

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6263773号
(P6263773)

(45) 発行日 平成30年1月24日 (2018. 1. 24)

(24) 登録日 平成30年1月5日 (2018. 1. 5)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/705 (2006. 01)

C O 7 K 14/705 Z N A

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-555565 (P2013-555565)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)
 (65) 公表番号 特表2014-508763 (P2014-508763A)
 (43) 公表日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/026353
 (87) 国際公開番号 W02012/116203
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 審査請求日 平成27年2月19日 (2015. 2. 19)
 (31) 優先権主張番号 61/445, 740
 (32) 優先日 平成23年2月23日 (2011. 2. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513210264
 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 O
 2 1 4 2 - 1 4 9 3, ケンブリッジ, ルー
 ム ノースイースト 1 8 - 5 0 1, ケン
 ドール スクエア, ワン ケンブリッジ
 センター
 (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 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およびその調製および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G タンパク質共役型受容体 (G P C R) の水溶性変異体であって、前記変異体において、親水性面に面している前記 G P C R の - ヘリックス位置 b、c、及び f であって、位置 a、d、e、及び g ではない位置で、7 回膜貫通 - ヘリックスの疎水性残基のロイシン (L)、イソロイシン (I)、バリン (V)、及びフェニルアラニン (F) が、グルタミン (Q)、スレオニン (T)、スレオニン (T)、及びチロシン (Y) によってそれぞれ置換されている、変異体。

【請求項 2】

前記 G P C R の生物活性を有する、請求項 1 に記載の変異体。

10

【請求項 3】

前記生物活性はリガンド結合である、請求項 2 に記載の変異体。

【請求項 4】

前記変異体は前記 G P C R の前記リガンド結合の活性のうち少なくとも幾つかを保持する、請求項 3 に記載の変異体。

【請求項 5】

前記変異体の p I は前記 G P C R の p I と実質的に同一である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体。

【請求項 6】

前記変異体の他の部分において追加的な保存的変異のあることを更に含む、請求項 1 ~

20

4 のいずれか 1 項に記載の変異体。

【請求項 7】

前記 GPCR が哺乳類受容体である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の変異体。

【請求項 8】

前記 GPCR が、プリン受容体 (P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆)、M₁ および M₃ ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンビンに対する受容体 [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、代謝グルタミン酸受容体、GRK5、GPCR - 30、および C - X - C ケモカイン受容体型 4 (CXCR4) からなる群から選択される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の変異体。

10

【請求項 9】

前記 GPCR は C - X - C ケモカイン受容体型 4 (CXCR4) である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の変異体。

20

【請求項 10】

少なくとも 1 つの膜貫通領域が配列番号 3, 4, 5, 6 又は 8 を有する、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 11】

前記 GPCR の活性により媒介される障害又は疾患に罹患した哺乳類の治療用医薬製造での、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の前記水溶性変異体の使用。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の有効量の前記変異体及び薬学的に許容可能な希釈剤又は担体を含む医薬組成物。

30

【請求項 13】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の水溶性変異体の調整法であって、

親水性面に面している前記 GPCR の - ヘリックス位置 b、c、及び f であって、位置 a、d、e、及び g ではない位置で、7 回膜貫通 - ヘリックスの疎水性残基のロイシン (L)、イソロイシン (I)、バリン (V)、及びフェニルアラニン (F) をグルタミン (Q)、スレオニン (T)、スレオニン (T)、及びチロシン (Y) によってそれぞれ置換することを含む、調整法。

【請求項 14】

リガンド結合を測定することを更に含む、請求項 13 に記載の調整法。

40

【請求項 15】

前記 GPCR は無細胞系を使用して調整されることを特徴とする、請求項 13 又は 14 に記載の調整法。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の変異体を発現させるためのトランスフェクトされた細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願 (複数可)

50

本出願は、2011年2月23日に出願された米国特許仮出願第61/445,740号の恩典を主張する。上記出願（複数可）の教示は全て、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

膜タンパク質は、全ての生物系において極めて重要な役割を果たす。ほとんど全ての配列決定されたゲノムにおける全ての遺伝子の約30%が、膜タンパク質をコードする。しかしながら、それらの構造および機能の我々詳細にわたる理解は、可溶性タンパク質のそれに大きく遅れを取っている。2012年2月現在で、プロテインデータバンク(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)には79,500を超える構造が存在するが、しかしながら、8つのGタンパク質共役型受容体を含む、320の特有の構造を有する952の膜タンパク質構造が存在するにすぎない。ヒトには約400の機能的嗅覚受容体が存在するが、1つの嗅覚受容体も決定されていない。

10

【0003】

嗅覚受容体の構造および機能ならびにそれらの認識および匂い物質結合特性を解明するにはいくつかの支障があるが、それらは非常に興味深い。最も重要で骨の折れる課題は、ミリグラム量の可溶性の安定な受容体を生成させるのが非常に困難であることである。安価な大量生産法が、切に必要とされており、よって、広範囲の研究の焦点となっている。これらの初期の障害が克服された時にのみ、詳細な構造研究を実施することができる。よって、当技術分野では、Gタンパク質共役型受容体、例えば嗅覚受容体を研究する改善された方法が必要である。

20

【発明の概要】

【0004】

本発明は、水溶性膜ペプチド、前記ペプチドを含む組成物、その調製方法およびその使用方法に関する。

【0005】

本発明は、修飾 - ヘリックスドメインを含む水溶性ポリペプチドを包含し、修飾 - 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1つ以上の疎水性アミノ酸残基が、1つ以上の親水性アミノ酸残基と置換されたアミノ酸配列を含む。本発明はまた、天然膜タンパク質の - ヘリックスドメイン内の1つ以上の疎水性アミノ酸残基を1つ以上の親水性アミノ酸残基と置換させることを含む、水溶性ポリペプチドを調製する方法を包含する。本発明はさらに、天然膜タンパク質の - ヘリックスドメイン内の1つ以上の疎水性アミノ酸残基を1つ以上の親水性アミノ酸残基と置換することにより調製したポリペプチドを包含する。

30

【0006】

本発明はさらに、治療に必要な被験体において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ための治療方法であって、前記被験体に有効量の、修飾 - ヘリックスドメインを含む水溶性ポリペプチドを投与することを含む方法を包含し、修飾 - ヘリックスドメインは、膜タンパク質の - ヘリックスドメイン内の1つ以上の疎水性アミノ酸残基が1つ以上の親水性のアミノ酸残基と置換されたアミノ酸配列を含む。ある態様では、水溶性ポリペプチドは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り治療することができる障害および疾患の例としては、癌（例えば、小細胞肺癌、メラノーマ、トリプルネガティブ乳癌）、Parkinson病、心血管疾患、高血圧、および気管支喘息が挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0007】

本発明はまた、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剤を含む医薬組成物を包含する。

【0008】

いくつかの態様では、 - ヘリックスドメインは7回膜貫通 - ヘリックスドメインである。追加の実施形態では、天然膜タンパク質はGタンパク質共役型受容体（GPCR）

50

である。この実施形態のいくつかの態様では、GPCRは下記を含む群から選択される：プリン受容体（ $P2Y_1$ 、 $P2Y_2$ 、 $P2Y_4$ 、 $P2Y_6$ ）、 M_1 および M_3 ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンビンのための受容体〔プロテアーゼ活性化受容体（ PAR ）- 1、 PAR - 2〕、トロンボキサン（ TXA_2 ）、スフィンゴシン - 1 - リン酸（ SP_2 、 SP_3 、 SP_4 および SP_5 ）、リゾホスファチジン酸（ LPA_1 、 LPA_2 、 LPA_3 ）、アンジオテンシンII（ AT_1 ）、セロトニン（5 - HT_{2c} および5 - HT_4 ）、ソマトスタチン（ sst_5 ）、エンドセリン（ ET_A および ET_B ）、コレシストキニン（ CK_1 ）、 V_{1a} バソプレシン受容体、 D_5 ドパミン受容体、fMLPホルミルペプチド受容体、 GAL_2 ガラニン受容体、 EP_3 プロスタノイド受容体、 A_1 アデノシン受容体、 α_1 アドレナリン受容体、 BB_2 ボンベシン受容体、 B_2 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、 NK_1 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、代謝グルタミン酸受容体、 $GPR5$ 、 $GPCR - 30$ 、および $CXCR4$ 。さらに追加の実施形態では、天然膜タンパク質または膜タンパク質は、内在性膜タンパク質である。さらなる態様では、天然膜タンパク質は哺乳類タンパク質である。さらに別の態様では、天然膜タンパク質は嗅覚受容体である。追加の実施形態では、嗅覚受容体は $mOR103 - 15$ である。

【0009】

いくつかの態様では、親水性残基（天然膜タンパク質の - ヘリックスドメイン中の1つ以上の疎水性残基にとって代わる）は、グルタミン（ Q ）、スレオニン（ 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より選択される。追加の態様では、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1つ以上の疎水性残基が置換される。

【0010】

ある実施形態では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のフェニルアラニン残基がチロシンと置換される。ある追加の実施形態では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のイソロイシンおよび/またはバリン残基は、スレオニンと置換される。さらに追加の態様では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のフェニルアラニン残基はチロシンと置換され、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のイソロイシンおよび/またはバリン残基は、スレオニンと置換される。追加の実施形態では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のロイシン残基は、グルタミンと置換される。さらに追加の実施形態では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のロイシン残基は、グルタミンと置換され、タンパク質の1つ以上のイソロイシンおよび/またはバリン残基はスレオニンと置換される。さらなる実施形態では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のロイシン残基はグルタミンと置換され、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のフェニルアラニン残基はチロシンと置換される。さらに追加の態様では、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のロイシン残基は、グルタミンと置換され、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のフェニルアラニン残基は、チロシンと置換され、タンパク質の - ヘリックスドメインの1つ以上のイソロイシンおよび/またはバリン残基は、スレオニンと置換される。

【0011】

追加の実施形態では、水溶性ポリペプチドは天然膜タンパク質の生物活性の少なくともいくつかを保持する。この実施形態の一態様では、水溶性ポリペプチドは、通常、天然膜タンパク質に結合するリガンドに結合する能力を保持する。別の実施形態では、天然膜タンパク質の潜在的なリガンド結合部位内の1つ以上のアミノ酸は置換されない。この実施形態の一態様では、潜在的なリガンド - 結合部位内の置換されない1つ以上のアミノ酸を有する天然膜タンパク質の例は、プリン受容体（ $P2Y_1$ 、 $P2Y_2$ 、 $P2Y_4$ 、 $P2Y_6$ ）、 M_1 および M_3 ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンビンのための受容体〔プロテアーゼ活性化受容体（ PAR ）- 1、 PAR - 2〕、トロンボキサン（ TXA_2 ）

10

20

30

40

50

、スフィンゴシン - 1 - リン酸 (S 1 P ₂、S 1 P ₃、S 1 P ₄ および S 1 P ₅)、リゾホスファチジン酸 (L P A ₁、L P A ₂、L P A ₃)、アンジオテンシン I I (A T ₁)、セロトニン (5 - H T _{2c} および 5 - H T ₄)、ソマトスタチン (s s t ₅)、エンドセリン (E T _A および E T _B)、コレシストキニン (C C K ₁)、V _{1a} バソプレシン受容体、D ₅ ドパミン受容体、f M L P ホルミルペプチド受容体、G A L ₂ ガラニン受容体、E P ₃ プロスタノイド受容体、A ₁ アデノシン受容体、₁ アドレナリン受容体、B B ₂ ボンベシン受容体、B ₂ 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、K S H V - O R F 7 4 ケモカイン受容体、N K ₁ タキキニン受容体、甲状腺刺激ホルモン (T S H) 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 2 B 受容体、P 2 Y プリン受容体、代謝グルタミン酸受容体、G R K 5、G P C R - 3 0、および C X C R 4 である。

10

【 0 0 1 2 】

別の実施形態では、天然膜タンパク質の潜在的な匂い物質結合部位内の 1 つ以上のアミノ酸は置換されない。

【 0 0 1 3 】

1 つの実施形態では、修飾 - ヘリックスドメインを含む水溶性ポリペプチドは、M E R R N H T G R V S E F V L L G F P A P A P Q R A L Q F F Q S L Q A Y V Q T L T E N I Q T I T A I R N H P T L H K P M Y Y F L A N M S F Y L E T W Y T T V T T P K M Q A G Y I G S E E N H G Q L I S F E A C M T Q L Y F F Q G L G C T E C T L L A V M A Y D R Y V A T C H P L H Y P V I V S S R Q C V Q M A A G S W A G G F G T S M T V K V Y Q I S R L S Y C G P N T I N H F F C D V S P L L N L S C T D M S T A E L T D F I L A I F I L L G P L S V T G A S Y M A I T G A V M R I P S A A G R H K A F S T C A S H L T T V I T Y Y A A S I Y T Y A R P K A L S A F D T N K L V S V L Y A V I V P L L N P I I Y C L R N Q E V K K A L R R T L H L A Q G D A N T K K S S R D G G S S G T E T S Q V A P A (配列番号 : 2) のアミノ酸配列を含む。さらに追加の実施形態では、修飾 7 回膜貫通 - ヘリックスドメインを含む水溶性ポリペプチドは、下記アミノ酸配列の 1 つ以上を含む：

20

- a . P Q R A L Q F F Q S L Q A Y V Q T L T E N I Q T I T A I R (配列番号 : 3)
- b . M Y Y F L A N M S F Y L E T W Y T T V T T P K M Q A G Y I (配列番号 : 4)
- c . C M T Q L Y F F Q G L G C T E C T L L A V M A Y D R Y V A T C (配列番号 : 5)
- d . R Q C V Q M A A G S W A G G F G T S M T V K V Y Q (配列番号 : 6)
- e . L T D F I L A I F I L L G P L S V T G A S Y M A I T G A V (配列番号 : 7)
- f . H K A F S T C A S H L T T V I T Y Y A A S I Y T Y (配列番号 : 8)
- g . T N K L V S V L Y A V I V P L L N P I I Y C L R N (配列番号 : 9)。

30

【 0 0 1 4 】

本発明のある態様では、水溶性ペプチドの二次構造が決定される。いくつかの実施形態では、二次構造は、円二色性を使用して決定される。

【 0 0 1 5 】

40

ある実施形態では、水溶性ポリペプチドへのリガンド結合が測定される。いくつかの態様では、水溶性ポリペプチドのリガンド結合親和性が、天然タンパク質のそれと比較される。追加の態様では、リガンド結合は、マイクロスケール熱泳動、カルシウム流入アッセイまたはそれらの任意の組み合わせを使用して測定される。

【 0 0 1 6 】

さらに追加の実施形態では、本発明は、修飾 - ヘリックスドメインを含む水溶性ペプチドでトランスフェクトされた細胞を包含する。ある実施形態では、細胞は、哺乳類細胞である。トランスフェクトさせることができる哺乳類細胞の 1 つの例は H E K 2 9 3 細胞である。

【 0 0 1 7 】

50

本発明の前記および他の目的、特徴および利点は、添付の図面（同様の参照文字は、異なる図面を通して同じ部分を示す）において図示される、本発明の好ましい実施形態の下記のより特定の説明により明らかになるであろう。図面は、必ずしも正確な縮尺ではなく、代わりに、本発明の原理の説明に重きが置かれる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】天然mOR103-15およびグルタミン、スレオニンおよびチロシン（QTY）置換を用いた変異mOR103-15のアミノ酸配列を示す。7回膜貫通 - ヘリックス上の重要な残基を体系的に変異させるQTY置換の使用は、不水溶性嗅覚受容体を水溶性のものに変換する。我々は、b、c、fの位置を、より水溶性の残基Q、T、Yと変更させただけである。これらの位置は、ヘリックスの親水性面上に存在する。我々は、疎水性面上にある位置a、d、e、gを維持する。これらの変更は、個々の - ヘリックスを維持する可能性がある。変異は、受容体配列の上部に青色大文字で標識される。小文字a b c d e f gは、ヘリカルホイール位置である。下線は、7回膜貫通 - ヘリックスの場所である。数字（8、7、3、5、4、5、4）は、各 - ヘリックスにおける変異である。36 - 残基変更、総340残基の約10.5%が存在する。

【図2】QTY置換嗅覚受容体mOR103-15の分子モデルを示す。7回膜貫通ヘリックスセグメントにおいて総計36の変異がなされた（約10.5%）。これらの変異は、荷電残基を変更せず、そのため、変異体受容体質量およびpIはほとんど不変のままである。アミノ酸Q、T、およびYの分子形状およびサイズは、L、V/IおよびYに非常に類似し、そのため、全体的な局所形状変更は最小に抑えられている。C末端の20アミノ酸のセグメントは、明確にするためにモデル化されていない。

【図3A-C】A) QTY置換の上面図およびB) QTY置換の側面図である。変異は、ヘリックスの片側のみに存在することに注意されたい。変異のない天然受容体は₁ アドレナリン受容体に類似する折り畳み構造を有し、一方、変異後、構造は₂ アドレナリン受容体に類似する。C) 重ねられた天然mOR103-15（赤）およびmOR103-15の設計されたQTY変異（青）のシミュレートされた構造である。全体の構造差は約0.8 Å 平均である。

【図4】CXCR4およびCXCR4-QTYの設計されたQTY変異の円二色性スペクトルを示す。

【図5】天然CXCR4とQTY変異を有するCXCR4（配列番号：10：CXCR4-QTY）の間の分子量の比較を示すSDSゲルである。

【図6】不水溶性膜形態CXCR4を水溶性形態に変換するための、7回膜貫通 - ヘリックス上の重要な残基を体系的に変異させ、他の疎水性残基はほとんど変異させないQTY置換の使用を示す。A) 我々は、位置b、c、fをより水溶性の残基Q、T、Yと変更させた。我々は、位置a、d、e、gを変更しない。これらの位置は、個々の - ヘリックスの特異的なクラスター化を維持すると考えられる。B) 膜形態CXCR4（赤）およびQTY水溶性CXCR4（青）の重ね合わせ。配列中、C) 天然残基は、赤色文字で標識され、D) 変異は、青色文字で標識される。352残基中、総計29QTY変異が、7回膜貫通ヘリックスセグメントにおいて実施された（約8.2%）。これらの変異は荷電残基を変更せず、よって変異体受容体質量およびpIはほとんど不変のままである。アミノ酸Q、T、およびYの分子形状およびサイズは、L、V/IおよびYに非常に類似し、そのため、全体的な局所形状変更は最小に抑えられている。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の好ましい実施形態の説明は下記の通りである。

【0020】

「1つの（「a」または「an」）」という単語は別記されない限り、1つ以上を包含することが意味される。

【0021】

いくつかの態様では、本発明は、天然タンパク質の7回膜貫通 - ヘリックス疎水性残基ロイシン (L)、イソロイシン (I)、バリン (V)、およびフェニルアラニン (F) を親水性残基グルタミン (Q)、スレオニン (T) およびチロシン (Y) に体系的に変更するための、Q T Y (グルタミン、スレオニンおよびチロシン) 置換方法の使用に関する。この発明は、天然膜タンパク質を不水溶性のものから水溶性の対応物に変換する。

【0022】

本発明の別の革新は、不水溶性嗅覚受容体 mOR 103 - 15 を、約 10 . 5 % の特異残基変更 (36aa / 340aa) を有する水溶性のものに変換することである。これは体系的におよび選択的に、通常親水性面に面している - ヘリックス位置 b、c、f の重要な残基を変更させ、一方、 - ヘリックス位置 a、d、e、g の疎水性残基を維持することにより達成されるであろう。合成生物学設計方法は一般的であり、他の嗅覚受容体および G タンパク質共役型受容体の研究に広く適用することができる。この戦略は、嗅覚受容体、ならびに追加の GPCR および他の膜タンパク質の結晶化の障害を克服する可能性を有する。

【0023】

我々は、不水溶性嗅覚受容体を、約 10 . 5 % の残基変更 (36aa / 340aa) を有する水溶性のものに変換するために、合成生物学方法を使用した (図1および2)。我々は、体系的におよび選択的に、 - ヘリックス位置 b、c、f (通常、親水性面を形成する) の重要な残基を変更したが、 - ヘリックス位置 a、d、e、g の疎水性残基を維持した (図1)。我々の合成生物学設計方法は、本来は一般的であり、よって、他の嗅覚受容体、ケモカイン CXCR4 ならびに他の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) および他の膜タンパク質の研究に広く適用可能である。この単純な戦略は、変換された水溶性膜タンパク質が生物学的に機能的なままである場合、嗅覚受容体、GPCR、および他の膜タンパク質の構造研究の障害を部分的に克服し得る。

【0024】

嗅覚受容体の構造的な側面およびそれらの結合特性の研究を促進するために、我々は Q T Y 置換方法を使用して水溶性 7 - 束ヘリックス嗅覚受容体 mOR 103 - 15 を設計する (図1 - 3)。7つのアミノ酸は - ヘリックス形成傾向 (32) を有することが知られている: ロイシン (L) (1 . 30)、グルタミン (Q) (1 . 27)、フェニルアラニン (F) (1 . 07)、チロシン (Y) (0 . 72)、イソロイシン (I) (0 . 97)、バリン (V) (0 . 91) およびスレオニン (T) (0 . 82)。我々はまた Q、Y および T の側鎖は全て、水と水素結合を形成することができることを知っている: Q は 4 H - 結合を形成することができ (- NH₂ 由来の 2 H - 供与体、C = O 由来の 2 H - 受容体)、ならびに T および Y は、それぞれ、3 H - 結合を形成することができる (- OH、 - H 由来の 1 - H 供与体および - O 由来の 2 受容体)。Q、T、Y 残基 L、F、I、または V よりも水溶性であり、それらは、それらの側鎖と水素結合を形成することができない。提案した置換は、正または負電荷変更を有さない。さらに、分子形状およびサイズは、対で非常に類似する: ロイシン / グルタミン、フェニルアラニン / チロシン、バリン / スレオニン、およびイソロイシン / スレオニン (33 - 34)。よって、提案した変更は、全体のヘリックス構造を維持したまま、7回膜貫通 - ヘリックスの溶解度を増加させる (図3C)。

【0025】

この可溶性嗅覚受容体設計では、我々は下記置換を実施した: フェニルアラニン ~ チロシン (F - > Y)、イソロイシン / バリン ~ スレオニン (I / V - > T)、およびロイシン ~ グルタミン (L - > Q)。水溶性嗅覚受容体の二次構造を調査すること、ならびにその匂い物質結合能力の測定することができる。匂い物質結合が Q T Y 置換を用いて検出される場合、我々は、元の構造の重要な構成要素を保存した可能性がある。天然嗅覚受容体を有する設計された水溶性嗅覚受容体の二次構造および結合を調製することができる。ミリグラム量の水溶性受容体を生成させることができ、結晶スクリーンを匂い物質有無で設定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

1つの実施形態では、天然膜タンパク質はGタンパク質共役型受容体（GPCR）である。さらに別の実施形態では、天然膜タンパク質は嗅覚受容体である。いくつかの実施形態では、嗅覚受容体は哺乳類受容体である。さらに別の実施形態では、嗅覚受容体はmOR103-15である。ある態様では、水溶性ポリペプチドは、天然膜タンパク質の生物活性の少なくともいくつかを保持する。さらに別の態様では、膜タンパク質は、疾患または病状を媒介する膜受容体である。

【 0 0 2 7 】

さらなる実施形態では、天然膜タンパク質は、下記を含む群から選択されたGPCRである：プリン受容体（P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆）、M₁およびM₃ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンピンに対する受容体[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、代謝グルタミン酸受容体、GRK5、GPCR-30、およびCXCR4。さらなる実施形態では、本発明は、本明細書に記載される医薬組成物または治療の方法に関し、天然膜タンパク質は、下記を含む群から選択されるGPCRである：プリン受容体（P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆）、M₁およびM₃ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンピンに対する受容体[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、代謝グルタミン酸受容体、GRK5、GPCR-30、およびCXCR4。

【 0 0 2 8 】

別の実施形態では、水溶性ポリペプチドは、膜タンパク質のリガンド結合活性の少なくともいくつかを保持する。いくつかの実施形態では、GPCRは哺乳類受容体である。

【 0 0 2 9 】

さらなる実施形態では、天然膜タンパク質の潜在的なリガンド結合部位内の1つ以上のアミノ酸は置換されない。この実施形態の一態様では、1つ以上のアミノ酸が置換されない潜在的なリガンド-結合部位を有する天然膜タンパク質の例としては、プリン受容体（P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆）、M₁およびM₃ムスカリン性アセチルコリン受容体、トロンピンに対する受容体[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

10

20

30

40

50

ン (CCK₁)、V_{1a} バソプレシン受容体、D₅ ドパミン受容体、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、P_{2Y} プリン受容体、代謝グルタミン酸受容体、GRK5、GPCR-30、および CXCR4 が挙げられる。

【0030】

本発明はさらに、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ための治療方法であって、前記障害および疾患を治療するための水溶性ポリペプチドの使用を含む方法

10

を包含し、前記水溶性ポリペプチドは、修飾 - ヘリックスドメインを含み、前記水溶性ポリペプチドは、天然膜タンパク質のリガンド結合活性を保持する。そのような障害および疾患の例としては、癌、小細胞肺癌、メラノーマ、乳癌、Parkinson 病、心血管疾患、高血圧、および喘息が挙げられるが、それらに限定されない。

【0031】

本明細書で記載されるように、本明細書で記載される水溶性ペプチドは、膜タンパク質の活性により媒介される病状または疾患の治療のために使用することができる。ある態様では、水溶性ペプチドは、膜受容体のための「デコイ」として作用し、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。そのようなものとして、本明細書で記載される水溶性ペプチドは、膜タンパク質の活性を低減させるために使用することができる。これ

20

らの水溶性ペプチドは、循環血液中にとどまり、特異リガンドに結合することができ、よって、膜結合型受容体の活性が低減される。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。水溶性ペプチド、例えば本明細書で記載されるものによる、このリガンドの結合は著しく、転移を低減させ得る。

【0032】

ケモカイン受容体、CXCR4 は、ウイルス研究において T 細胞株向性 HIV の侵入のための主な共受容体として知られている (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)。T ストロマ細胞由来因子 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 CXCR4 に結合すると、CXCR4 は G_i タンパク質媒介シグナル伝達を活性化し (百日咳毒素感受性) (Chen, et al. (1998) Mol Pharmacol 53: 177-181)、これには下流キナーゼ経路、例えばリンパ球、巨核球、および造血幹細胞における、Ras / MAP 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 (PI3K) / Akt が含まれる (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)。ヒトリンパ節が移植されたマウスでは、SDF-1 は、移植リンパ節への CXCR4 陽性細胞移動を誘発する (Blades, et al. (2002) J. Immunol. 168: 4308-4317)。

30

40

【0033】

最近、研究により、CXCR4 相互作用は、転移細胞の移動を制御し得ることが示されている。低酸素、酸素分圧の低減は、ほとんどの固形腫瘍で起こる微小環境変化であり、腫瘍血管新生および治療抵抗性の主なインデューサーである。低酸素は、CXCR4 レベルを増加させる (Staller, et al. (2003) Nature 425: 307-311)。転移活性の上昇を有する骨転移モデル由来の細胞の亜集団でのマイクロアレイ解析により、転移性形質において増加した遺伝子の 1 つは CXCR4 であったことが示された。さらに、単離された細胞における過剰発現 CXCR4 は、転移活性を著しく増加させた (Kang, et al. (2003) Cancer Cell 3:

50

537-549)。様々な乳癌患者から収集した試料では、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と比較して原発腫瘍において高くなることを見出した。さらに、C X C R 4 抗体治療は、全てリンパ節および肺へ転移した対照アイソタイプと比較すると、局所リンパ節への転移を阻害することが示されている (Muller, et al. (2001))。そのようなものとして、デコイ療法モデルは、C X C R 4 媒介疾患および障害を治療するのに好適である。

【 0 0 3 4 】

本発明の別の実施形態では、C X C R 4 依存走化性と関連する疾患または障害の治療に関し、ここで、疾患は、異常白血球動員または活性化と関連する。疾患は下記からなる群より選択される：関節炎、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、C r o h n 病、アレルギー、喘息、A I D S 関連脳炎、A I D S 関連斑点状丘疹性皮疹、A I D S 関連間質性肺炎、A I D S 関連腸疾患、A I D S 関連門脈周囲肝炎およびA I D S 関連糸球体腎炎。

10

【 0 0 3 5 】

別の態様では、本発明は、下記から選択される疾患または障害の治療に関する：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、P a r k i n s o n 病、A l z h e i m e r 病、腫瘍、線維腫、星状細胞腫、骨髓腫、神経膠芽腫、炎症疾患、臓器移植拒絶、A I D S、H I V - 感染または血管新生。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、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剤を含む医薬組成物を包含する。

20

【 0 0 3 7 】

組成物はまた、所望の製剤によって、薬学的に許容される、無毒担体または希釈剤を含むことができ、これらは、動物またはヒト投与のために、医薬組成物を製剤化するために一般に使用されるビヒクルとして規定される。希釈剤は、薬理学的作用物質または組成物の生物活性に影響しないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、生理的リン酸緩衝食塩水、R i n g e r 液、デキストロース溶液、およびH a n k 液である。さらに、医薬組成物もしくは製剤はまた、他の担体、アジュバント、または無毒、非治療的、非免疫原性安定剤などを含み得る。医薬組成物はまた、大きな、ゆっくり代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖、例えばキトサン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えば、ラテックス機能化S E P H A R O S E（商標）、アガロース、セルロース、など）、ポリマーアミノ酸、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）を含むことができる。

30

【 0 0 3 8 】

組成物は、非経口的に、例えば、例として、静脈内、筋内、くも膜下腔内または皮下注射により投与することができる。非経口投与は、組成物を溶液または懸濁液に組み入れることにより達成することができる。そのような溶液または懸濁液はまた、無菌希釈剤、例えば注射用の水、生理食塩水、固定油、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溶媒を含み得る。非経口製剤はまた、抗菌薬、例えば、例としてベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、例えば、例として、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムおよびキレート剤、例えばE D T Aを含むことができる。緩衝液、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および浸透圧を調節するための薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロースもまた添加され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回投与バイアルに封入させることができる。

40

【 0 0 3 9 】

さらに、補助的物質、例えば湿潤剤または乳化剤、表面活性剤、p H 緩衝物質などが、組成物中に存在することができる。医薬組成物の他の構成要素は、石油、動物、植物、または合成起源のもの、例えば、ピーナツ油、大豆油、および鉱物油である。一般に、グリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールは、特に注射用溶液

50

のために、好ましい液体担体である。

【 0 0 4 0 】

注射用製剤は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして調製することができ；注射前に、液体ピヒクル中に溶解、または懸濁させるのに好適な固体形態もまた、調製することができる。調製物はまた、上記で記載されるように、アジュバント効果を増強させるために、リポソームまたは微小粒子、例えばポリ乳酸、ポリグリコリド、またはコポリマー中で乳化またはカプセル化させることができる。Langer, Science 249: 1527, 1990 and Hanes, Advanced Drug Delivery

Reviews 28: 97-119, 1997。本明細書で記載される組成物および薬理学的作用物質は、蓄積注射またはインプラント調製物の形態で投与することができ、これらは、活性成分の持続またはパルス放出を可能にするような様式で製剤化させることができる。

10

【 0 0 4 1 】

経皮投与は、皮膚を介する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。経皮送達は、皮膚パッチを使用して、またはトランスフェロソームを使用して達成することができる[Paul et al., Eur. J. Immunol. 25: 3521-24, 1995; Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-15, 1998]。

【 0 0 4 2 】

「治療すること」または「治療」は、疾患の症状、合併症、または生化学徴候の発症の防止または遅延、症状の軽減または寛解または疾患、病状または障害のさらなる進行の抑止または阻止を含む。「患者」は、治療の必要なヒト被験体である。

20

【 0 0 4 3 】

「有効量」は、障害の1つ以上の症状を寛解させる、および/または障害の進行を防止する、障害の退行を引き起こす、および/または所望の効果を達成するのに十分な治療薬の量を示す。

【 0 0 4 4 】

本発明は、下記実施例と関連させると、よりよく理解されるであろう。実施例は、説明にすぎず、本発明の範囲を制限することを意図しない。開示した実施形態に対する様々な変更および改変は、当業者には明らかであり、そのような変更は、発明の精神および添付の特許請求の範囲から逸脱せずに、なされ得る。

30

【 0 0 4 5 】

実施例

実施例 1：嗅覚受容体のリガンド結合特性の系統的分析

生化学、生物物理および構造解析のために、Q（グルタミン）T（スレオニン）Y（チロシン）Q T Y置換を使用して、不水溶性嗅覚受容体を水溶性のものに変換する。我々の特定の目的は下記である：

1）7回膜貫通 - ヘリックス疎水性残基ロイシン（L）、イソロイシン（I）、バリン（V）、およびフェニルアラニン（F）を親水性残基グルタミン（Q）、スレオニン（T）およびチロシン（Y）に体系的に変更させるために、Q T Y（グルタミン、スレオニンおよびチロシン）置換方法を使用すること。この方法は、タンパク質を不水溶性嗅覚受容体から水溶性のものに変換する。

40

2）市販の無細胞インビトロ翻訳系（Invitrogen and Qiagen）を用いて、ミリグラム量の天然およびバイオ工学処理嗅覚受容体を生成および精製すること。

3）円二色性（CD）を用いて精製嗅覚受容体の二次構造を決定すること。

4）マイクロスケール熱泳動を用いて、天然およびバイオ工学処理嗅覚受容体変異体の結合親和性を決定すること。

5）天然および変異OR遺伝子をHEK293細胞にトランスフェクトし、およびカルシウム流入アッセイを使用して、天然および変異嗅覚受容体の匂い物質活性化を測定すること。これらの測定は、マイクロスケール熱泳動結合データを細胞内の機能的応答に相関さ

50

せる。

6) 匂い物質の有無および界面活性剤の有無における結晶化条件のために、天然およびバイオ工学処理嗅覚受容体を体系的にスクリーニングすること。

【0046】

研究戦略

QTY置換を使用して、可溶性7-ヘリックス束嗅覚受容体mOR103-15を設計すること。我々の研究の革新は、不溶性嗅覚受容体mORI03-15を、約10.5%特異残基変更(36aa/340aa)を有する水溶性のものに変換することである。我々は、通常、親水性面に面する-ヘリックス位置b、c、fの重要な残基を体系的におよび選択的に変更させ、一方、-ヘリックス位置a、d、e、gの疎水性残基を維持した。我々の合成生物学設計方法は、一般的であり、他の嗅覚受容体およびGタンパク質共役型受容体の研究に広く適用可能である。この戦略は、嗅覚受容体、ならびに追加のGPCRおよび他の膜タンパク質を結晶化する障害を克服する可能性を有する。配列の溶解度を変更する我々の設計は、ヘリカルホイールのb、c、f位置に焦点を当てているが、配列の他の部分へのいくつかのさらなる変更が、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の機能または構造に著しく影響せずに可能である。例えば保存的変異が可能である。

【0047】

実験的アプローチ

1) QTY置換を使用して、水溶性7-ヘリックス束嗅覚受容体mOR103-15を設計すること。我々は、合成生物学方法を使用して不溶性嗅覚受容体を、約10.5%の残基変更(36aa/340aa)を有する水溶性のものに変換した(図1-3)。我々は、-ヘリックス位置b、c、f(通常、親水性面を形成する)の重要な残基を体系的におよび選択的に変更させたが、-ヘリックス位置a、d、e、gの疎水性残基を維持した(図1)。我々の合成生物学設計方法は、本来一般的であり、よって、他の嗅覚受容体および他のGタンパク質共役型受容体(GPCR)の研究に広く適用可能である。この単純な戦略は、変換された水溶性膜タンパク質が生物学的に機能的なままである場合、嗅覚受容体、GPCR、および他の膜タンパク質の構造研究の障害を部分的に克服し得る。

【0048】

嗅覚受容体の構造的側面およびそれらの結合特性の研究を促進するために、我々は、QTY置換方法を使用して、水溶性7-束ヘリックス嗅覚受容体mORI03-15(図1-3)を設計することができる。7つのアミノ酸は-ヘリックス形成傾向を有することが知られている(32):ロイシン(L)(1.30)、グルタミン(Q)(1.27)、フェニルアラニン(F)(1.07)、チロシン(Y)(0.72)、イソロイシン(I)(0.97)、バリン(V)(0.91)およびスレオニン(T)(0.82)。我々はまたQ、YおよびTの側鎖は全て、水と水素結合を形成することができることを知っている:Qは4H-結合を形成することができ(-NH₂由来の2H-供与体、C=O由来の2H-受容体)、ならびにTおよびYは、それぞれ、3H-結合を形成することができる(-OH、-H由来の1-H供与体および-O由来の2受容体)。Q、T、Y残基はL、F、I、またはVよりも水溶性であり、それらは、それらの側鎖と水素結合を形成することができない。置換は、正または負電荷変更を有さない。さらに、分子形状およびサイズは、対で非常に類似する:ロイシン/グルタミン、フェニルアラニン/チロシン、バリン/スレオニン、およびイソロイシン/スレオニン。よって、変更は、全体のヘリックス構造を維持したまま、7回膜貫通-ヘリックスの溶解度を増加させる。

【0049】

この可溶性嗅覚受容体設計では、我々は下記置換を実施した:ロイシン->グルタミン(L->Q)、イソロイシン/バリン->スレオニン(IN->T)およびフェニルアラニン->チロシン(F->Y)。研究では、我々は水溶性嗅覚受容体の二次構造を調査すること、ならびにその匂い物質結合能力を測定することができる。匂い物質結合がQTY置換を用いて測定される場合、我々は、元の構造の重要な構成要素を保存した可能性がある。我々は天然嗅覚受容体の二次構造および結合を設計された水溶性嗅覚受容体と比較す

ることができる。我々はまたミリグラム量の水溶性受容体を生成させることができ、匂い物質有無で結晶スクリーンを設定することができる。

【化 1】

```

MERRNHTGRV SEFVLLGFPA PAPQALQFF QSLQAYVQTL TENIQTITAI RNHPTLHKPM YYFLANMSYL ETWYTTVTTP
      abcdefga bcdefgab cd efgabcde fg a      a bcdefgab cd efgabcde fg
KMQAGYIGSE ENHGQLISFE ACMTQLYFFO GLGCTECTLL AVMAYDRYVA TCHPLHYPVI VSSRQCQVMA AGSWAGGFGT
      abcdefg      abcdefgab cdefgab cde fgabcde fg a bc      abcdefg abcdefgabc
SMTKVYQISR LSYCGPNTIN HFFCDVSPLL NLSCTDMSTA ELTDFIQAIY TLLGPLSTTG ASYMAITGAV MRIPSAAGRH
      defgab cd      abcdefgab cdefgab cde fgabcde fg a
KAFSTCASHL TTVITYYAAS IYTYARPKAL SAFDTNKLVS VLYAVITPLQ NPITYCQRNQ EVKKALRRTL HLAQGQDANT
      bcdefgab cd efgabcde fg abc d      abcdef gabcde fgabc cdefgabc
KKSSRDGGSS GTETSQVAPA. (36aa 変異 :/340aa, ~10.5% 変異 )

```

10

【 0 0 5 0 】

2) ミリグラム量の天然およびバイオ工学処理変異嗅覚受容体を生成および精製すること。我々は、市販の無細胞系を使用して、ミリグラムの天然および水溶性 m O R I O 3 - 15 を生成させることができる。我々は、我々の研究所で開発した最適化されたプロトコルを使用することができる：これは、我々がここ数年で達成した重要な進歩であり、革新である。我々は天然および変異嗅覚受容体を 1 日で、免疫親和性精製を使用して生成および精製することができる。その後、ゲル濾過を使用して、単量体および二量体受容体形態を分離することができる。

【 0 0 5 1 】

3) 円二色性を用いて二次構造を決定すること。我々は円二色性 (C D) 分光分析を使用して、精製受容体の二次構造を測定することができる。C D は非常に高感度な技術であり、天然および変異受容体間のいずれの小さな構造変更も検出することができる。特定のには、C D 分析を使用して、タンパク質中の α -ヘリックスおよび β -シートのパーセンテージを計算することができる。タンパク質の構造が変更されている場合、それは C D 分析において明らかにすることができる。特定の変異が受容体構造を変更させたかどうかを決定することに加え、C D はまた、任意の、匂い物質により誘発される構造変更を測定するために使用することができる。図 4 を参照されたい。

20

【 0 0 5 2 】

4) 嗅覚受容体のリガンド結合をアッセイすること。マイクロスケール熱泳動を用いて、天然およびバイオ工学処理タンパク質およびそれらの匂い物質リガンドの結合親和性を決定する。S P R または他のリガンド結合技術よりも優れたこの技術の重要な利点は、全体的に無表面および無標識であることである。よって、受容体は修飾される必要がない。測定は、溶液中で、天然トリプトファンを信号源として使用して実施することができる。さらに、小リガンド (MW 約 200 ダルトン) は、確実に測定することができる。さらに、各測定は、0.5 μ l (1 μ l g / μ l) の試料を必要とし、よって、高価な受容体試料が節約される。これらの結果は、変異嗅覚受容体が、天然タンパク質と同じくらい効率的に匂い物質に結合することができることを示す。

30

【 0 0 5 3 】

5) カルシウム流入活性化アッセイを使用して、嗅覚受容体活性化を測定すること。我々はカルシウム流入アッセイして、H E K 293 細胞における、天然および変異嗅覚受容体の、匂い物質により誘発された活性化を検査することができる。このデータをマイクロスケール熱泳動測定に相関させる。マイクロスケール熱泳動は、直接、リガンド結合を測定するが、一方、カルシウム流入アッセイは活性化を測定する。組み合わせると、これらのアッセイは、特定の変異が結合、活性化、またはその両方に影響するかどうかを証明することができる。さらに、我々はアゴニストおよびアンタゴニストリガンドを区別することができる。

40

【 0 0 5 4 】

6) 結晶化条件のための体系的スクリーニング。我々は匂い物質の有無における結晶化条件のために、天然およびバイオ工学処理嗅覚受容体を体系的にスクリーニングすることができる。水溶性タンパク質の結晶化スクリーニングのための技術は十分に開発されてい

50

る。様々な沈殿剤、塩、緩衝液に、微調整されたpH勾配、および幅広いカチオンおよびアニオン物質を提供する市販のスクリーンは入手可能である。これらの変数は全てよく知られており、膜タンパク質の結晶化において使用される。膜タンパク質スクリーンの追加の特有の成分は、より多くの界面活性剤分子の1つの存在である。しかしながら、懸滴からの遅い水の除去を含む沈殿技術は有効であり続け得る。大きな結晶を形成するのは有用であるが、結晶スクリーンの結果、より小さな結晶が得られ得る。

【0055】

CXCR4 QTYの表面プラズモン共鳴分析

ヒトCXCR4および、無細胞生成から得られ、アフィニティビーズを用いて精製された我々のCXCR4 QTYタンパク質を、Biacore 2000機器において1D4抗体(Ab)が固定されたBiacore CM5チップ上の異なるフローセル中に捕獲させた。異なる濃度のSDF1、hCXCR4受容体に対する天然リガンドを、表面に注入し、受容体と相互作用させた。

【0056】

【化2】

ヒトCXCR4 QTY (配列番号: 10)

MEGISIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANYNKTF
FLPTIYSIIYQTGT VGNGLVI
LVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSTADLQFVTTLPYWATDAT
ANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIV
HATNSQRPRKLLAEKV VYVG VWT PAQLLTTPDYTFANVS
EADDRYICDRFY PNDLWV VVFQFQHIMVGLILPGI VILSC
YCI I I SKLSHSGKHQKRKALKTTTTLIQAFFACWQPYYT
GISIDSYILLEI IKQGCE FENTVHKWISTTEAQAFYHCC
TNPTQYAYLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILSKGKRG
GHSSVSTESESSSSFHS

【0057】

1D4抗体の固定

Biacore CM5チップを、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩およびN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて、製造者のプロトコルに従い活性化し、その後、フローセル2-4に70 µg/mlで、5 µl/分の1D4 Abを7分注射し、続いて、4フローセルの全てにおいて表面を短いエタノールアミンパルスで非活性化した。1D4 Abの固定レベルは8000-25000反応単位(RU)の範囲である。

【0058】

GPCRの捕獲

CXCR4およびCXCR4 QTY変異体を、CM5チップ上の1D4 Abにより、0.1 mg/ml試料のタンパク質を単一のフローセルに5 µl/分で15分間、両方の試料および0.2% Fos-Choline-14界面活性剤を含む泳動用緩衝液と共に注入することにより、捕獲させる。受容体は800-3000RUのレベルまで捕獲された。

【0059】

相互作用分析

SDF1を全てのフローセル上に注入し、両方の受容体と相互作用させ、フローセル1つを、固定タンパク質を有さない参照セルとして使用する。注入は、0、7.8 nM、15.6 nM、31.25 nM、62.5 nM、125 nM、250 nM、500 nM、1 µMで、3通り、20 µl/分で2分間実施し、15分の待ち時間を使用して解離させた。0.2% BSAおよび0.2% Fos-Choline-14を添加したHBST(50 mM Hepes、pH 7.4、150 mM NaCl、0.005% Tween-20)を、両方の泳動用緩衝液として、SDF1試料の希釈のために使用した。

【0060】

結論：上記で記載した研究は、C X C R 4 Q T Yによるリガンド結合を示す。

【 0 0 6 1 】

参考文献

- 1 . Choma C, Gratkowski H, Lear JD & DeGrado WF. (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. Nat Struct Biol 7, 161-6.
- 2 . Slovic AM, Kono H, Lear JD, Saven JG & DeGrado WF. (2004) Computational design of water-soluble analogues of the potassium channel KcsA. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 1828-33
- 3 . Walters RF & DeGrado WF. (2006) Helix-packing motifs in membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13658-63
- 4 . Zhang Y, Kulp DW, Lear JD & DeGrado WF. (2009) Experimental and computational evaluation of forces directing the association of transmembrane helices. J Am Chem Soc 131, 11341-11343

【 0 0 6 2 】

この発明について、その好ましい実施形態を参照して、具体的に図示し、説明してきたが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲により包含される本発明の範囲から逸脱せずに、形式および細部における様々な変更がなされ得ることは理解されるであろう。

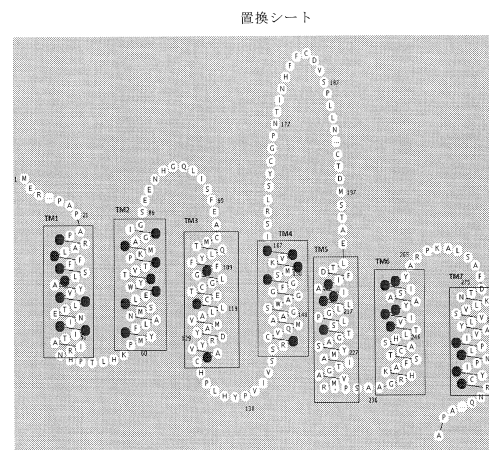
【 図 1 】

置換シート

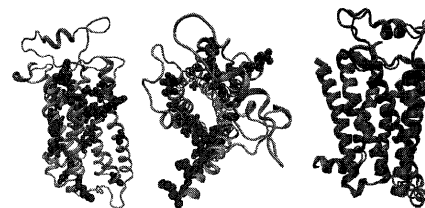
m O R 1 0 3 - 1 5 の可溶性 7 ヘリックス束の設計

MERRNHTGRV	SEFVLLGFFA	PAPLRALLFF	LSLLAYVIVL	TENILIIITAI	QT (8)	配列番号 2
abcde	fga	bcde	fgabcd	efgabcde		配列番号 1
RNHPTLHKPM	YFFLANMSFL	EIWYVTVTIP	KMLAGEIGSE	ENHGQLISFE	QT (7)	
a	bcde	fgabcd	efgabcde	abcde		
ACMTQLYFFL	GLGCTECVLL	AVMAYDRIVA	ICHPLHYFVI	VSSRLCVQMA	T (3)	
abcde	fgab	cde	fgabcde	fga	bc	abcde
AGSWAGGPGI	SMVKVILSR	LSYCGPNTIN	HPFCDVSELL	NLSCTDMSTA	T YQ (5)	
abcde	fgabc	de	fgabcd			
ELTDFILAI	ILLGPLSVTG	ASYMAITGAV	MRIPSAAGR	KAFSTCASHL	T (4)	
abcde	fgab	cde	fgabcde	fga	a	bcde
TVIIIPYAA	IFIYARPKAL	SAFDTNKLVS	VLVAVIVPLL	NPIIYCLRNQ	T Q T Q (4)	
efgabcde	fgabcd	abcde	fgabcde	fgabc		
EVKKALRRTL	HLAQGGDANT	KKSSRDGSS	GTETSQVAPA	(36aa/340aa)		

【 図 2 】

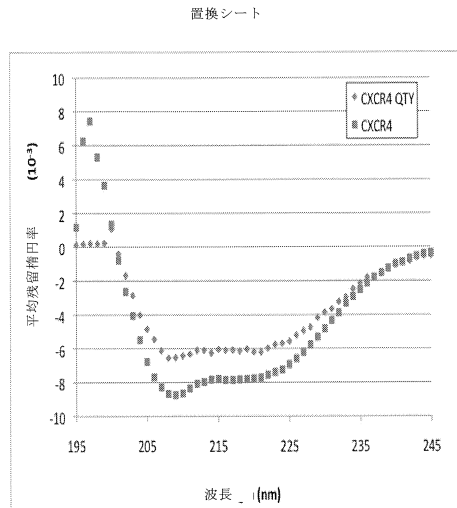


【 図 3 A - 3 C 】

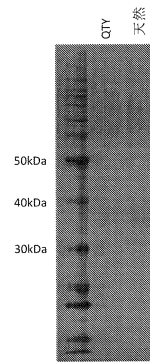


FIGs. 3A-3C

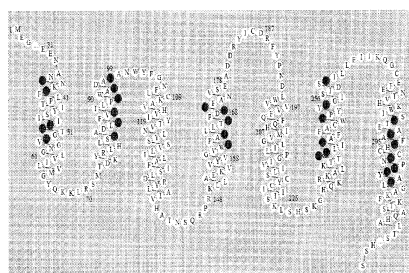
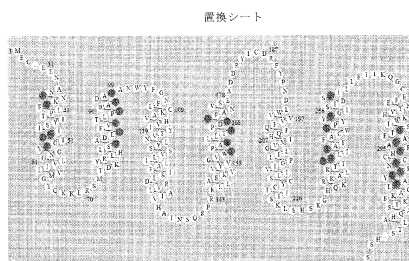
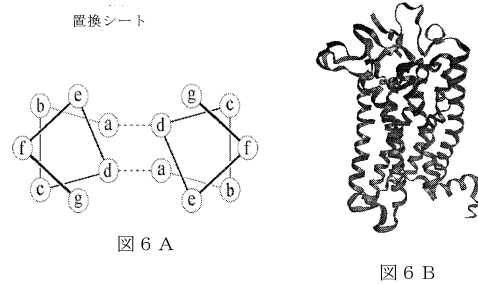
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04

- (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 リッチ, アレクサンダー
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, 2 ウォルナット アベニュー
- (72)発明者 コリン, カロライナ
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, 1 0 1 ウェスタン アベニュー
- (72)発明者 テグラー, ロッタ, ティー .
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 2 1 5, ボストン, アpartment 5 0 3, 5 3 4
ビーコン ストリート

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 8 9 8 9 9 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 3 9 1 0 (WO, A 1)
Database Uniprot [online], Accessin No. B2N158, <<http://www.uniprot.org/uniprot/B2N158.txt?version=14>> 08-Feb-2011 uploaded, Suzuki, H., et al., Definition: Olfactory receptor 17
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004) vol.101, no.7, p.1828-1833

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 4 / 7 0 5
P u b M e d
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q