素ドナーおよび2つの水素アクセプターと結合することができ、トレオニンおよびチロシン上の-OH基は3つの水分子、すなわち1つの水素ドナーおよび2つのアクセプターに結合することができる。図1Bはヘリックスの側面図である。体系的なアミノ酸変化のQTYコードを適用した後、ヘリックスは水溶性になる。（図1C）ヘリックスの上面図。左側のヘリックスは、主として疎水性アミノ酸を有する天然膜ヘリックスであり、右側のヘリックスはQTYコードを適用した後のものである。このヘリックスはこの時点で最も親水性のアミノ酸を有する。（図1D）QTYコード前は、当該GPCR膜タンパク質はそれらが脂質膜内に埋め込まれるように疎水性脂質分子に取り囲まれている（左のパネル）。QTYコードを適用した後、当該GPCR膜タンパク質は水溶性になり、安定化のためにそれを取り囲む界面活性剤をもはや必要としない。

20

30

【図2】CXCR4の膜貫通ドメイン領域のTMHMM予測である。識別可能な7つの疎水性膜貫通セグメントが存在する。

【図3】CXCR4の完全に修飾されたTM1ドメインの予測されるヘリックス車輪構造を示す。天然のヘリックス（左のパネル）およびQTYコードで修飾されたヘリックス（右のパネル）。

40

【図4】CXCR4のTMHMMプログラム出力の例示である。もはや目に見える識別可能な7つの疎水性膜貫通セグメントは存在しない。

【図5】野生型タンパク質およびCXCR4、CXCR3、CCR3およびCCR5のそれぞれのQTY変異体の配列アラインメントである。QTYコードは、7つの疎水性膜貫通セグメントにのみ適用され、細胞外および細胞内セグメントには適用されない。

【図6】野生型タンパク質およびCXCR4、CXCR3、CCR3およびCCR5のそれぞれのQTY変異体の配列アラインメントである。QTYコードは、7つの疎水性膜貫通セグメントにのみ適用され、細胞外および細胞内セグメントには適用されない。

【図7】野生型タンパク質およびCXCR4、CXCR3、CCR3およびCCR5のそれぞれのQTY変異体の配列アラインメントである。QTYコードは、7つの疎水性膜貫

50

通セグメントにのみ適用され、細胞外および細胞内セグメントには適用されない。

【図 8】野生型タンパク質および C X C R 4、C X C R 3、C C R 3 および C C R 5 のそれぞれの Q T Y 変異体の配列アラインメントである。Q T Y コードは、7 つの疎水性膜貫通セグメントにのみ適用され、細胞外および細胞内セグメントには適用されない。

【図 9】本方法のフローチャートである。

【図 10】本発明のコンピュータシステムの例示である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の好ましい実施形態の説明は以下のとおりである。

【0019】

「1 つ（種）（a）の」または「1 つ（種）（a n）の」という言葉は、特に定めがない限り 1 つ（種）以上を包含するものとする。

【0020】

いくつかの態様では、本発明は、天然タンパク質の 7 つの膜貫通ヘリックスの疎水性残基であるロイシン（L）、イソロイシン（I）、バリン（V）およびフェニルアラニン（F）を親水性残基であるグルタミン（Q）、トレオニン（T）およびチロシン（Y）に変えるための Q T Y（グルタミン、トレオニンおよびチロシン）置換（すなわち「コード」）方法（または「原理」）、あるいは、上記のように L、I および / または V のためのアスパラギン（N）およびセリン（S）の使用に関する。本発明は、水不溶性の天然膜タンパク質を水溶性の対応物に変換することができる。

【0021】

本発明は水溶性ペプチドの設計方法を含む。第一にヒト C C R 3、C C R 5、C X C R 4 および C X 3 C R 1 を具体的な例として、G P C R タンパク質に関して本方法を説明する。

【0022】

G P C R は典型的に 7 つの膜貫通ヘリックス（7 つの T M）および 8 つのループを有する。これらの膜貫通セグメントを T M 1、T M 2、T M 3、T M 4、T M 5、T M 6 および T M 7 と称してもよい。8 つの非膜貫通ループは、4 つの細胞外のループ E L 1、E L 2、E L 3、E L 4 および 4 つの細胞内ループ I L 1、I L 2、I L 3、I L 4、従って全部で 8 つのループに分けられる。従って、本発明者らは G P C R タンパク質を膜貫通および非膜貫通特徴に基づいて 15 個の断片に分けることができる。

【0023】

大まかには、本方法は、

（1）タンパク質のヘリックス構造を予測して第 1 の膜貫通領域を同定する工程、

（2）本明細書に定義されている Q T Y コードにより複数の疎水性アミノ酸を修飾して、修飾された第 1 の膜貫通配列を得る工程、

（3）（2）の第 1 の修飾された膜貫通配列のヘリックス構造の傾向をスコア化して構造スコアを得る工程、

（4）（2）の第 1 の修飾された膜貫通配列の水溶性予測をスコア化して溶解性スコアを得る工程、

（5）（2）～（4）を繰り返して推定上水溶性である第 1 の修飾された膜貫通変異体の第 1 のライブラリーを得る工程、

（6）第 1 のライブラリー内の推定上水溶性である第 1 の修飾された膜貫通変異体のそれぞれの構造スコアおよび溶解性スコアを比較し、好ましくは前記構造スコアおよび溶解性スコアを用いて推定上水溶性である第 1 の修飾された膜貫通変異体をランク付けする工程、

（7）複数の推定上水溶性である第 1 の修飾された膜貫通変異体（ここで、複数とは整数 H または好ましくは 10、9、8、7、6、5 または 4 未満である）を選択して、推定上水溶性である第 1 の修飾された膜貫通変異体の第 2 のライブラリーを得る工程、

（8）当該タンパク質の第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7 または好ましくは全ての

10

20

30

40

50

膜貫通領域のために工程(1)～(7)を繰り返す工程(本方法によって修飾された膜貫通領域の合計は整数nである)、

(9)工程(1)～(8)において修飾されたいずれかの膜貫通領域に含まれておらず、かつ当該タンパク質の任意の細胞外または細胞内ドメインを含むタンパク質のアミノ酸配列を同定する工程、

(10)推定上水溶性である修飾された膜貫通変異体および工程(9)で同定されたアミノ酸配列のそれぞれの核酸配列を同定する工程

のうちの全てまたは実質的に全てを含む。

【0024】

上記方法において同定された核酸配列を用いて、推定上水溶性である修飾された膜貫通変異体のそれぞれおよび非膜貫通ドメイン(細胞外および細胞内ドメインを含む)のそれぞれの核酸配列を生成し、かつ組み合わせ的に発現させて、最大 H^n 種の推定上水溶性であるタンパク質変異体のライブラリーを設計することができる。例えば、 H が8であり、かつ n が7である場合、およそ2百万種の水溶性タンパク質変異体のライブラリーを設計することができる。

【0025】

本方法は、ヘリックスを形成する傾向および水溶性予測を含むドメインの「スコア化」を行う。当業者であれば分かるように、異なる配列を有するドメインは恐らく、ヘリックス形成のための異なる水溶性および傾向を予測する。特定の予測される水溶性または水溶性範囲、ヘリックス構造を形成する傾向または傾向範囲に対して「スコア」を割り当てる。このスコアは定性的(0、1)であってもよく、ここで0は、例えば許容されない予測される水溶性を有するドメインを表すことができ、1は、例えば許容される予測される水溶性を有するドメインを表すことができる。あるいは、例えば水溶性の程度の増加を特徴として確立される1～10の尺度で、このスコアを評価することができる。あるいは、このスコアは mg/ml の単位で予測される溶解性を記述するなど、定量的であってもよい。各ドメインに対してスコアを評価したら、それらスコアのうちの1つまたは好ましくは両方によってドメイン変異体を容易に比較(またはランク付け)して、どちらも水溶性であり、かつヘリックスを形成する可能性の高いドメイン変異体を選択することができる。

【0026】

好ましい実施形態では、当該膜貫通領域の設計方法を図9に記載されている方法を用いてコンピュータシステム上で行う。

【0027】

段階的説明

1:工程1では、コンピュータシステムのコンピュータインタフェースは、タンパク質配列を受け取り、分析のために選択し、かつ入力されるタンパク質(例えば、その配列)を記述しているデータをコンピュータシステムのコンピュータインタフェースを介してアップロードまたは入力する。入力されるデータは、タンパク質名、データベース参照またはタンパク質配列であってもよい。例えば、当該タンパク質配列はコンピュータインタフェースを介してアップロードすることができる。

【0028】

2:工程2では、その名前または配列を含む当該タンパク質に関するさらなるデータを同定、決定、取得および/または入力することができ、かつコンピュータインタフェースを介して入力することができる。タンパク質データを得るための1つのソースは、UniProtという名称のデータベース(<http://www.uniprot.org/>)である。あるいは、本発明の方法は、この工程におけるユーザによる後の検索のために、当該タンパク質または当該タンパク質に関連する配列に関するデータを記憶することができる。実施形態では、当該プログラムは、ユーザに分析のために選択されたタンパク質に関するさらなるデータ(例えば、配列データ)を検索するためのデータベースまたはファイルを選択することを促すことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

3：工程3では、ユーザは、膜貫通領域を同定するデータを入力、アップロードまたは取得することができる。例えば、ユーザにUniProtなどの公開情報源からデータを取得するように促すことができる。その情報を工程5で使用するためにそのデータベースから収集することができる。

【 0 0 3 0 】

4：代わりまたは追加として、当該膜貫通領域は本方法によって予測することができる。膜貫通領域は一般にヘリックス構造を特徴とする。生物学的配列センター(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)によって開発されたTMHMM2.0という名称のソフトウェアパッケージ(隠れマルコフモデルを用いる膜貫通予測)を用いて、膜貫通ヘリックス予測を行うことができる。このソフトウェアの最新版は、ピーク探索に関して若干の問題を有しており、GPCRのための7つのTM領域の発見に失敗する場合がある。従って、好ましい実施形態では、当該コンピュータシステムによって実行されるピーク探索法に動的ベースラインが導入されたこのプログラムの修正版を使用する。ここでは、最初のベースライン値を用いて7つのTM領域が見つからない場合、ベースラインをより低い値に変更することができる。例えば、デフォルトベースラインは0.2である。7番目の膜貫通領域を同定するために、ベースライン値を0.1に設定することができる。8つ以上のTM領域が見つかった場合、ベースラインを0.15などのより高い値に変更することができる。例えば、CCR-2のアミノ酸配列をTMHMM2.0ソフトウェアに供した場合、6つの膜貫通領域のみが最初に同定された。TMHMM2.0のベースライン値を0.07に設定すると、7つの膜貫通領域が同定された。

【 0 0 3 1 】

5：当該形式(図5)でTMデータを同定した後、工程5においてGPCRの配列をTM領域情報に従って合計15個の断片[7つの膜貫通セグメント(図5A)および8つの非膜貫通セグメント(図5B)]に分ける。従って、典型的なGPCRのそれぞれに対して7つのTMおよび8つのNTM断片が存在しなければならない。

【 0 0 3 2 】

当然ながら、本システムは、ユーザによる入力のためにコンピュータインタフェースを用いて上記工程のうちの1つ以上、例えば全てを実行することができる。

【 0 0 3 3 】

変異のために第1の膜貫通領域(典型的には、必須ではないが、当該タンパク質のN末端に最も近位の膜貫通領域)を選択する。次いで、疎水性アミノ酸(L、I、VおよびF)を対応する親水性アミノ酸(Q、TまたはY)で置換する。当然ながら、この場合このアミノ酸は実際には当該タンパク質の中に置換されていない。むしろ、このアミノ酸指定はモデリング用の配列において置換されている。従って、「配列」という用語は「配列データ」を含むものとする。典型的には、疎水性アミノ酸の大部分または全てを置換のために選択する。全てに満たないアミノ酸を選択した場合、当該膜貫通領域の1つ以上のNおよび/またはC末端アミノ酸を疎水性のままにして内部疎水性アミノ酸を選択することが望ましい場合がある。追加または代わりとして、膜貫通領域内のロイシン(L)の全てを置換するように選択することが望ましい場合がある。追加または代わりとして、膜貫通領域内のイソロイシン(I)を全て選択して置換することが望ましい場合がある。追加または代わりとして、膜貫通領域内のバリン(V)を全て選択して置換することが望ましい場合がある。追加または代わりとして、膜貫通領域内のフェニルアラニン(F)を全て選択して置換することが望ましい場合がある。追加または代わりとして、膜貫通領域内の1つ以上のフェニルアラニンを保持すると有利になり得る。追加または代わりとして、膜貫通領域内の1つ以上のバリンを保持すると有利になり得る。追加または代わりとして、膜貫通領域内の1つ以上のロイシンを保持すると有利になり得る。追加または代わりとして、膜貫通領域内の1つ以上のイソロイシンを保持すると有利になり得る。追加または代わりとして、その野生型配列が3つ以上の連続する疎水性アミノ酸を特徴とする膜貫通領域内

の1つ以上の疎水性アミノ酸を保持すると有利になり得る。次いで、そのように設計した膜貫通領域（膜貫通変異体すなわち「変異体」）を、本明細書に記載されているように膜貫通領域予測プロセスに供する。次いで、この変異体をその配列のヘリックスを形成する傾向のスコアについて評価する。この変異体を、本明細書に記載されているように水溶性予測プロセスにも供する。この変異体をその配列の水溶性である傾向のスコアについて評価する。当然ながら、全ての濃度における完全な水溶性は大部分の商業目的には必要ではない。水溶性は、好ましくは予測される使用条件（例えば、リガンド結合アッセイ）における機能性に必要なものであるように決定する。

【0034】

ヘリックス構造および/または「水溶性」の喪失を予測する変異体（期待される使用条件で予測される）を廃棄する。ヘリックス構造および水溶性を予測する変異体を選択することができる。ヘリックス構造が損なわれ得るという予測が可能であれば、高水溶性であるか0、1、2または3つの疎水性アミノ酸を特徴とする膜貫通変異体を選択することができる。代わりまたは追加として、3、4、5または6つの疎水性アミノ酸を特徴とする高度なヘリックス構造を選択することができる。第2、第3、第4、第5、第6および/または第7（またはそれ以上）の膜貫通領域またはドメインのためにこれらの工程を繰り返すことができる。

【0035】

1つ、2つ、3つまたは4つのドメイン変異体が高いヘリックス構造スコアを有し、かつ1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのドメイン変異体が高い水溶性スコアを有する各ドメインの組み合わせを選択することができる。複数の変異体の選択において、例えば全ての疎水性アミノ酸が親水性アミノ酸で置換され、水溶性スコアを最大化することとを特徴とするドメインと、3つ、4つまたは5つの疎水性アミノ酸を保持する第2のドメイン変異体群とを選択することができる。次いで、選択された変異体を当該技術分野で知られているように細胞外および細胞内ドメインと共に「組み替え」て、推定上水溶性であるタンパク質変異体の最初のライブラリーを作製する。

【0036】

本明細書に記載されているように設計された最初のライブラリーの推定上水溶性であるタンパク質変異体の全てまたは断片を調製し、かつ好ましくはハイスループットスクリーニングで水溶性および/またはリガンド結合についてスクリーニングすることができる。例えば、当該ライブラリーの増幅により、100%未満の推定上水溶性であるタンパク質変異体を発現させることができる。当該技術分野でよく知られているように、リガンド結合をスクリーニングするためにレポーターシステムを使用することができる。本発明の方法を用いて、細胞外および細胞内ドメインと機能的に組み合わせた場合、野生型タンパク質の適切な三次元構造を有してリガンド結合機能（結合親和性を含む）または他の機能を保持する水溶性タンパク質変異体を産生する推定上水溶性である修飾された膜貫通変異体のライブラリーを迅速に同定することができる。

【0037】

実験的に実用的なものにするために、本発明者らは、約2百万種の潜在的に水溶性のGPCRまたはCXCR4変異体の最初のコンビナトリアルライブラリーの作製に着手した。当然ながら、それよりも多いまたは少ない変異体のライブラリーも設計することができる。より小さいライブラリーが好ましく、本明細書に記載されている研究結果の分析に基づいて日常的な実験法を用いて最適化することができる。研究結果の分析により恐らく、組み替えられるドメイン変異体の数を最適化する傾向およびドメイン変異体を選択するための推定が確立される。膜貫通領域を標的にして、本発明者らは、「ヘリックス予測スコア」としても知られているヘリックス形成傾向に基づいて修飾するためにアミノ酸を選択した。http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Main_Page。様々な断片をランダムに組み合わせて全長GPCR遺伝子の約2百万（ 8^7 ）種の変異体を形成する。予測される変異体の数は、式 H^n （式中、 n = 本方法によって修飾および/または変更された膜貫通領域の数（この例では、 $n = 7$

10

20

30

40

50

）および H = 各膜貫通領域における変異体の数）によって特徴づけることができる。

【0038】

最初のライブラリーすなわち組み替えられるドメイン変異体群を選択したら、最初のライブラリー内のタンパク質をコードする核酸分子すなわちDNAまたはcDNA分子を設計することができる。これらの核酸分子は、コード配列のライブラリーを作製するために選択された発現系のためにコドン最適化およびイントロン欠失を行うように設計することが好ましい。例えば、発現系が大腸菌である場合、大腸菌発現のために最適化されたコドンを選択することができる。<https://www.dna20.com/resources/genedesigner>。また、発現系（例えば、大腸菌）での発現に適したプロモーターなどのプロモーター領域を選択し、コード配列のライブラリー内のコード配列に機能的に連結させる。

10

【0039】

次いで、コード配列の最初のライブラリーまたはその一部を発現させて推定上水溶性であるGPCRのライブラリーを作製する。次いで、このライブラリーをリガンド結合アッセイに供する。結合アッセイでは、推定上水溶性であるGPCRを好ましくは水性媒体中でリガンドに接触させ、リガンド結合を検出する。

【0040】

本発明は、本明細書に記載されている方法から得られるか得ることができる膜貫通ドメイン変異体およびそれをコードする核酸分子を含む。

【0041】

本発明は、それぞれT、QまたはYによって置換された天然膜貫通タンパク質（例えば、GPCR）の少なくとも50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%または80%、例えば少なくとも約90%の疎水性アミノ酸残基（I/L、VおよびF）によって独立して特徴づけられる複数の膜貫通ドメインを特徴とする水溶性GPCR変異体（「sGPCR」）を想定している。本発明のsGPCRは、水溶性およびリガンド結合によって特徴づけられる。特に、sGPCRは対応する天然GPCRと同じ天然リガンドに結合する。

20

【0042】

本発明は、膜タンパク質の活性によって媒介される障害および疾患を治療するために水溶性ポリペプチドの使用を含む前記障害または疾患の治療法であって、前記水溶性ポリペプチドは修飾されたヘリックスドメインを含み、かつ前記水溶性ポリペプチドはその天然膜タンパク質のリガンド結合活性を保持していることを特徴とする方法をさらに包含する。そのような障害および疾患の例としては、限定されるものではないが、癌、小細胞肺癌、黒色腫、乳癌、パーキンソン病、心血管疾患、高血圧症および喘息が挙げられる。

30

【0043】

本明細書に記載されているように、膜タンパク質の活性によって媒介される病気または疾患の治療のために本明細書に記載されている水溶性ペプチドを使用することができる。特定の態様では、本水溶性ペプチドは膜受容体の「デコイ」として機能し、そうでなければ膜受容体を活性化させるリガンドに結合することができる。従って、本明細書に記載されている水溶性ペプチドを使用して膜タンパク質の活性を低下させることができる。これらの水溶性ペプチドは循環系中に残り、特異的リガンドに競合的に結合し、それにより膜結合受容体の活性を低下させることができる。例えば、GPCR CXCR4は小細胞肺癌において過剰発現され、腫瘍細胞の転移を促進する。本明細書に記載されているような水溶性ペプチドによるこのリガンドへの結合により転移を有意に減少させることができる。

40

【0044】

ケモカイン受容体CXCR4は、T細胞株向性HIVの侵入のための主要な補助受容体としてウイルス研究において知られている(Feng et al. (1996) Science 272: 872-877; Davis et al. (1997) J Exp Med 186: 1793-1798; Zaitseva et al. (1997) Nat Med 3: 1369-1375; Sanchez et al. (1997) J Biol Chem 272: 27529-27531)。間質細胞由来因子1(SDF-1)はCXCR4と特異的に相互作用するケモカインである。SDF-1が

50

C X C R 4 に結合した場合、C X C R 4 は、リンパ球、巨核球および造血幹細胞中の R a s / M A P キナーゼおよびホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (P I 3 K) / A k t などの下流キナーゼ経路(Bleul et al. (1996) Nature 382: 829-833; Deng et al. (1997) Nature 388: 296-300; Kijowski et al. (2001) Stem Cells 19: 453-466; Majka et al. (2001) Folia. Histochem. Cytobiol. 39: 235-244; Sotsios et al. (1999) J. Immunol. 163: 5954-5963; Vlahakis et al. (2002) J. Immunol. 169: 5546-5554) を含む G i タンパク質媒介性シグナル伝達 (百日咳毒素感受性) を活性化させる(Chen et al. (1998) Mol Pharmacol 53: 177-181)。ヒトリンパ節が移植されたマウスにおいて、S D F - 1 は移植されたリンパ節への C X C R 4 陽性細胞遊走を誘導する(Blades et al. (2002) J. Immunol. 168: 4308-4317)。

10

【 0 0 4 5 】

最近の研究から、C X C R 4 相互作用により転移性細胞の遊走を制御することができることが分かった。低酸素症すなわち酸素分圧の低下は、大部分の固形腫瘍において生じる微小環境の変化であり、腫瘍の血管新生および治療抵抗性の主要な誘導因子である。低酸素症は C X C R 4 レベルを上昇させる(Staller et al. (2003) Nature 425: 307-311)。転移活性が上昇した骨転移モデル由来の細胞の亜集団に対するマイクロアレイ分析から、転移表現型において増加した遺伝子のうちの 1 種は C X C R 4 であることが分かった。さらに、単離された細胞における C X C R 4 の過剰発現により転移活性が有意に上昇した(Kang et al. (2003) Cancer Cell 3: 537-549)。様々な乳癌患者から採取した試料において、M u l l e r ら(Muller et al. (2001) Nature 410: 50-56)は、C X C R 4 発現レベルは正常な乳腺または上皮細胞に対して原発性腫瘍においてより高いことを見出した。さらに、C X C R 4 抗体治療は、全てがリンパ節および肺に転移した対照アイソタイプと比較して所属リンパ節への転移を阻害することが分かった(Muller et al. (2001))。従って、デコイ治療法モデルは C X C R 4 媒介性疾患および障害を治療するのに適している。

20

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、本発明は、白血球動員または活性化異常を伴う C X C R 4 依存の走化性に関連する疾患または障害の治療に関する。当該疾患は、関節炎、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー、喘息、A I D S 関連脳炎、A I D S 関連斑状丘疹状皮疹、A I D S 関連間質性肺炎、A I D S 関連腸疾患、A I D S 関連門脈周囲肺炎および A I D S 関連系球体腎炎からなる群から選択される。

30

【 0 0 4 7 】

別の態様では、本発明は、関節炎、リンパ腫、非小細胞肺癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、多発性硬化症、中枢神経系発達障害、認知症、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、線維腫、星状細胞腫、骨髄腫、神経膠芽腫、炎症性疾患、臓器移植拒絶反応、A I D S 、H I V 感染または血管新生から選択される疾患または障害の治療に関する。

【 0 0 4 8 】

本発明は、前記水溶性ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体または希釈液を含む医薬組成物も包含する。

【 0 0 4 9 】

本組成物は、所望の製剤に応じて、動物またはヒトへの投与のための医薬組成物を製剤化するために一般に使用される賦形剤として定義される薬学的に許容される非毒性担体または希釈液も含むことができる。当該希釈液は、薬剤または薬理組成物の生物学的活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈液の例は、蒸留水、生理的リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液およびハंकス液である。また、本医薬組成物または製剤は、他の担体、アジュバントまたは非毒性の非治療的な非免疫原性の安定化剤なども含んでもよい。医薬組成物は、タンパク質、キトサンなどの多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー (例えば、ラテックス官能化セファローズ (latex functionalized SEPHAROSE) (商標) 、アガロース、セルロースなど) 、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび脂質凝集物 (例えば、油滴またはリポソーム) などの大きなゆっくりと代謝される巨大分子も含むことができる。

40

50

【 0 0 5 0 】

本組成物は、例えば、静脈内、筋肉内、クモ膜下腔内または皮下注射などにより非経口投与することができる。組成物を溶液または懸濁液に組み込むことにより、非経口投与を達成することができる。そのような溶液または懸濁液としては、注射用水などの無菌希釈液、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成の溶媒も含んでもよい。非経口製剤は、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、例えばアスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤およびEDTAなどのキレート剤も含んでもよい。酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの緊張調整剤も添加してもよい。当該非経口製剤をガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複数回投与用バイアルに封入することができる。

10

【 0 0 5 1 】

さらに、浸潤剤、乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などの補助物質が組成物中に存在していてもよい。医薬組成物の他の構成要素は、石油、動物、植物または合成由来の油、例えば、落花生油、大豆油および鉱油である。一般に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールは、特に注射溶液のための好ましい液体担体である。

【 0 0 5 2 】

液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射製剤を調製することができ、注射前に溶液または懸濁液すなわち液体賦形剤に溶解するのに適した固形も調製することができる。また、この製剤は、上に記載したようにアジュバント効果を高めるために、リボソームあるいはポリ乳酸、ポリグリコライドまたはコポリマーなどのマイクロ粒子に乳化または封入されていてもよい (Langer, Science 249: 1527, 1990およびHanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997)。本明細書に記載されている組成物および薬剤は、有効成分の持続放出またはパルス放出を可能にするように製剤化することができるデポ注射または埋込製剤の形態で投与することができる。

20

【 0 0 5 3 】

経皮投与は、皮膚からの本組成物の経皮吸収を含む。経皮製剤としてはパッチ、軟膏、クリーム、ゲル、膏薬などが挙げられる。皮膚パッチまたはトランスフェロソーム (transfersome) を用いて経皮送達を達成することができる。[Paul et al., Eur. J. Immunol. 25: 3521-24, 1995およびCevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-15, 1998]。

30

【 0 0 5 4 】

「治療する」または「治療」は、疾患の症状、合併症または生化学的兆候の発症を予防または遅らせること、その症状を軽減または改善すること、または疾患、病気または障害のさらなる進行を阻止または阻害することを含む。「患者」は治療を必要としているヒトの対象である。

【 0 0 5 5 】

「有効量」とは、疾患の1つ以上の症状を改善し、かつ/または疾患の進行を予防し、疾患の回復を引き起こし、かつ/または所望の効果を達成するのに十分な治療薬の量を指す。

40

【 0 0 5 6 】

コンピュータシステム

本明細書に記載されている各種態様および機能は、1つ以上のコンピュータシステムにおいて実行される専用ハードウェアまたはソフトウェア構成要素として実装してもよい。現在使用されているコンピュータシステムの多くの例がある。これらの例としては、とりわけ、ネットアプライアンス、パーソナルコンピュータ、ワークステーション、メインフレーム、ネットワーク化されたクライアント、サーバ、メディアサーバ、アプリケーションサーバ、データベースサーバおよびウェブサーバが挙げられる。コンピュータシステムの他の例としては、携帯電話および携帯情報端末などのモバイルコンピューティングデバ

50

イス、ロードバランサー、ルータおよびスイッチなどのネットワーク機器を挙げることができる。さらに、態様は、単一のコンピュータシステム上に位置していてもよく、あるいは1つ以上の通信ネットワークによって接続された複数のコンピュータシステム間に分散されていてよい。

【0057】

例えば、各種態様、機能および方法は、1つ以上のクライアントコンピュータにサービスを提供するか、分散システムの一部としてタスク全体を行うように構成された1つ以上のコンピュータシステム間に分散されていてよい。さらに、態様は、各種機能を行う1つ以上のサーバシステム間に分散された構成要素を備えるクライアントサーバすなわち多階層システム上で行われてもよい。従って、実施形態は、あらゆる特定のシステムまたはシステム群上での実行に限定されない。さらに、態様、機能および方法は、ソフトウェア、ハードウェアまたはファームウェアあるいは任意のそれらの組み合わせの中に実装されていてよい。従って、態様、機能および方法は、様々なハードウェアおよびソフトウェア構成を用いて、方法、動作、システム、システム要素および構成要素内に実装されていてよく、これらの例は、あらゆる特定の分散型アーキテクチャ、ネットワークまたは通信プロトコルに限定されない。

【0058】

図10を参照すると、各種態様および機能が実施される分散型コンピュータシステム300のブロック図が示されている。図示のように、分散型コンピュータシステム300は、情報を交換する1つ以上のコンピュータシステムを備える。より具体的には、分散型コンピュータシステム300は、コンピュータシステム302、304および306を備える。図示のように、コンピュータシステム302、304および306は通信ネットワーク308を介して相互接続されており、通信ネットワーク308を介してデータ交換することができる。ネットワーク308は、それを介してコンピュータシステムがデータ交換することができる任意の通信ネットワークを備えていてもよい。ネットワーク308を用いてデータ交換するために、コンピュータシステム302、304および306ならびにネットワーク308は、各種方法、プロトコルおよび規格を使用してもよい。これらのプロトコルおよび規格の例としては、ビッグデータ環境で使用するのに適したNAS、Web、記憶および他のデータ移動プロトコルが挙げられる。データ転送が安全であることを保証するために、コンピュータシステム302、304および306は、例えばSSLまたはVPN技術などの様々なセキュリティ対策を用いてネットワーク308を介してデータを伝送してもよい。分散型コンピュータシステム300は3つのネットワーク化されたコンピュータシステムを示しているが、分散型コンピュータシステム300はそのように限定されず、任意の媒体および通信プロトコルを用いてネットワーク化された任意の数のコンピュータシステムおよびコンピューティングデバイスを備えていてもよい。

【0059】

図10に示すように、コンピュータシステム302は、プロセッサ310、メモリ312、相互接続要素314、インタフェース316およびデータ記憶要素318を備える。本明細書に開示されている態様、機能および方法の少なくともいくつかを実装するために、プロセッサ310は、処理されたデータが得られる一連の命令を行う。プロセッサ310は、任意の種類のプロセッサ、マルチプロセッサまたは制御装置であってもよい。プロセッサの例としては、Intel Xeon、Itanium、Core、CeleronまたはPentiumプロセッサなどの市販されているプロセッサ、AMD Opteronプロセッサ、Apple A4もしくはA5プロセッサ、Sun UltraSPARCプロセッサ、IBM Power5+プロセッサ、IBMメインフレームチップまたは量子コンピュータを挙げることができる。プロセッサ310は、相互接続要素314によって1つ以上のメモリ装置312を含む他のシステム構成要素に接続されている。

【0060】

メモリ312は、コンピュータシステム302の動作中にプログラム（例えば、プロセッサ310によって実行可能なようにコード化された一連の命令）およびデータを記憶す

10

20

30

40

50

る。従って、メモリ 312 は、ダイナミック R A M (「D R A M」) またはスタティックメモリ (「S R A M」) などの比較的高性能の揮発性 R A M であってもよい。但し、メモリ 312 は、ディスクドライブまたは他の不揮発性記憶装置などのデータを記憶するための任意の装置を備えていてもよい。各種例により、本明細書に開示されている機能を行うようにメモリ 312 を、個別化され、かつ場合によっては固有の構造に組織化してもよい。これらのデータ構造は、特定のデータの値およびデータの種別を記憶するようにサイズ決めおよび組織化されていてもよい。

【0061】

コンピュータシステム 302 の構成要素は、相互接続要素 314 などの相互接続要素によって接続されている。相互接続要素 314 は、I D E、S C S I、P C I および I n f i n i B a n d などの専用または標準的なコンピューティングバス技術に従う 1 つ以上の物理的バスなどのシステム構成要素間の任意の通信結合を含んでいてもよい。相互接続要素 314 により、命令およびデータを含む通信をコンピュータシステム 302 のシステム構成要素間で交換することが可能となる。

【0062】

コンピュータシステム 302 は、入力装置、出力装置および入力 / 出力装置の組み合わせなどの 1 つ以上のインタフェース装置 316 も備える。インタフェース装置は、入力を受け取るか出力を与えてもよい。より詳細には、出力装置は、外部提示のために情報を与えてもよい。入力装置は外部ソースから情報を受け取ってもよい。インタフェース装置の例としては、キーボード、マウス装置、トラックボール、マイクロホン、タッチスクリーン、印刷装置、表示画面、スピーカー、ネットワークインタフェースカードなどが挙げられる。インタフェース装置によりコンピュータシステム 302 は情報を交換し、かつユーザおよび他のシステムなどの外部実体と通信することができる。

【0063】

データ記憶要素 318 は、プロセッサ 310 によって実行されるプログラムまたは他のオブジェクトを定義する命令が記憶されているコンピュータによる読み取りおよび書込みが可能な不揮発性または非一時的データ記憶媒体を備える。また、データ記憶要素 318 は、媒体の上または中に記録され、かつプログラムの実行中にプロセッサ 310 によって処理される情報を含んでいてもよい。より具体的には、当該情報は、具体的には記憶スペースを節約するかデータ交換性能を高めるように構成された 1 つ以上のデータ構造に記憶されていてもよい。当該命令は、符号化された信号として恒久的に記憶されていてもよく、当該命令は、プロセッサ 310 に本明細書に記載されている機能を実行させてもよい。当該媒体は、例えば、とりわけ光ディスク、磁気ディスクまたはフラッシュメモリであってもよい。動作中、プロセッサ 310 またはいくつかの他の制御装置は、データを不揮発性記録媒体から、データ記憶要素 318 に含まれている記憶媒体よりもプロセッサ 310 による情報へのより速いアクセスを可能にするメモリ 312 などの別のメモリに読み込ませる。但し、当該メモリはデータ記憶要素 318 またはメモリ 312 内に位置していてもよく、プロセッサ 310 はメモリ内のデータを処理し、次いで、処理が完了した後にデータをデータ記憶要素 318 に関連する記憶媒体にコピーする。様々な構成要素は、記憶媒体と他のメモリ要素との間でのデータ移動を管理してもよく、これらの例は特定のデータ管理構成要素に限定されない。さらに、これらの例は特定のメモリシステムまたはデータ記憶システムに限定されない。

【0064】

コンピュータシステム 302 は、例えば各種態様および機能を実施することができるコンピュータシステムの一種として示されているが、態様および機能は、図 1 に示すコンピュータシステム 302 上での実行に限定されない。各種態様および機能は、図 1 に示すものとは異なるアーキテクチャまたは構成要素を有する 1 つ以上のコンピュータ上で実施することができる。例えば、コンピュータシステム 302 は、本明細書に開示されている特定の動作を行うように作られた特定用途向け集積回路 (「A S I C」) などの特別にプログラムされた特殊な用途のハードウェアを備えていてもよい。一方、別の例は、Motorola

10

20

30

40

50

PowerPCプロセッサを備えたMAC OSシステムXを実行するいくつかの汎用コンピューティングデバイスおよび独自のハードウェアおよびオペレーティングシステムを実行するいくつかの専用コンピューティングデバイスのグリッドを用いて同じ機能を行うことができる。

【0065】

コンピュータシステム302は、コンピュータシステム302に含まれるハードウェア要素の少なくとも一部を管理するオペレーティングシステムを備えるコンピュータシステムであってもよい。いくつかの例では、プロセッサ310などのプロセッサまたは制御装置は、オペレーティングシステムを実行する。実行することができる特定のオペレーティングシステムの例としては、Microsoft社から入手可能なWindows NT、Windows 2000 (Windows ME)、Windows XP、Windows VistaまたはWindows 7オペレーティングシステムなどのWindows系オペレーティングシステム、Apple Computerから入手可能なMAC OS System XオペレーティングシステムまたはiOSオペレーティングシステム、多くのLinux（登録商標）系オペレーティングシステムディストリビューションのうちの1つ、例えば、Red Hat社から入手可能なEnterprise Linux（登録商標）オペレーティングシステム、Oracle社から入手可能なSolarisオペレーティングシステムまたは各種提供源から入手可能なUNIX（登録商標）オペレーティングシステムが挙げられる。多くの他のオペレーティングシステムを使用してもよく、これらの例は任意の特定のオペレーティングシステムに限定されない。

10

【0066】

プロセッサ310およびオペレーティングシステムと一緒に、高レベルプログラミング言語でアプリケーションプログラムが記載されているコンピュータプラットフォームを画定する。これらのコンポーネントアプリケーションは、通信プロトコル、例えばTCP/IPを用いて通信ネットワーク、例えばインターネット上で通信する、実行可能な中間バイトコードすなわち解釈実行されるコードであってもよい。同様に、態様は、.Net、SmallTalk、Java（登録商標）、C++、Ada、C#（Cシャープ）、PythonまたはJavaScript（登録商標）などのオブジェクト指向プログラミング言語を用いて実装されていてもよい。他のオブジェクト指向プログラミング言語も使用してもよい。あるいは、関数、スクリプトまたは論理プログラミング言語を使用してもよい。

20

30

【0067】

さらに、各種態様および機能は、プログラムされていない環境に実装されていてもよい。例えば、HTML、XMLまたは他のフォーマットで作成された文書は、ブラウザプログラムのウィンドウで見た場合、グラフィカルユーザインタフェースの態様を与えるか他の機能を行うことができる。さらに、各種例は、プログラムされた要素またはプログラムされていない要素または任意のそれらの組み合わせとして実装されていてもよい。例えば、ウェブページはHTMLを用いて実装されていてもよいが、ウェブページ内で必要なデータオブジェクトはC++で書き込まれていてもよい。従って、その例は、特定のプログラミング言語に限定されず、あらゆる好適なプログラミング言語を使用することができる。従って、本明細書に開示されている機能的構成要素としては、本明細書に記載されている機能を行うように構成された多種多様な要素（例えば、専用ハードウェア、実行可能コード、データ構造またはオブジェクト）を挙げることができる。

40

【0068】

いくつかの例では、本明細書に開示されている構成要素は、当該構成要素によって行われる機能に影響を与えるパラメータを読み出してもよい。これらのパラメータは、揮発性メモリ（RAMなど）または不揮発性メモリ（磁気ハードドライブなど）を含む任意の形態の好適なメモリに物理的に記憶されていてもよい。また、当該パラメータは、独自のデータ構造（ユーザスペースアプリケーションによって定義されたデータベースまたはファイルなど）または一般に共有されるデータ構造（オペレーティングシステムによって定義されているアプリケーションレジストリなど）に論理的に記憶されていてもよい。また、

50

いくつかの例は、外部実体にパラメータを修正させ、それにより当該構成要素の動作を構成させるシステムおよびユーザインタフェースの両方を提供する。

【 0 0 6 9 】

本発明は、例示としてのみ意図されており本発明の範囲を限定するものではない以下の実施例との関連でより理解されるであろう。開示されている実施形態への各種変更および修正は当業者には明らかであり、本発明の趣旨および添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、そのような変更を行うことができる。

【実施例】

【 0 0 7 0 】

実施例 1 : C X C ケモカイン受容体タイプ 4 イソ型 a (C X C R 4)

10

C X C R 4 は 3 5 6 アミノ酸長のケモカイン受容体である。これは約 8 . 6 1 の p I および 4 0 2 2 1 . 1 9 D a の分子量を有する。文献に発表されている C X C R 4 の配列は、

【化 1】

MSIPLPLLQIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKPCFREENANFNKIFLPTIYSIIIFLTGIVGN
GLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIY
TVNLYSSVLILAFISLD RYLAIVHATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTIPDFIFAN

VSEADDRYICDRFY PNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCI IISKLSHSGHKRKRK
ALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEI IKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCC
LNPILYAFLGAKFKTSAQH ALTSVSRGSSSLKILSKGRGGHSSVSTESSESSSFHSS (配列番号 1)

20

である。

【 0 0 7 1 】

この配列を T M H M M に供して、図 3 に示されている膜貫通ドメインを同定する。

【 0 0 7 2 】

30

疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で (それぞれ) 置換して以下の配列を得る。

【化 2】

1 MSIPLPLLQIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKPCFREENANFNKIFLPT TYSTTYQTGTTGN
61 GOTTQTMGYQKKLRSM TDKYRQHSTADQOYT TTPYWATDAVANWYFGNFLCKATHTTY
121 TTNQYSSQTQAYTSQDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKTTYTG TWTPAQOQTT PDYTYAN
181 VSEADDRYICDRFY PNDLWVVVFQYQHTMTGQTQPGTTQSCYCTIIISKLSHSGHKRKRK
241 ALKTTTTQ TQAYYACWQPYTGTSTDSYILLEI IKQGCEFENTVHKWTSTTEAQAYYHCC
301 QNPTQYAYQGAFKFKTSAQH ALTSVSRGSSSLKILSKGRGGHSSVSTESSESSSFHSS (配列番号 2)

40

【 0 0 7 3 】

このタンパク質の予測される p I は 8 . 5 4 であり、分子量は 4 0 5 5 1 . 6 4 D a である。予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、配列番号 2 のアミノ酸 4 7 ~ 7 0 を含む膜貫通ドメイン (T M 1) およびそれを含むタンパク質を含む。一例として、図

50

3 は T M 1 配列のヘリックス予測を表す。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、配列番号 2 の細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、配列番号 2 または、配列番号 1 に記載されている天然 L、I、V および F アミノ酸の 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持する相同な配列内の 1 つ以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む。

【 0 0 7 4 】

C X C R 4 の天然タンパク質配列（N 末端アミノ酸において異なる）を再度本方法に供する。プログラム出力は天然配列を細胞外および細胞内領域に分け、膜貫通ドメインのそれぞれに対して 8 種の膜貫通ドメイン変異体を選択した。その結果を図 4 および以下の表に示す。

10

MEGISIYTSNDYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNK (配列番号 3; EC1)

T M 1 変異体：

IFLPTTYSTTFQTGTTGNGQVTQVM	(配列番号 4)
IFQPTTYSTTFQTGTTGNGQVTQVM	(配列番号 5)
IFQPTTYSTTFQTGTTGNGQVTQTM	(配列番号 6)
IFQPTTYSTTYQTGTTGNGQVTQTM	(配列番号 7)
IFQPTTYSTTYQTGTTGNGQTTQVM	(配列番号 8)
IFQPTTYSTTYQTGTTGNGQTIQTM	(配列番号 9)
IFQPTTYSTTYQTGTTGNGQTTQTM	(配列番号 10)
TYQPTTYSTTYQTGTTGNGQTTQTM	(配列番号 11)

20

GYQKKLRSMTDKYR (配列番号 12; IC1)

T M 2 変異体：

LHLSTADQQFTTTQPFWAVIDAV	(配列番号 13)
LHLSVADQQYTTTQPFWATDAV	(配列番号 14)
LHQSVADQQYVTTQPFWATDAT	(配列番号 15)
QHQSADQQFTTTQPFWATDAT	(配列番号 16)
LHQSVADQQYTIQTQPYWATDAT	(配列番号 17)
QHLSVADQQYTIQTQPYWATDAT	(配列番号 18)
QHLSTADQQYVTTQPYWATDAT	(配列番号 19)
QHQSADQQYTTTQPYWATDAT	(配列番号 20)

30

ANWYFGNFLCK (配列番号 21; EC2)

T M 3 変異体：

AVHVTYTVNQYSSVQIQAFI	(配列番号 22)
AVHTTYTVNQYSSVQIQAFI	(配列番号 23)
AVHTTYTVNQYSSVQTQAFI	(配列番号 24)
ATHHTYTVNQYSSVQTQAFI	(配列番号 25)
ATHTIYTTNQYSSVQTQAFI	(配列番号 26)
AVHTTYTTNQYSSVQTQAFI	(配列番号 27)
ATHHTYTTNQYSSVQTQAFI	(配列番号 28)
ATHHTYTTNQYSSQTQAFI	(配列番号 29)

40

SLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEK (配列番号 30; IC2)

50

T M 4 変異体 :

VTYTGVWTPAQQTIPDFIF	(配列番号31)
TTYTGTWIPAQQTIPDFIF	(配列番号32)
TTYTGTWTPAQQTIPDFIF	(配列番号33)
TTYTGTWTPAQQTIPDFIY	(配列番号34)
TTYVGTWTPAQQTTPDYIF	(配列番号35)
TTYVGTWTPAQQTTPDFIY	(配列番号36)
TTYTGVWTPAQQTTPDYTF	(配列番号37)
TTYTGTWTPAQQTTPDYTY	(配列番号38)

10

ANVSEADDRYICDRFYPNDLW (配列番号39; EC3)

T M 5 変異体 :

VVVFQFQHTMVGQTQPGTTTQ	(配列番号40)
VVVFQFQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号41)
VVVFQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号42)
VVVYQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号43)
TVVFQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号44)
VVTFQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号45)
TVVYQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号46)
TTTYQYQHTMTGQTQPGTTTQ	(配列番号47)

20

SCYCIIIISKLSHSGHQKRKALKTT (配列番号48; IC3)

T M 6 変異体 :

VTQIQAFFACWQPYTGTST	(配列番号49)
VIQIQAYFACWQPYTGTST	(配列番号50)
VIQIQAYYACWQPYTGTST	(配列番号51)
VIQTQAFYACWQPYTGTST	(配列番号52)
VIQTQAYFACWQPYTGTST	(配列番号53)
VTQIQAFYACWQPYTGTST	(配列番号54)
VIQTQAYYACWQPYTGTST	(配列番号55)
TTQTQAYYACWQPYTGTST	(配列番号56)

30

DSFILLEIIKQGCEFENTVHK (配列番号57; EC4)

T M 7 変異体

WISITEAQAFFHCCLNPIQY	(配列番号58)
WISITEAQAFYHCCCLNPIQY	(配列番号59)
WISITEAQAYFHCCQNPTLY	(配列番号60)
WISTTEALAFYHCCQNPTQY	(配列番号61)
WISTTEALAYFHCCQNPTQY	(配列番号62)
WISITEALAYYHCCQNPTQY	(配列番号63)
WISTTEALAYYHCCQNPTQY	(配列番号64)
WTSTTEAQAYYHCCQNPTQY	

40

AFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGHSSVSTESESSSFHSS (配列番号65; IC4)

【 0 0 7 5 】

膜貫通ドメイン変異体の各リストの前、間および後の配列 (配列番号 3、12、21、

50

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

【 0 0 7 8 】

【化 3】

RRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSESQSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL (配列番号 66)

RRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSESQSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL (配列番号 67)

このタンパク質変異体の予測される p I は 6 . 7 4 であり、分子量は 4 1 0 2 7 . 1 7 D a である。予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、配列番号 6 7 の下線が引かれているアミノ酸を含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、配列番号 6 6 の細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配

列)の1つ以上(例えば全て)を含む。追加または代わりとして、本明細書中のT M 1を含むタンパク質は、配列番号67または、配列番号66に記載されている天然V、L、IおよびFアミノ酸のうちの1つ、2つ、3つまたは場合により4つまたはそれ以上を保持している相同な配列内の1つ以上のさらなる膜貫通領域(下線が引かれている配列)を含む。

【0080】

C X 3 C R 1の天然タンパク質配列を再度本方法に供する。プログラム出力は天然配列を細胞外および細胞内領域に分け、膜貫通ドメインのそれぞれに対して8種の膜貫通ドメイン変異体を選択した。その結果を以下の表に示す。

MDQFPESVTENFEYDDLAEACYIGDIVVFGT (配列番号68)

T M 1 変異体 :

TYQSTYYSTTFATGQVGNQQVVFALTNS	(配列番号69)
TYQSTYYSTTYATGQVGNQQVVFALTNS	(配列番号70)
TYQSTYYSTTYATGQVGNQQVVFQAQTN	(配列番号71)
TYQSTYYSTTYATGQGTGNLQVTFQAQTN	(配列番号72)
TYQSTYYSTTYATGQGTGNLQVTFQAQTN	(配列番号73)
TYQSTYYSTTYATGQGTGNQQVVFQAQTN	(配列番号74)
TYQSTYYSTTYATGQGTGNLQVTFQAQTN	(配列番号75)
TYQSTYYSTTYATGQGTGNQQVTFQAQTN	(配列番号76)

KKPKSVTDIY (配列番号77)

T M 2 変異体

LLNQAQSDQLFVATQPFWTHY	(配列番号78)
LLNQAQSDQQFVATQPFWTHY	(配列番号79)
QQNLAQSDQQFVATQPFWTHY	(配列番号80)
LQNLAQSDQQYTATQPFWTHY	(配列番号81)
QLNLAQSDQQYTATQPFWTHY	(配列番号82)
LLNQAQSDQQFTATQPYWTHY	(配列番号83)
QQNLAQSDQQFTATQPYWTHY	(配列番号84)
QQNQAQSDQQYTATQPYWTHY	(配列番号85)

L I N E K G L H N A M C K (配列番号86)

T M 3 変異体 :

YTTAYYYTGYGSGTYTTTTST (配列番号87)

DRYLAIVLAANSMMNRT (配列番号88)

T M 4 変異体 :

VQHGTTSQGTWAAATQVAAPQFMF	(配列番号89)
VQHGVTSQGTWAAATQTAAPQFMF	(配列番号90)
VQHGTTSQGVWAAATQTAAPQFMY	(配列番号91)
VQHGTTSQGTWAAA I QTAAPQFMY	(配列番号92)
VQHGTTSQGTWAAATQTAAPQFMF	(配列番号93)
VQHGTTSQGTWAAATQTAAPQYMF	(配列番号94)
VQHGTTSQGTWAAATQTAAPQFMY	(配列番号95)
TQHGTTSQGTWAAATQTAAPQYMY	(配列番号96)

10

20

30

40

50

TKQKENECLGDYPEVLQE IWPVLRNVET

(配列番号97)

T M 5 変異体 :

NFLGFQQPQQIMSYCYFRIT

(配列番号98)

NFQGFLLQPQQTMSYCYFRIT

(配列番号99)

NFQGFLLQPQQTMSYCYFRIT

(配列番号100)

NFQGFQQPQQTMSYCYRIT

(配列番号101)

NFQGFLLQPQQTMSYCYRIT

(配列番号102)

NFQGYLLQPQQTMSYCYFRIT

(配列番号103)

NYQGFQQPQQTMSYCYFRIT

(配列番号104)

NYQGYQQPQQTMSYCYRIT

(配列番号105)

QTLFSCKNHKKAKAIK

(配列番号106)

T M 6 変異体 :

LIQQTITTFYQFWTPYNTMTFQETL

(配列番号107)

LIQQTITTFYQYWTPYNTMTFQETQ

(配列番号108)

LIQQTITTTYQFWTPYNTMTFQETQ

(配列番号109)

QIQQTITTFYQYWTPYNTMTFQETQ

(配列番号110)

LTQQTITTTYQFWTPYNTMTFQETQ

(配列番号111)

QIQQTITTFYQYWTPYNTMTYQETQ

(配列番号112)

QIQQTITTFYQYWTPYNTMTYQETQ

(配列番号113)

QTQQTITTTYQYWTPYNTMTYQETQ

(配列番号114)

KLYDFFPSCDMRKDLRL

(配列番号115)

T M 7 変異体 :

ALSVTETVAFSHCCQNPQIYAFAG

(配列番号116)

AQSVTETTAFAHCCQNPQIYAFAG

(配列番号117)

ALSVTETVAFSHCCQNPQTYAYAG

(配列番号118)

AQSVTETTAFAHCCQNPQIYAYAG

(配列番号119)

ALSVTETTAFAHCCQNPQTYAYAG

(配列番号120)

ALSTTETTAYSHCCQNPQIYAFAG

(配列番号121)

ALSVTETTAYSHCCQNPQTYAYAG

(配列番号122)

AQSTTETTAYSHCCQNPQTYAYAG

(配列番号123)

EKFRRLYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSESQRSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL (配列番号124)

【 0 0 8 1 】

上記実施例 1 と同様に、膜貫通ドメイン変異体の各リストの前、間および後の配列はそれぞれ N'、中間および C' 細胞内または細胞外領域である。

【 0 0 8 2 】

次いで当該技術分野で知られているように、上記配列を使用して発現系、この場合は酵母における発現に適したコード配列を生成した。次いで、このコード配列を組み替えて発現させ、それぞれが各変異体リスト内の 1 種の膜貫通ドメイン変異体をそれぞれの細胞内および細胞外ドメインの間に含む、配列番号 68、77、86、88、97、106 および 115 を有する複数のタンパク質を含むライブラリーを作製した。

【 0 0 8 3 】

次いで、そのように作製したライブラリーを水性媒体中で C X 3 C R 1 同族リガンド (

10

20

30

40

50

C X C L 1) との結合について実施例 1 に記載されているようにアッセイした。リガンド結合を検出し、次いで試料を配列決定した。7 種の変異体を配列決定した。その結果を図 6 に示す。

【 0 0 8 4 】

実施例 3 : C C R 3 変異体

実施例 1 の方法をケモカイン受容体タイプ 3 イソ型 3 のために繰り返した。

【 表 1 】

10

名前	p I	MW (D a)
野生型 (W T)	8 . 8 7	4 3 1 2 2 . 3
修飾型 (M T)	8 . 7 8	4 3 5 3 1 . 6 4

20

【 0 0 8 5 】

その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で (それぞれ) 置換して、野生型 (上側の線) に整列させた以下の配列 (下側の線) を得る。

QYTPPQYSQTYTTGQQGNTTTTMTQTKY

(配列番号135)

RRLRIMTNIIY

(配列番号136)

T M 2 変異体 :

LLNQATSDQQFQVTQPFWIHY

(配列番号137)

LQNQAISDQLFQTTQPFWTHY

(配列番号138)

QQNLAISDQQFQTTQPFWTHY

(配列番号139)

QLNQAISDQQFQTTQPYWTHY

(配列番号140)

QQNLAISDQQYQVTQPYWTHY

(配列番号141)

LQNQATSDQLFQTTQPYWTHY

(配列番号142)

QQNQAISDQQYQVTQPYWTHY

(配列番号143)

QQNQATSDQQYQTTQPYWTHY

(配列番号144)

VRGHNWVFGHGMCK

(配列番号145)

T M 3 変異体 :

LQSGFYHTGQYSETFFTTQQTT

(配列番号146)

QLSGFYHTGQYSETFFTTQQTT

(配列番号147)

QLSGFYHTGQYSETFYTTQQTT

(配列番号148)

QLSGFYHTGQYSETYFTTQQTT

(配列番号149)

QLSGYYHTGQYSETFFTTQQTT

(配列番号150)

QQSGFYHTGQYSETFFTTQQTT

(配列番号151)

QQSGFYHTGQYSETFYTTQQTT

(配列番号152)

QQSGYYHTGQYSETYYTTQQTT

(配列番号153)

DRYLAIVHAVFALRART

(配列番号154)

T M 4 変異体 :

TTFGTTTSTVTWGQAVQAAQPEFIF

(配列番号155)

TTFGTTTSTTTWGQAVQAAQPEFIF

(配列番号156)

TTYGTTTSTTTWGQAVQAAQPEFIF

(配列番号157)

TTYGTTTSTTTWGQAVQAAQPEFTF

(配列番号158)

TTYGTTTSTTTWGQATQAAQPEFIF

(配列番号159)

TTFGTTTSTTTWGQATQAAQPEFIY

(配列番号160)

TTYGTTTSTTTWGQATQAAQPEFIY

(配列番号161)

TTYGTTTSTTTWGQATQAAQPEYTY

(配列番号162)

YETEELFEETLCSALYPEDTVYSWRHFHTLRM

(配列番号163)

T M 5 変異体 :

TIFCQVQPQQTMACTYGT

(配列番号164)

TIFCQTQPQQVMATCYGT

(配列番号165)

TIFCQTQPQQTMACTYGT

(配列番号166)

TIFCQTQPQQTMACTYGT

(配列番号167)

TTFCQVQPQQVMATCYGT

(配列番号168)

TIYCQVQPQQVMATCYGT

(配列番号169)

TIFCQTQPQQTMACTYGT

(配列番号170)

TTYCQTQPQQTMACTYGT

(配列番号171)

10

20

30

40

50

KTLLRCPSKKKYKAIR

(配列番号172)

T M 6 変異体：

QTYTTMATYYTYWTPYNTATQQSSY

(配列番号173)

QSILFGNDCERSKHLDL

(配列番号174)

T M 7 変異体：

VMQVTEVTAYSHCCMNPTTYAFTG

(配列番号175)

VMQVTEVTAYSHCCMNPTTYAYVG

(配列番号176)

VMLTTEVTAYSHCCMNPTTYAFTG

(配列番号177)

VMQVTETTAYSHCCMNPTTYAYTG

(配列番号178)

TMQVTETIAYSHCCMNPTTYAFTG

(配列番号179)

TMQVTETTAYSHCCMNPTTYAFVG

(配列番号180)

VMQTTETIAYSHCCMNPTTYAYTG

(配列番号181)

TMQTTETTAYSHCCMNPTTYAYTG

(配列番号182)

ERFRKYLRHFFHRHLLMHLGRYIPFLPSEKLERTSSVSPSTAEPELSIVF

(配列番号183)

【0088】

上記実施例1と同様に、膜貫通ドメイン変異体の各リストの前、間および後の配列はそれぞれN'、中間およびC'細胞内または細胞外領域である。

【0089】

次いで当該技術分野で知られているように、上記配列を使用して発現系、この場合は酵母における発現に適したコード配列を生成した。次いで、このコード配列を組み替えて発現させ、それぞれが各変異体リスト内の1種の膜貫通ドメイン変異体をそれぞれの細胞内および細胞外ドメインの間に含む、配列番号127、136、145、154、163、172、174および183を有する複数のタンパク質を含むライブラリーを作製した。

【0090】

次いで、そのように作製したライブラリーを実施例1に記載されているように水性媒体中でCCR3同族リガンドすなわちCCL3との結合についてアッセイした。リガンド結合を検出し、次いで試料を配列決定した。11種の変異体を配列決定した。その結果を図7に示す。

【0091】

実施例4：CCR5変異体

実施例1の方法をケモカイン受容体タイプ5イソ型3のために繰り返した。

10

20

30

【表 2】

名前	p I	MW (D a)
野生型 (WT)	9. 2 1	4 0 5 2 4. 0 5
修飾型 (MT)	9. 0 6	4 1 0 5 8. 3

10

【0092】

その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線）に整列させた以下の配列（下側の線）を得る。

【化 5】

20

MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILILINCKR
 MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILILINCKR

LKSMTDIYLLNLAI SDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGFFSGIFFII
 LKSMTDIYLLNLAI SDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGFFSGIFFII

LLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVAVFASLPGIIFTRSQEGLHYTCSS
 LLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVAVFASLPGIIFTRSQEGLHYTCSS

30

HFPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLP LLVMVICYSGILKTLRLCRNEKKRHRAVRLIFTI
 HFPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLP LLVMVICYSGILKTLRLCRNEKKRHRAVRLIFTI

MIVYFLFWAPYNIVLLNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFV
 MIVYFLFWAPYNIVLLNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFV

GEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCCKCSIFQOEAPERASSVYTRSTGEOEISVGL (配列番号 184)
 GEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCCKCSIFQOEAPERASSVYTRSTGEOEISVGL (配列番号 185)

40

【0093】

予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、配列番号 185 の下線が引かれているアミノ酸を含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、配列番号 185 の細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、配列番号 185 または、配列番号 184 に記載されている天然 V、L、I および F アミノ酸のうちの 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持している相同な配列内の 1 つ以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む

50

。

【 0 0 9 4 】

C C R 5 の天然タンパク質配列を再度本方法に供する（N末端配列における差異に留意）。プログラム出力は天然配列を細胞外および細胞内領域に分け、膜貫通ドメインのそれぞれに対して8種の膜貫通ドメイン変異体を選択した。その結果を以下の表に示す。

MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAA	(配列番号186)	
T M 1 変異体：		
RLQPPQYSQTFTFGFTGNMQVTQTQINC	(配列番号187)	10
RLQPPQYSQTFTFGYTGNMQVTQTQINC	(配列番号188)	
RQQPPQYSQTFTFGFTGNMQTTQTQINC	(配列番号189)	
RQQPPQYSQTFTYGYTGNMQTTQTQINC	(配列番号190)	
RQQPPQYSQTYTFGFTGNMQTTQTQINC	(配列番号191)	
RQQPPQYSQTFTFGYTGNMQTTQTQINC	(配列番号192)	
RQQPPQYSQTYTGYTGNMQTTQTQINC	(配列番号193)	
RQQPPQYSQTYTYGYTGNMQTTQTQINC	(配列番号194)	
KRLKSMTDIY	(配列番号195)	20
T M 2 変異体：		
LQNQAISDQFFQQTVPFWAHY	(配列番号196)	
LQNQAISDQFFQQTTPFWAHY	(配列番号197)	
LQNQAISDQFFQQTTPYWAHY	(配列番号198)	
LQNQAISDQFYQQTTPYWAHY	(配列番号199)	
LQNQAISDQYFQQTTPYWAHY	(配列番号200)	
LQNQATSDQFFQQTTPYWAHY	(配列番号201)	
LQNQAISDQYYQQTTPYWAHY	(配列番号202)	
QQNQATSDQYYQQTTPYWAHY	(配列番号203)	30
AAAQWDFGNTMCQ	(配列番号204)	
T M 3 変異体：		
QQTGGYFTGYSGTYTTQQT	(配列番号205)	
QQTGGYYTGYSGTYTTQQT	(配列番号206)	
DRYLAVVHAVFALKART	(配列番号207)	
T M 4 変異体：		
TTYGTTTSTTTWTTATYASQPGTTY	(配列番号208)	40
TRSQKEGLHYTCSSHFPYSQYQFWKNFQTLKI	(配列番号209)	
T M 5 変異体：		
VIQGQVQPQQVMVTCYSGIQ	(配列番号210)	
VIQGQVQPQQVMTTCYSGIQ	(配列番号211)	
VIQGQVQPQQTMTTCYSGIQ	(配列番号212)	
VTQGQVQPQQTMTTCYSGTQ	(配列番号213)	
TIQGQVQPQQVMTTCYSGTQ	(配列番号214)	
TIQGQVQPQQTMTTCYSGTQ	(配列番号215)	50

TTQGQVQPQQVMTTCYSGTQ (配列番号216)
 TTQGQTQPQQTMTTCYSGTQ (配列番号217)

KTLLRCRNEKKRRAVR (配列番号218)

T M 6 変異体 :

QTFTTMTTYQFWAPYNIVQQLNTF (配列番号219)
 QTFTTMTTYQFWAPYNTVQQLNTF (配列番号220)
 QTFTTMTTYQYWAPYNTVQQLNTF (配列番号221)
 QTFTTMTTYQYWAPYNTVQQQNTF (配列番号222)
 QTYTTMTTYQYWAPYNTVQQLNTF (配列番号223)
 QTFTTMTTYQYWAPYNTTQQLNTF (配列番号224)
 QTYTTMTTYQYWAPYNTVQQQNTF (配列番号225)
 QTYTTMTTYQYWAPYNTTQQQNTY (配列番号225)

10

QEFFGLNNCSSSNRLDQ (配列番号226)

T M 7 変異体 :

AMQVTETQGMTHCCINPIIYAFVG (配列番号227)
 AMQVTETLGMTHCCTNPIIYAFTG (配列番号228)
 AMQVTETQGMTHCCINPTIYAYVG (配列番号229)
 AMQTTETQGMTHCCINPIYAFTG (配列番号230)
 AMQTTETQGMTHCCINPTIYAFTG (配列番号231)
 AMQVTETQGMTHCCTNPTIYAYVG (配列番号232)
 AMQTTETQGMTHCCINPTTYAYVG (配列番号233)
 AMQTTETQGMTHCCTNPTTYAYTG (配列番号234)

20

EKFRNYLLVFFQKHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRSTGEQEISVGL (配列番号235)

【 0 0 9 5 】

30

上記実施例 1 と同様に、膜貫通ドメイン変異体の各リストの前、間および後の配列は、はそれぞれ N'、中間および C' 細胞内または細胞外領域である。

【 0 0 9 6 】

次いで当該技術分野で知られているように、上記配列を使用して発現系、この場合は酵母における発現に適したコード配列を生成した。次いで、このコード配列を組み替えて発現させ、それぞれが各変異体リスト内の 1 種の膜貫通ドメイン変異体をそれぞれの細胞内および細胞外ドメインの間に含む、配列番号 186、195、204、207、209、218、226 および 235 を有する複数のタンパク質を含むライブラリーを作製した。

【 0 0 9 7 】

次いで、そのように作製したライブラリーを水性媒体中で C C R 5 同族リガンドである C C L 5 との結合について実施例 1 に記載されているようにアッセイした。リガンド結合を検出し、次いで試料を配列決定した。1 種の変異体を配列決定した。その結果を図 8 に示す。

40

【 0 0 9 8 】

実施例 5 : C X C R 3 変異体

実施例 1 の方法を C X C ケモカイン受容体タイプ 3 イソ型 2 のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で (それぞれ) 置換して、野生型 (配列番号 324、上側の線) に整列させた以下の配列 (配列番号 325、下側の線) を得る。

50

RRTALSSTD (配列番号244)

T M 2 変異体 :

TFLQHLAVADTQQVQTLPQWA (配列番号245)
 TFLQHQA VADTQLVQTQPQWA (配列番号246)
 TFQQHLAVADTQQVQTQPQWA (配列番号247)
 TYLQHQA VADTQQVQTQPQWA (配列番号248)
 TYQLHQA VADTQQVQTQPQWA (配列番号249)
 TYQQHLAVADTQQVQTQPQWA (配列番号250)
 TYQQHQA VADTQQVQTQPQWA (配列番号251)
 TYQQHQA TADTQQTQTQPQWA (配列番号252)

10

VDAAVQWVFGSGLCK (配列番号253)

T M 3 変異体 :

TAGAQYNTN FYAG AQQQAC I SF (配列番号254)
 TAGAQYNTN FYAG AQLQACTSF (配列番号255)
 TAGAQYNTN FYAG AQQ LACTSF (配列番号256)
 TAGAQFNTN YYAG AQQQAC I SF (配列番号257)
 TAGAQYNTN YYAG AQQQAC I SF (配列番号258)
 TAGAQYNTN YYAG AQLQACTSF (配列番号259)
 TAGAQYNTN YYAG AQQ LACTSF (配列番号260)
 TAGAQYNTN YYAG AQQQACTSY (配列番号261)

20

DRYLN I VHATQLYRRGPPARVT (配列番号262)

T M 4 変異体 :

LTCQAVWGQCQQAQPDF I F (配列番号263)
 QTCQAVWGQCQQAQPDF I F (配列番号264)
 QTCQATWGQCQQAQPDF I F (配列番号265)
 QTCQATWGQCQQAQPDF I F (配列番号266)
 QTCQATWGQCQQAQPDFTF (配列番号267)
 QTCQATWGQCQQAQPDY I F (配列番号268)
 QTCQATWGQCQQAQPDY I F (配列番号269)
 QTCQATWGQCQQAQPDYTY (配列番号270)

30

LSAHHDERLNATHCQYNFPQVGR (配列番号271)

T M 5 変異体 :

TAQRTQQQTAGYQQPQQT MAY (配列番号272)

40

CYAH I LAVLLVSRGQRRRLRAMR (配列番号273)

T M 6 変異体 :

QVTTTTVAFAQCWTPYHQVVQV (配列番号274)
 QVTTTTVAFAQCWTPYHQTVQV (配列番号275)
 QVTTTTTAFAQCWTPYHQTVQV (配列番号276)
 QVTTTTTAYACWTPYHQTVQV (配列番号277)
 QVTTTTTAFAQCWTPYHQTTQV (配列番号278)

50

QTTTTTVAFAQCWTPYHQTQV (配列番号279)
 QTTTTTTAYAQCWTPYHQTQV (配列番号280)
 QTTTTTTAYAQCWTPYHQTQV (配列番号281)

DILMDLGALARNCGRESRV DV (配列番号282)

T M 7 変異体 :

AKSVTSGQGYMHCCLNPLQYAFV (配列番号283)
 AKSVTSGQGYMHCCLNPLQYAFV (配列番号284)
 AKSVTSGQGYMHCCLNPLQYAFV (配列番号285)
 AKSTTSGQGYMHCCLNPLQYAFV (配列番号286)
 AKSTTSGQGYMHCCQNPLQYAFV (配列番号287)
 AKSTTSGQGYMHCCQNPLQYAFV (配列番号288)
 AKSTTSGQGYMHCCQNPLQYAFV (配列番号289)
 AKSTTSGQGYMHCCQNPLQYAFV (配列番号290)

10

GVKFRERMWMLLLRLGCPNQRGLQRQPSSSRDSSWSETSEASYSGL (配列番号291)

【 0 1 0 1 】

上記配列を使用して当該技術分野で知られているように発現系、この場合は酵母における発現に適したコード配列を生成することができる。次いで、このコード配列を組み替えて発現させ、それぞれが各変異体リスト内の1種の膜貫通ドメイン変異体をそれぞれの細胞内および細胞外ドメインの間に含む、細胞内および細胞外ループを有する複数のタンパク質を含むライブラリーを作製した。

20

【 0 1 0 2 】

次いで、そのように作製したライブラリーを水性媒体中で同族リガンドとの結合について実施例1に記載されているようにアッセイすることができる。

【 0 1 0 3 】

実施例6 : (C C R - 1) C C ケモカイン受容体タイプ1

実施例1を表題のタンパク質のために繰り返した。

30

【 表 3 】

名前	p I	MW (D a)
野生型 (WT)	8. 3 8	4 1 1 7 2. 6 4
修飾型 (MT)	8. 3 1	4 1 5 8 3. 7 8

40

【 0 1 0 4 】

その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で (それぞれ) 置換して、野生型 (上側の線、配列番号 2 9 2) に整列させた以下の配列 (下側の線、配列番号 2 9 3) を得る。

40

[illegible]

20

30

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例 1 に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

40

[illegible]

20

30

40

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 300）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 301）を得る。

10

20

30

40

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 302）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 303）を得る。

40

10

20

30

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例 1 に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

40

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 308）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 309）を得る。

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F のそれぞれを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 3 1 0）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 3 1 1）を得る。

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 312）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 313）を得る。

40

[illegible]

20

30

40

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F のそれぞれを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 316）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 317）を得る。

【化 19】

```

MAEHDYHEDYGFSSFNDSSQEEHQDFLQFSKVFLPCMYLVVFCGLVGNLVLVISIFYH
|||||*****||**||*****||**||
MAEHDYHEDYGFSSFNDSSQEEHQDFLQFSKVFLPCMYQTTYTCGQTGNSQTQTTSTYYH

KLQSLTDVFLVNLPLADLVFVCTLPFWAYAGIHEWVFGQVMCKSLGIIYTNIFYTSMILIL
|||||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||
KLQSLTDVFLVNLPLADLVFVCTLPFWAYAGIHEWVFGQVMCKSLGIIYTNIFYTSMIQTQ

TCITVDRFIVVVKATKAYNQQAQRMTWGKVTSLLIIVVISLLVSLPQIIYGNVFNLDKILIC
||**||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||
TCTTTDRYTTTTKATKAYNQQAQRMTWGKVTSQQTWTSQOTSQOTTYGNTYNQDKLIC

GYHDEAISTVVLATQMTLGFLLPLLTMIVCYSVIIKTLLHAGGFQKHRSLKIIFLVMAVF
|||||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||
GYHDEAISTVVLATQMTLGFLLPLLTMIVCYSVIIKTLLHAGGFQKHRSLKTIYQTMATY

LLTQMPFNLKMFIRSTHWEYYAMTSFHYTIMVTEAIIAYLRACLNPLVLYAFVSLKFRKNFW
**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||**||
QQTQMPYNQMKYTRSTHWEYYAMTSFHYTTMTTEATAYQRACQNPTQYAYTSLKFRKNFW

KLVKDIGCLPYLGVSHQWKSSDNSTFSASHNVEATSMFQL
|||||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||*****||**||
KLVKDIGCLPYLGVSHQWKSSDNSTFSASHNVEATSMFQL

```

10

20

【0140】

予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、下線が引かれたドメインをそれぞれ含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、描写されているタンパク質または、野生型配列に記載されている天然 L、I、V および F アミノ酸の 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持する相同な配列内の 1 つ以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む。

30

【0141】

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例 1 に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

【0142】

実施例 19：(C X C R 7) ケモカイン受容体タイプ 7

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 318）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 319）を得る。

40

【化 2 0】

```

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYTLSTFIYIFIFVIGMI
|||||*|||*****|*
MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYQSYTYTYTYTTGMT

ANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTPVWVSVLVQHNQWPMGELTCKVT
|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
ANSTTTWTNIQAKTTGYDTHCYTQNTQATADQWTTQTTPTWTTSQVQHNQWPMGELTCKTT

HLIFSINLFGSIFFLTMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRVVCILVWLLAFVCVSLPDT
***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
HQTYSTNQYGSTYYQTCMSTDYLSITYFTNTPSSRKKMTRRTTCTQTWQQAYCTSOPDT

YYLKTVTTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYFLARAI
|||||*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
YYLKTVTTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMEQTSTTQGYATPYSTTATYYYQQARAIS

ASSDQEKHSSRKIIIFSYYVFLVCLWLPYHVAVLDDIFSILHYIPFTCRLEHALFTALHVT
|||||*|||*****|*|||*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
ASSDQEKHSSRKIIISYTTTYQTCWQPYHTATQODTYSILHYIPFTCRLEHALFTAQHTT

QCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAGTGLTKLIDASRVSETEYSALEQS
|||*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
QCQSQTHCCTNPTQYSYTNRNYRYELMKAFIFKYSAGTGLTKLIDASRVSETEYSALEQS

TK
||
TK

```

10

20

【0 1 4 3】

予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、下線が引かれたドメインをそれぞれ含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、描写されているタンパク質または、野生型配列に記載されている天然 L、I、V および F アミノ酸の 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持する相同な配列内の 1 つ以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む。

30

【0 1 4 4】

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例 1 に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

40

【0 1 4 5】

実施例 20：(CLR - 1 a) ケモカイン様受容体 1 イソ型 a

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F の全てまたは実質的に全てを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 3 2 0）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 3 2 1）を得る。

【化 2 1】

```

MRMEDEDYNTSISYGDEYPDYLDLSIVVLEDLSPLEARVTRIFLVVVYSIVCFLGILGNGL
|||||*****|**|**|**|**|
MRMEDEDYNTSISYGDEYPDYLDLSIVVLEDLSPLEARVTRTYQTTTYSTTCYOGTQNGOQ

V IIIATFKMKKTVMNVWFLNLAVADFLFNVLPIHITYAAMDYHWVFGTAMCKISNFLLI
***|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|
TTTIATFKMKKTVMNTWYQNQATADYQYNTYQPTHHTTYAAMDYHWVFGTAMCKISNFQQT

HNMFTSVFLLTISSDRCISVLLPVWSQNHRSVRLAYMACMVIWVLAFFLSSPSLVFRDT
||*|*****|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|
HNMYTSTYQQTSSDRCISVLLPVWSQNHRSVRQAYMACMTTWTOAYYQSSPSQTYRDT

ANLHGKISCFNNFSLSTPGSSSWPTHSQMDPVGYSRHMVTVTRFLCGFLVPVLIITACY
|||||*****|**|**|**|**|**|
ANLHGKISCFNNFSLSTPGSSSWPTHSQMDPVGYSRHMVTVTRYQCGYQTPTQTTTACY

LTIVCKLQRNRLAKTKKPKIIVTIIITFFLCWCPYHTLNLELHHTAMPGSVFSLGLPL
*|**|*|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|
QTTTCKQRNRLAKTKKPYKTTTTTTTTTYQCWCPYHTQNQLELHHTAMPGSVFSQGOQO

ATALAIANSCMNPILYVFMGQDFKKFKVALFSRLVNALSEDTHGSSYPSHRSFTKMSSMN
||*|*|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|**|
ATAQATANSCMNPTQYTYMGQDFKKFKVALFSRLVNALSEDTHGSSYPSHRSFTKMSSMN

ERTSMNERETGML
|||||
ERTSMNERETGML

```

10

20

【0 1 4 6】

予測される膜貫通領域のそれぞれに下線が引かれており、本発明の完全に修飾されたドメインが例示されている。従って、例えば本発明は、下線が引かれたドメインをそれぞれ含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の T M 1 を含むタンパク質は、描写されているタンパク質または、野生型配列に記載されている天然 L、I、V および F アミノ酸の 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持する相同な配列内の 1 つ以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む。

30

【0 1 4 7】

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例 1 に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

40

【0 1 4 8】

実施例 2 1 : D A R I A ダッフィ抗原 / ケモカイン受容体イソ型 a

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F のそれぞれを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 3 2 2）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 3 2 3）を得る。

20

30

40

実施例 1 を表題のタンパク質のために繰り返した。その膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸 L、I、V および F のそれぞれを Q、T および Y で（それぞれ）置換して、野生型（上側の線、配列番号 324）に整列させた以下の配列（下側の線、配列番号 325）を得る。

【化 2 3】

```

WT: 1 MGVEGCTKCIKYLLEFVFNFWLWLAGGVILGVALWLRHDPQTTNLLYLELGDKPAPNTFYV
    |||*****|***|*|||***|*|||*****|
MT: 1 MGVEGCTKCIKYQQYTYNYTYWQAGGTTQGTAWLRHDPQTTNLLYLELGDKPAPNTFYV

WT: 61 GIYILIAVGAVMMFVGFLGCGYGAIQESQCLLGTFEFTCLVILFACEVAAGIWGFVNKDQIA
    |||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||***|*|||
MT: 61 GIYTQTATGATMMYTGYQGCYGATQESQCCQGTYYTCQTTQYACETAAGTWGFVNKDQIA

WT: 121 KDVKQFYDQALQQAVVDDDDANNAKAVVKTFFHETLDCCGSSTLTALTTSVLKNNLCPSGSN
    |||*****|***|*|||***|*|||*****|
MT: 121 KDVKQFYDQALQQAVVDDDDANNAKAVVKTFFHETLDCCGSSTLTALTTSVLKNNLCPSGSN

WT: 181 IISNLFKEDCHQKIDDLFSGKLYLIGIAAIVVAVIMIFEMILSMVLCCGIRNSSVY
    |||*****|***|*|||***|*|||*****|
MT: 181 IISNLFKEDCHQKIDDLFSGKQYQTGTAATTTATTMTYEMTQSMVLCCGIRNSSVY

```

10

【0 1 5 2】

予測される膜貫通領域は本発明の修飾されたドメインを例示しており、以下を（配列番号 3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3 をそれぞれ）含む。

【化 2 4】

20

```

TM1-wt: LFVFNFWLWLAGGVILGVALW
        *****|***|*|||***|*|||
TM1-mt: QYTYNYTYWQAGGTTQGTAW

```

```

TM2-wt: LIAVGAVMMFVGFLGCGYGAIQ
        **|*|||*|||***|*|||*|||
TM2-mt: QTATGATMMYTGYQGCYGATQ

```

30

```

TM3-wt: LGTFEFTCLVILFACEVAAGIWGF
        *||***|*****|*|||*|||
TM3-mt: QGTYYTCQTTQYACETAAGTWGF

```

```

TM4-wt: YLIGIAAIVVAVIMIFEMILSMV
        |**|*|||***|*|||*|||*|||
TM4-mt: YQTGTAATTTATTMTYEMTQSMV

```

40

【0 1 5 3】

従って、例えば本発明は、それぞれ修飾されたドメインすなわち「mt」ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。好ましくは本明細書中の TM 1 を含むタンパク質は、細胞外および細胞内ループ配列（下線が引かれていない配列）の 1 つ以上（例えば全て）を含む。追加または代わりとして、本明細書中の TM 1 を含むタンパク質は、描写されているタンパク質または、野生型配列に記載されている天然 V、L、I および F アミノ酸のうちの 1 つ、2 つ、3 つまたは場合により 4 つまたはそれ以上を保持している相同な配列内の 1 つ

50

以上のさらなる膜貫通領域（下線が引かれている配列）を含む。

【0154】

当該野生型配列を上に記載した方法に供して実施例1に記載されているようにさらなる膜貫通ドメイン変異体を選択することができる。コード配列を設計し、組み替えてタンパク質を発現させることができる。発現させたタンパク質を本明細書に記載されているようにリガンド結合についてアッセイすることができる。

【0155】

実施例23：QTY変異体の大腸菌発現およびCXCR4-QTY変異体の大腸菌発現

【0156】

1. 大腸菌BL21(DE3)におけるCXCR4-QTYの大規模産生

10

日常的に使用されるLB培地1リットル当たり約20mgの精製されたタンパク質であると推定される収率で、水溶性GPCR CXCR4を大腸菌において産生した。推定される産生コストは1ミリグラム当たり約\$0.25である。この手法を使用してグラム量の水溶性GPCRを容易に得ることができ、次いでこれによりそれらの構造的決定を容易にすることができる。と有利である。

【0157】

2. 水溶性CXCR4-QTYが大腸菌細胞において産生される位置の決定

水溶性CXCR4-QTYをpETベクターにクローン化した。本発明らは最初に小規模の大腸菌培養研究を行って、産生されるCXCR4-QTYタンパク質(150mlの培養物)の位置を評価した。IPTGを用いて24で4時間誘導された細胞を培養した後、本発明らはこれらの細胞を回収および超音波処理し、14,637×g(12,000rpm)の遠心分離により2つの画分に分けた。次いで、本発明らは特異的抗rhotaグモノクローナル抗体のウェスタンブロット分析を使用してCXCR4-QTYタンパク質の位置を検出した。本発明らはCXCR4-QTYタンパク質が上澄み画分中であり、タンパク質がペレット画分中不在であることを観察し、従って、当該タンパク質が完全に水溶性であることが示唆された。

20

【0158】

3. 大腸菌細胞の可溶性画分中で産生されるCXCR4-QTYの推定収率

次いで、本発明らは別に150mlの培養を行い、約6mgの1D4モノクローナル抗体で精製されたCXCR4-QTYを得た。本発明らは、その収率を過小に推定したため(本発明らは驚くべき程に高い収率を予期していなかった)、本発明らは、産生されたCXCR4-QTYを捕捉するために十分な親和性rho-1D4タグモノクローナル抗体ビーズを使用しなかった。従って、精製中に十分なビーズが添加されず、当該タンパク質が流出レーン中であり、さらに洗い流されたことにより、有意な量のCXCR4-QTYタンパク質がビーズに結合しなかった。有意な損失にも関わらず、本発明らは、レーン8~10(溶離画分)から分かるように、150mlの培養物に対してなお約6mgを得ることができる。

30

【0159】

4. 精製された水溶性CXCR4-QTYタンパク質の熱安定性の測定

ほとんどの場合、構造によりタンパク質における機能が決まる。従って、大腸菌で産生された精製されたCXCR4-QTYタンパク質が約50%のヘリックスを有する典型的なヘリックス構造になお正確に折り畳まれているか否かを知ることは重要である。本発明らは円偏光二色性(CD)を用いて二次構造測定を行った。本発明らは、各種温度で精製されたCXCR4-QTYタンパク質のCDスペクトルを観察した。本発明らは、精製されたCXCR4-QTYタンパク質の熱安定性を測定した。本発明らは、精製されたCXCR4-QTYタンパク質が55まで比較的安定であり、当該タンパク質が部分的にのみ徐々に変性し、CDシグナル減少が約15%であることを観察した。55~65で、その変性は65に向かって増加し、65~75で変性転移が生じ、75で当該タンパク質はほぼ完全に変性した。

40

【0160】

50

本発明らは、222nmで楕円率に対して温度をプロットして、精製された水溶性CXCR4-QTYタンパク質の融解温度(T_m)を得た。このプロットから、本発明らは、精製されたCXCR4-QTYタンパク質のT_mは約67であると推定した。このT_mは、精製された水溶性CXCR4-QTYタンパク質が多く他の可溶性タンパク質と比較して非常に安定であることを示唆している。熱安定性が良好である程、結晶格子充填が良好になり、従って構造を得る機会が増すことが知られているため、この熱安定性特性により回折結晶を得ることが容易になる。

【0161】

5.さらなるGタンパク質共役受容体

本発明らは、10種のGタンパク質共役受容体(GPCR)を選択して、Zhangらの「Water Soluble Membrane Proteins and Methods for the Preparation and Use Thereof (水溶性膜タンパク質およびその調製および使用方法)」という発明の名称の米国特許公開第2012/0252719A号(「Zhang」)に記載されているQTY方法を用いてその水溶性形態を設計した。あるいは、本明細書に記載されているタンパク質を選択することができる。

10

【0162】

6.遺伝子の分子クローニング

本発明らは無細胞タンパク質発現プラスミドベクターpIvex2.3dおよび大腸菌pET28aおよびpET-duct-1プラスミドベクターにおけるGPCRの天然およびQTY遺伝子の確認に成功した。

20

【0163】

7.水溶性GPCRの産生

本発明らは、いくつかの天然およびQTYタンパク質を産生した。無細胞系において天然GPCRを産生した場合、界面活性剤Brj35が必要であり、界面活性剤を使用しない場合、当該タンパク質は産生されるとすぐに沈殿する。他方、本発明らは、界面活性剤の存在および非存在下でQTY変異体を試験した。界面活性剤を使用しない場合、無細胞系は可溶性タンパク質を産生した。

【0164】

本発明らは、大腸菌BL21(DE3)株における大腸菌細胞タンパク質産生のために、QTY変異体を大腸菌生体内発現系pET28aおよびpET-duct-1プラスミドベクターにクローン化した。本発明らは、CXCR4およびCCR5を含むいくつかの水溶性GPCRタンパク質を精製し、本発明らはそれを二次構造分析のために使用した。本発明らは、CXCR4についてその天然リガンドCCL12(SDF1a)を用いてリガンド結合研究を行った。本発明らは、水溶性GPCR CCR5e変異体の大腸菌産生および精製を行った。CCR5e変異体は58個のアミノ酸変化(約18%の変化)を有していた。水溶性GPCR CCR5e変異体を、特異的モノクローナル抗体ロドプシタグを用いて均質になるまで精製した。青色の株は、SDSゲル上にその純度を示す単一のバンドを示した。当該タンパク質のサイズマーカーから推定されるように、それは純粋なホモ二量体であるように見える(天然膜結合CXCR4結晶構造は二量体であった)。ウエスタンブロットにより、GPCRにおいて一般的なCCR5e変異体の単量体およびホモ二量体を確認した。

30

40

【0165】

8.QTY CCR5eの二次構造研究

本発明らは、GPCR CCR5eの水溶性QTY変異体を得た。次いで本発明らは、Avivモデル410円偏光二色性装置を用いて二次構造分析を行い、GPCR QTY CCR5-e変異体が典型的なヘリックス構造を有することを確認した。本発明らは、各種温度で実験を行ってCCR5e変異体のT_mすなわち水溶性CCR5e変異体の熱安定性も決定した。これらの実験から、本発明らはCCR5e変異体のT_mは約46であると決定した。このT_mは結晶スクリーニング実験にとって良好である。

【0166】

50

9. CCL12 (SDF1a) を用いた CXCR4 のリガンド結合研究

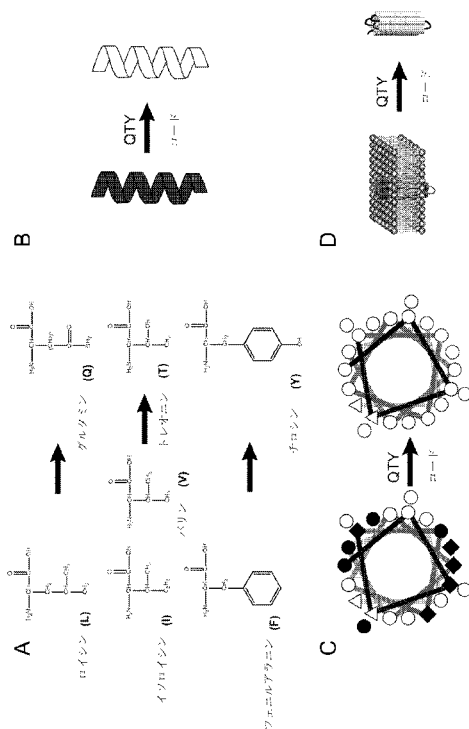
設計された水溶性QTY GPCRがそれらの生物学的機能をなお維持している、すなわちそれらの天然リガンドを確実に認識して結合するようにするために、本発明らは最初にELISA測定を使用して、水溶性CXCR4をその天然リガンドCCL12 (SDF1aともいう)を用いて研究した。アッセイ濃度は50 nM ~ 10 μ Mの範囲である。測定されたKdは約80 nMである。天然膜結合CXCR4のSDF1aとのKdは約100 nMである。そのため、水溶性CXCR4のKdは許容される範囲内である。より感受性の高いSPRを用いるさらなる実験または他の測定を行って、より正確なKdを生成してもよい。

【0167】

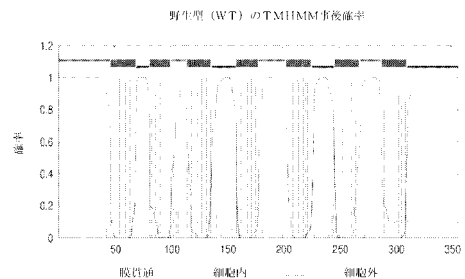
10

本発明を特にその好ましい実施形態を参照しながら図示および説明してきたが、添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱することなくその形態および詳細における各種変更を行うことができることは当業者によって理解されるであろう。

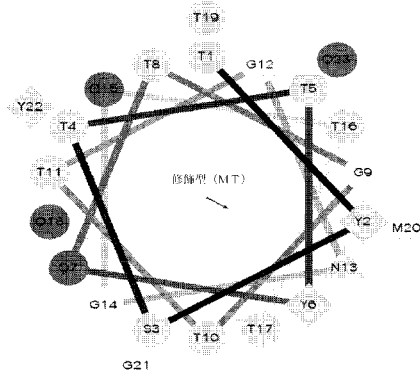
【図1A - 1D】



【図2】



【 図 3 】



【 図 4 - 1 】

[illegible]

FIG. 4

【 図 4 - 2 】

181	DDRYICDREYPNDJW	SCYCLIIISKLSHGKRRKALKT	240
181			240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		VVVFQOYQHTMTGQTQPGETTQ	240
181		TTTYQYQHTMTGQTQPGETTQ	240
241	T	DSFILLEIKQCGFENIVHK	300
241	VTQOAFACWQPYTGTST	WSITEAQAFHHCLLNPI	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEAQAFVHCCLNPI	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEAQAFVHCCLNPI	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEAQAFVHCCLNPI	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
241	VIQIOAYFACWQPYTGTST	WSITEALAFVHCCQNPT	300
301	AFGLGAKFTYSQAQHALTSVSRGSSSKILSKRGSGHSSVTESSSPHSS	352	
301	QY	352	
301	QY	352	
301	LY	352	
301	QY	352	
301	QY	352	
301	QY	352	
301	QY	352	
301	QY	352	

FIG. 4 (continued)

【 図 5 - 1 】

[illegible]

FIG. 5

【 図 5 - 2 】

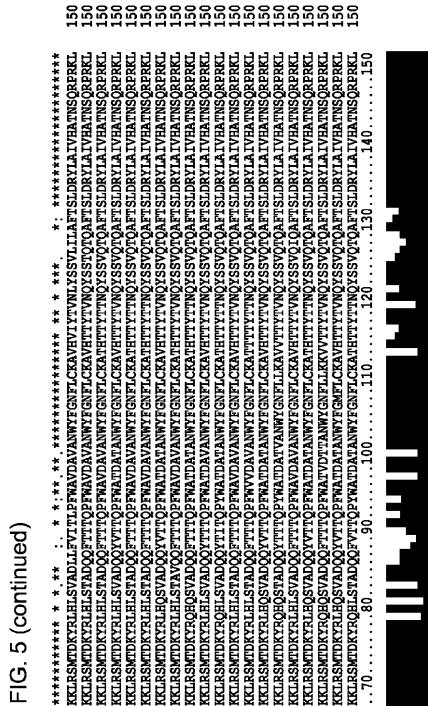


FIG. 5 (continued)

【 図 5 - 4 】

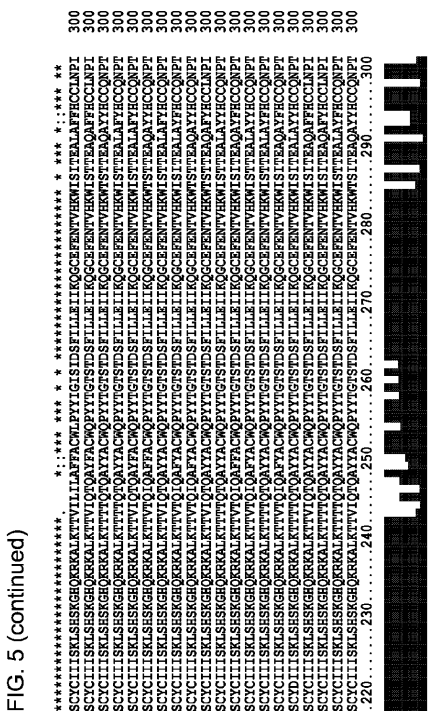


FIG. 5 (continued)

【 図 5 - 3 】

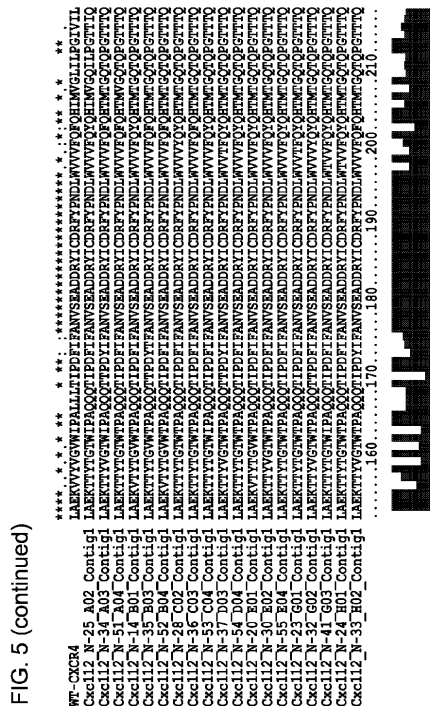


FIG. 5 (continued)

【 図 5 - 5 】

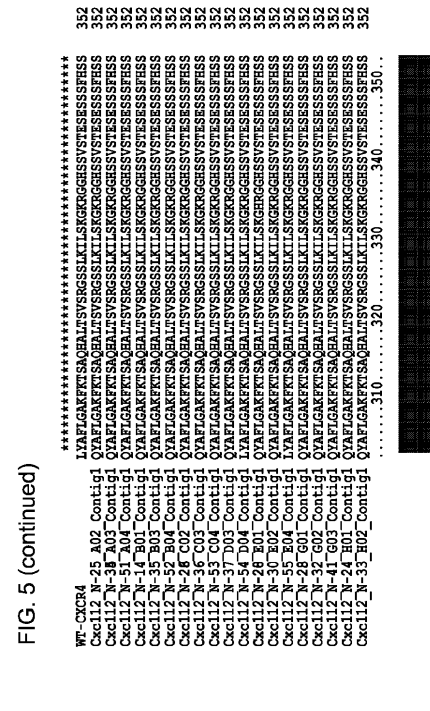
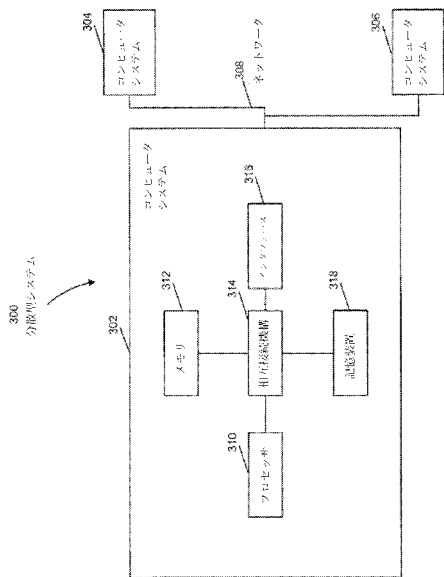


FIG. 5 (continued)

【図 10】



【配列表】

2017520862000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/022780
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G06F 19/16 (2015.01) CPC - G06F 19/16 (2015.07) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 1/14; C12N 15/00; G01N 33/48, 33/50; G06F 17/50, 19/00, 19/16 (2015.01) CPC - C07K 1/145; G06F 19/16, 19/18 (2015.07)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C07K 1/145; G06F 19/16, 19/18 (2015.07) (keyword delimited) USPC - 435/18, 29; 530/300, 350; 702/19		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: transmembrane water soluble hydrophobic hydrophilic computational		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y Y A A A P, X	US 2004/0215400 A1 (SLOVIC et al) 28 October 2004 (28.10.2004) entire document PEREZ-AGUILAR et al. "A Computationally Designed Water-Soluble Variant of a G-Protein-Coupled Receptor: The Human Mu Opioid Receptor," PLoS One, 14 June 2013 (14.06.2013), Vol. 8, No. 6, e8809, Pgs. 1-10, entire document ZHANG et al. "Experimental and Computational Evaluation of Forces Directing the Association of Transmembrane Helices," Journal of the American Chemical Society, 24 July 2009 (24.07.2009), Vol. 131, Pgs. 11341-11343, entire document WO 2012/116203 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al) 30 August 2012 (30.08.2012) entire document US 2013/0273585 A1 (GANGAGEN, INC) 17 October 2013 (17.10.2013) entire document ZHANG et al. "The Membrane- and Soluble-Protein Helix-Helix Interactome: Similar Geometry via Different Interactions," Structure, 03 March 2015 (03.03.2015), Vol. 23, Pgs. 527-541 and Supplemental Information, entire document	1, 3, 4 ----- 2 2 1-4, 23-25 1-4, 23-25 1-4, 23-25 1, 3, 4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 30 July 2015		Date of mailing of the international search report 17 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Blaine R. Copenhaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/022780

Specifically, WO 2012/116203 A1 to Massachusetts Institute of Technology et al. discloses a protein (water-soluble membrane proteins, Abstract), CXCR4 (In another embodiment of the invention relates to the treatment of a disease or disorder involving CXCR4-dependent chemotaxis, Pg. 11, Lns. 19-20; Human CXCR4 and our CXCR4 QTY proteins obtained from cell-free production, Pg. 17, Ln. 20), and (1) identifying a first transmembrane region alpha-helical structure of a native transmembrane protein (Determine secondary structure using circular dichroism. We can use circular dichroism (CD) spectral analysis to measure the secondary structures of the purified receptors. CD is a very sensitive technique that is able to detect any small structural changes between the native and mutant receptors, Pg. 16, Lns. 13-15; Use the QTY (Glutamine, threonine and tyrosine) replacement method to systematically change the 7-transmembrane α -helix, Pg. 14, Lns. 1-2).

Further, US 2004/0215400 A1 to Slovic et al. discloses (1) identifying a first transmembrane region by predicting an alpha-helical structure of a native transmembrane protein (In accordance with the invention, a computational process for the water solubilization of membrane proteins involves 1) defining or predicting the backbone structure of a membrane protein, Para. [0004]; a fully automated computational approach is disclosed for water-solubilizing membrane proteins, which are generally applicable to a variety of alpha helical membrane proteins, Para. [0052]); (2) modifying a plurality of hydrophobic amino acids selected to be phenylalanine (F) with a non-ionic polar amino acid selected to be Y (lipid exposed residues...could be mutated without disturbing the structural integrity of the bundle. These residues showed minimal contact with neighboring helices. The sequence design began by choosing Tyr (Y) as a replacement for Phe 32 (F), Para. [0056]; and the decrease...largely results from the mutation of exposed hydrophobic residues to more hydrophilic amino acids, Para. [0112]), to obtain a modified first transmembrane sequence (mutating the transmembrane proteins, native residues or side chains can be replaced by both naturally occurring and non-naturally occurring residues or side chains., Para. [0059]); (3) scoring the propensity of the alpha-helical structure of the first modified transmembrane sequence of (2) to arrive at a structure score (transmembrane domain was considered in the calculation. The top scoring sequence was built onto the backbone structure and analyzed, Para. [0089]; the process of water-solubilization of certain membrane-spanning helices will not alter their global properties and structure, Para. [0078]; this term was applied such that amino acids with higher alpha-helical propensity should contribute favorably to the energy term, Para. [0081]); (4) scoring the water solubility prediction of the first modified transmembrane sequence of (2) to arrive at a solubility score (The energy function used to score sequences is described below and was chosen to optimize both intra- and inter-helical interactions, as well as produce a, Para. [0058]; parameter was set to a value of 0.0. This has the effect of preventing all sequences with a higher hydrophobicity score than the COMP sequence from appearing in the optimal sequence set, Para. [0085]); (5) repeating steps (2) through (4) to arrive at a first library of putative water soluble first modified transmembrane variants (The sequence was optimized using a Monte-Carlo/simulation annealing algorithm run from 700° K to 10 K with linear decrements over 700000 steps. This process was repeated 500 times and the sequences were then ranked and analyzed, Para. [0089]); (6) comparing the structure scores and solubility scores of each putative water soluble first modified transmembrane variants in the first library and (the simplified residue-based pair-wise potential evaluation comprises scoring energies based on a net charge of amino acid side chains and a distance between C-beta atoms of the amino acid side chains, Claim 15; The resulting sequence was compared to 47 aligned K - channel sequences, Para. [0127]); (7) selecting a plurality of putative water soluble first modified transmembrane variants to arrive at a second library of putative water soluble first modified transmembrane variants (A unique sequence was selected from the computed probabilities using recursive calculations. The set of 35 exposed residues was initially targeted for variation, Para. [0127]; The designed water soluble variants of tKcsA are referred to as WSK-1, WSK-2, and WSK-3, Para. [0109]); (8) repeating steps (1) through (7) for a second, third, fourth, fifth, sixth, seventh transmembrane region of the protein (produce a water-soluble variant of PLB, the transmembrane lipid-exposed residues have been computationally mutated from native, hydrophobic, amino acids to polar amino acids. In the absence of a 3-dimensional structure of the PLB pentamer, indirect methods were used to infer which of the transmembrane residues are lipid exposed, Para. [0074]; The sequence was optimized using a Monte-Carlo simulation annealing algorithm... This process was repeated, Para. [0089]); (9) identifying the amino acid sequences of the protein which are not included in any transmembrane region modified in steps (1) through (8), and including any extracellular or intracellular domain of the protein (The side chains of the transmembrane helices of tKcsA were stripped to the backbone, and then rebuilt in accordance with the requirements for function, stability, and water-solubility. The pore-lining residues, the extracellular loops, the intracellular region, and the residues required for binding to AgTx were retained, Para. [0123]); and (10) identifying a nucleic acid sequence for each putative water soluble modified transmembrane variant and each amino acid sequence identified in step (9) (The recombinant techniques include synthesizing a gene encoding for the in-silico designed water soluble transmembrane protein, cloning the gene and introducing the gene into a host cell, Para. [0145]; developed for identifying amino acid probabilities from a given backbone structure, Para. [0111]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of invention to modify the method of Massachusetts Institute of Technology to include the method as taught by Slovic. The motivation would have been to predict the backbone structure of a membrane protein by using computational methods to define a set of mutations that will confer water solubility on the structure while retaining its uniquely folded structure (Slovic, Para. [0004]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/022780

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-4, 19, 23-25, 33-35, 43-45, 53-55, 62-64, 72, and 73 are drawn to a water soluble transmembrane protein and a process of designing the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a water soluble transmembrane protein, and a process for designing the same, wherein the water soluble transmembrane protein comprises extracellular and intracellular regions and eight transmembrane domain variants, wherein the first extracellular domain (EC1) is selected to be SEQ ID NO:3; the first transmembrane domain variant (TM1) is selected to be SEQ ID NO:4; the first intracellular region (IC1) is selected to be SEQ ID NO:12; the second transmembrane domain variant (TM2) is selected to be SEQ ID NO:13; the second extracellular domain (EC2) is selected to be SEQ ID NO:21; the third transmembrane domain variant (TM3) is selected to be SEQ ID NO:22; the second intracellular region (IC2) is selected to be SEQ ID NO:30; the fourth transmembrane domain variant (TM4) is selected to be SEQ ID NO:31; the third extracellular domain (EC3) is selected to be SEQ ID NO:39; the fifth transmembrane domain variant (TM5) is selected to be SEQ ID NO:40; the third intracellular region (IC3) is selected to be SEQ ID NO:48; the sixth transmembrane domain variant (TM6) is selected to be SEQ ID NO:49; the fourth extracellular domain (EC4) is selected to be SEQ ID NO:57; the seventh transmembrane domain variant (TM7) is selected to be SEQ ID NO:58; and the fourth intracellular region (IC4) is selected to be SEQ ID NO:65. It is believed that claims 1-4 and 23-25 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a water soluble transmembrane protein comprising SEQ ID NOS: 3, 4, 12, 13, 21, 22, 30, 31, 39, 40, 48, 49, 57, 58, and 65.

Applicant is invited to elect additional extracellular regions with corresponding SEQ ID NO and/or intracellular regions with corresponding SEQ ID NO and/or transmembrane domain variants with corresponding SEQ ID NO for each water soluble transmembrane protein to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a water soluble transmembrane protein, and a process for designing the same, wherein the water soluble transmembrane protein comprises extracellular and intracellular regions and eight transmembrane domain variants, wherein the first extracellular domain (EC1) is selected to be SEQ ID NO:3; the first transmembrane domain variant (TM1) is selected to be SEQ ID NO:5; the first intracellular region (IC1) is selected to be SEQ ID NO:12; the second transmembrane domain variant (TM2) is selected to be SEQ ID NO:14; the second extracellular domain (EC2) is selected to be SEQ ID NO:21; the third transmembrane domain variant (TM3) is selected to be SEQ ID NO:23; the second intracellular region (IC2) is selected to be SEQ ID NO:30; the fourth transmembrane domain variant (TM4) is selected to be SEQ ID NO:32; the third extracellular domain (EC3) is selected to be SEQ ID NO:39; the fifth transmembrane domain variant (TM5) is selected to be SEQ ID NO:41; the third intracellular region (IC3) is selected to be SEQ ID NO:48; the sixth transmembrane domain variant (TM6) is selected to be SEQ ID NO:50; the fourth extracellular domain (EC4) is selected to be SEQ ID NO:57; the seventh transmembrane domain variant (TM7) is selected to be SEQ ID NO:59; and the fourth intracellular region (IC4) is selected to be SEQ ID NO:65. Additional extracellular regions with corresponding SEQ ID NO and/or intracellular regions with corresponding SEQ ID NO and/or transmembrane domain variants with corresponding SEQ ID NO for each water soluble transmembrane protein will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the extracellular regions, intracellular regions, and the transmembrane domain variants for each water soluble transmembrane protein, "comprising one or more amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS 4-11, 13-20, 22-29, 31-38, 40-47, 49-56, and 58-64" and "comprising one or more amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 69-76, 78-85, 87, 89-96, 98-105, 107-114 and 116-123" and "comprising one or more amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 128-135, 137-144, 146-153, 155-162, 164-171, 173 and 175-182."

The Groups I+ share the technical features of a protein, CXCR4, and (1) identifying a first transmembrane region by predicting an alpha-helical structure of a native transmembrane protein; (2) modifying a plurality of hydrophobic amino acids selected for the group consisting of Leucine (L), isoleucine (I), valine (V), and phenylalanine (F) with a non-ionic polar amino acid selected from the group consisting of Q (or alternatively, N or S), T (or alternatively, N or S), T (or alternatively, N or S) and Y, respectively, to obtain a modified first transmembrane sequence; (3) scoring the propensity of the alpha-helical structure of the first modified transmembrane sequence of (2) to arrive at a structure score; (4) scoring the water solubility prediction of the first modified transmembrane sequence of (2) to arrive at a solubility score; (5) repeating steps (2) through (4) to arrive at a first library of putative water soluble first modified transmembrane variants; (6) comparing the structure scores and solubility scores of each putative water soluble first modified transmembrane variants in the first library and; (7) selecting a plurality of putative water soluble first modified transmembrane variants to arrive at a second library of putative water soluble first modified transmembrane variants; (8) repeating steps (1) through (7) for a second, third, fourth, fifth, sixth, seventh transmembrane region of the protein; (9) identifying the amino acid sequences of the protein which are not included in any transmembrane region modified in steps (1) through (8), and including any extracellular or intracellular domain of the protein; and (10) identifying a nucleic acid sequence for each putative water soluble modified transmembrane variant and each amino acid sequence identified in step (9). However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/022780

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.: 5-18, 20-22, 26-32, 36-42, 46-52, 56-61, 65-71, 74-77
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See Extra Sheets.

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.:
1-4 and 23-25 will be searched to the extent that they read on a water soluble transmembrane protein comprising SEQ ID NOS: 3, 4, 12, 13, 21, 22, 30, 31, 39, 40, 48, 49, 57, 58, and 65.

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/022780

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present invention is directed to water-soluble membrane proteins, methods for the preparation thereof and methods of use thereof. In particular, the method relates to a process for designing a library of water soluble membrane peptides, such as GPCR variants and tetraspanin membrane proteins, using the "QTY Principle," changing the water-insoluble amino acids (Leu, Ile, Val, and Phe) into water-soluble, non-ionic amino acids (Gln, Thr, and Tyr). The invention further encompasses a method of treatment for a disorder or disease that is mediated by the activity a membrane protein in a subject in need thereof, comprising administering to said subject an effective amount of a water-soluble polypeptide described herein.

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	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10

(81) 指定国 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . S M A L L T A L K

(72) 発明者 チャン, シュウガン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 2 5 パウカー ストリート

(72) 発明者 タオ, フェイ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, # 1, 3 3 ワシントン アベニュー

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 EA20 FA74