

(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2005-506039

(P2005-506039A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 1/22
G 0 1 N 27/62
G 0 1 N 30/48
G 0 1 N 30/88

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 1/22
G 0 1 N 27/62 D
G 0 1 N 27/62 V
G 0 1 N 30/48 R

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
4 B O 2 4
4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 160 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-558022 (P2002-558022)
(86) (22) 出願日 平成13年12月19日 (2001.12.19)
(85) 翻訳文提出日 平成15年6月30日 (2003.6.30)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/050088
(87) 国際公開番号 W02002/057792
(87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)
(31) 優先権主張番号 60/258,970
(32) 優先日 平成12年12月29日 (2000.12.29)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

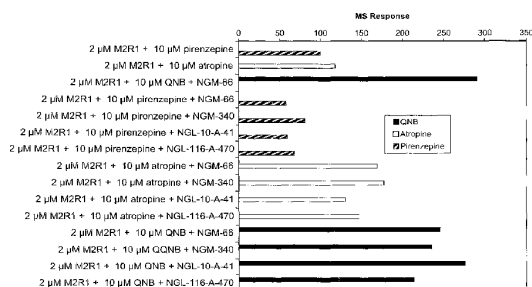
(71) 出願人 502452819
ネオジェネシス ファーマシューティカル
ズ インコーポレイテッド
NEOGENESIS PHARMACE
UTICALS, INC.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
ンブリッジ メモリアル ドライブ 84
O
(74) 代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
(74) 代理人 100105957
弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティ選択に基づいた疎水性タンパク質のスクリーニング

(57) 【要約】

本発明は、両親媒性物質が結合した疎水性タンパク質のリガンドを同定するための、アフィニティ選択に基づく方法に関する。本発明は、疎水性タンパク質と、リガンドのスクリーニングに適した疎水性タンパク質の単離方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも 1 個の複合体の形成が促進されるように、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択によってリガンド分子を選択する工程と、

(b) 該複合体を非結合分子から分離する工程と、

(c) リガンド分子を同定する工程と

からなる疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

【請求項 2】

前記疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、均一溶液相の条件下で行われる請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、不均一溶液相の条件下で行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記リガンド分子の選択が、多次元クロマトグラフィを使用して行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記疎水性標的タンパク質が、

(a) 膜タンパク質と、

(b) 内在性膜タンパク質と

(c) 膜貫通タンパク質と、

(d) モノトピック型膜タンパク質と、

(e) ポリトピック型膜タンパク質と、

(f) ポンプ・タンパク質と、

(g) チャネル・タンパク質と、

(h) 受容体キナーゼタンパク質と、

(i) G タンパク質共役受容体タンパク質と、

(j) 膜結合酵素と、

(k) 輸送体タンパク質と

からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記多数の分子はマスコードされた分子ライブラリである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記多数の分子はマスコードされていない分子ライブラリである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記両親媒性物質が、

(a) 極性脂質と、

(b) 両親媒性高分子ポリマーと、

(c) 表面活性物質または界面活性剤と、

(d) 両親媒性ポリペプチドと

からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 9】

リガンド分子の同定が、質量スペクトル分析によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記リガンド分子のデコンボリューションが質量スペクトル分析によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複合体の前記非結合分子からの分離が、固相クロマトグラフィ媒体により行われる請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 1 2】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列と、
- (b) アフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列と、
- (c) 疎水性タンパク質 (H P) 配列と

からなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記疎水性タンパク質配列が、

- (a) 膜タンパク質と、
- (b) 内在性膜タンパク質と、
- (c) 膜貫通タンパク質と、
- (d) モノトピック型膜タンパク質と、
- (e) ポリトピック型膜タンパク質と、
- (f) ポンプ・タンパク質と、
- (g) チャネル・タンパク質と、
- (h) 受容体キナーゼタンパク質と、
- (i) G タンパク質共役受容体タンパク質と、
- (j) 膜結合酵素と、
- (k) 輸送体タンパク質と

10

からなる群から選択される請求項 1 2 に記載の方法。

20

【請求項 1 4】

前記タグ配列が、

- (a) F L A G タグ (N H 2 - D Y K D D D D K - C O O H) (配列番号 2 9) と、
- (b) E E タグ (N H 2 - E E E E Y M P M E - C O O H) (配列番号 3 0) と、
- (c) ヘマグルチニン・タグ (N H 2 - Y P Y D V P D Y A - C O O H) (配列番号 3 1) と、
- (d) m y c タグ (N H 2 - K H K L E Q L R N S G A - C O O H) (配列番号 3 2) と、
- (e) H S V タグ (N H 2 - Q P E L A P E D P E D - C O O H) (配列番号 3 3) と

からなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む請求項 1 2 に記載の方法。

30

【請求項 1 5】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) タグ 1 - タグ 2 - H P と、
- (b) タグ 1 - H P - タグ 2 と、
- (c) H P - タグ 1 - タグ 2 と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) M y c タグ - E E タグ - ヒト m 2 m A C h R (配列番号 7) と、
- (b) F l a g タグ - ヒト β 2 アドレナリン受容体 - E E タグ (配列番号 8) と、
- (c) ヒトニューロキニン 3 受容体 - H S V タグ - M y c タグ (配列番号 9) と、
- (d) F l a g タグ - ヒト m 1 m A C h R - E E タグ (配列番号 1 0) と、
- (e) ラット m 3 m A C h R - H S V タグ - 8 H i s タグ (配列番号 1 1) と

40

からなる群から選択される請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記疎水性標的タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列 (S S) をさらに含む請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記異種シグナル配列が、

50

(a) メリチン・シグナル配列 $\text{NH}_2 - \text{KFLVNVALVFMVVYISYIYA} - \text{COOH}$ (配列番号 12) と、

(b) GPシグナル配列 $\text{NH}_2 - \text{VRTAVLLILLVRFSEPCOOH}$ (配列番号 13) と、

(c) ヘマグルチニン・シグナル配列 $\text{NH}_2 - \text{KTIIALSYIFCLVFA} - \text{COOH}$ (配列番号 14) と、

(d) ロドプシン・タグ1シグナル配列 $\text{NH}_2 - \text{MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEP} - \text{COOH}$ (配列番号 15) と、

(e) ロドプシン・タグID4シグナル配列 $\text{NH}_2 - \text{GKNPLGVRKTEETSQVAPPA} - \text{COOH}$ (配列番号 16) と

からなる群から選択される請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号 17) とデカヒスチジン配列 (配列番号 18) とをさらに含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記疎水性標的タンパク質が、

(a) GP67 SS-Myc タグー EE タグー ヒト m2 mAChR (配列番号 19) と、

(b) メリチン SS-Flag タグー ヒト $\beta 2$ アドレナリン受容体ー EE タグ (配列番号 20) と、

(c) ヘマグルチニン SSー ヒトニューロキニン 3 受容体ー HSV タグー Myc タグ (配列番号 21) と、

(d) メリチン SS-Flag タグー ヒト m1 mAChRー EE タグ (配列番号 22) と、

(e) ヘマグルチニン SSー ラット m3 mAChRー HSV タグー 8His タグ (配列番号 23) と

からなる群から選択される請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

(a) 疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、

(b) 該疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、

(c) 該疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程と

からなる、疎水性タンパク質を単離する方法。

【請求項 22】

前記疎水性タンパク質が、

(a) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列と、

(b) アフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列と、

(c) 疎水性タンパク質 (HP) 配列と

からなる請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記疎水性タンパク質配列が、

(a) 膜タンパク質と、

(b) 内在性膜タンパク質と、

(c) 膜貫通タンパク質と、

(d) モノトピック型膜タンパク質と、

(e) ポリトピック型膜タンパク質と、

(f) ポンプ・タンパク質と、

(g) チャネル・タンパク質と、

(h) 受容体キナーゼタンパク質と、

(i) Gタンパク質共役受容体タンパク質と、

- (j) 膜結合酵素と、
- (k) 輸送体タンパク質と

からなる群から選択される請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記タグ配列が、

- (a) FLAG タグ (NH₂ - DYKDDDDK - COOH) (配列番号 29) と、
 - (b) EE タグ (NH₂ - EEEEMYPMEE - COOH) (配列番号 30) と、
 - (c) ヘマグルチニン・タグ (NH₂ - YPYDVPDYA - COOH) (配列番号 31) と、
 - (d) myc タグ (NH₂ - KHKLEQLRNSGA - COOH) (配列番号 32) と 10
 - (e) HSV タグ (NH₂ - QPELAPEDPED - COOH) (配列番号 33) と
- からなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記疎水性タンパク質が、

- (a) タグ 1 - タグ 2 - HP と、
- (b) タグ 1 - HP - タグ 2 と、
- (c) HP - タグ 1 - タグ 2 と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む請求項 22 に記載の方法。 20

【請求項 26】

前記疎水性タンパク質が、

- (a) Myc タグ - EE タグ - ヒト m2 mAChR (配列番号 7) と、
- (b) Flag タグ - ヒト β2 アドレナリン受容体 - EE タグ (配列番号 8) と、
- (c) ヒトニューロキニン 3 受容体 - HSV タグ - Myc タグ (配列番号 9) と、
- (d) Flag タグ - ヒト m1 mAChR - EE タグ (配列番号 10) と、
- (e) ラット m3 mAChR - HSV タグ - 8His タグ (配列番号 11) と

からなる群から選択される請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記疎水性タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列 (SS) をさらに含む請求項 2 2 に記載の方法。 30

【請求項 28】

前記異種シグナル配列が、

- (a) メリチン・シグナル配列 NH₂ - KFLVNVALVFMVVYISYIYA - COOH (配列番号 12) と、
- (b) GP シグナル配列 NH₂ - VRTAVLILLVRFSEPP - COOH (配列番号 13) と、
- (c) ヘマグルチニン・シグナル配列 NH₂ - KTIIALSYIFCLVFA - COOH (配列番号 14) と、
- (d) ロドプシン・タグ 1 シグナル配列 NH₂ - MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEP - COOH (配列番号 15) と、 40
- (e) ロドプシン・タグ ID4 シグナル配列 NH₂ - GKNPLGVRKTEETSQVAPPA - COOH (配列番号 16) と

からなる群から選択される請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号 17) とデカヒスチジン配列 (配列番号 18) とをさらに含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 30】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) GP67 SS - Myc タグ - EE タグ - ヒト m2 mAChR (配列番号 19) 50

と、

(b) メリチン S S - F l a g タグーヒト β 2 アドレナリン受容体 - E E タグ (配列番号 2 0) と、

(c) ヘマグルチニン S S - ヒトニューロキニン 3 受容体 - H S V タグー M y c タグ (配列番号 2 1) と、

(d) メリチン S S - F l a g タグーヒト m 1 m A C h R - E E タグ (配列番号 2 2) と、

(e) ヘマグルチニン S S - ラット m 3 m A C h R - H S V タグー 8 H i s タグ (配列番号 2 3) と

からなる群から選択される請求項 2 9 に記載の方法。

10

【請求項 3 1】

(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、

(b) 下記の要素、すなわち

(i) N 末端メチオニン残基、

(i i) 異種シグナル配列 (S S)、

(i i i) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列、

(i v) アフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列、および

(v) 疎水性タンパク質 (H P) 配列

からなる人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とを含む疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子。

20

【請求項 3 2】

前記 N 末端メチオニン配列および前記異種シグナル配列が、

(a) M K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I Y A (配列番号 2 4) と、

(b) M V R T A V L I L L L V R F S E P (配列番号 2 5) と、

(c) M K T I I A L S Y I F C L V F A (配列番号 2 6) と、

(d) M M N G T E G P N F Y V P F S N K T G V V R S P F E A P Q Y Y L A E P - C O O H (配列番号 2 7) と、

(e) M G K N P L G V R K T E T S Q V A P A - C O O H (配列番号 2 8) と

からなる群から選択される請求項 3 2 に記載の単離核酸分子。

30

【請求項 3 3】

前記タグ配列が、

(a) F L A G タグ (N H 2 - D Y K D D D D K - C O O H) (配列番号 1) と、

(b) E E タグ (N H 2 - E E E E Y M P M E - C O O H) (配列番号 2) と、

(c) ヘマグルチニン・タグ (N H 2 - Y P Y D V P D Y A - C O O H) (配列番号 3) と、

(d) m y c タグ (N H 2 - K H K L E Q L R N S G A - C O O H) (配列番号 4) と、

(e) H S V タグ (N H 2 - Q P E L A P E D P E D - C O O H) (配列番号 5) と

からなる群から選択されたエピトープ・タグ配列からなる請求項 3 3 に記載の単離核酸分子。

40

【請求項 3 4】

前記人工的に改変された疎水性タンパク質の前記要素が、

(a) S S - タグ 1 - タグ 2 - H P と、

(b) S S - タグ 1 - H P - タグ 2 と、

(c) S S - H P - タグ 1 - タグ 2 と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される請求項 3 3 に記載の単離核酸分子。

【請求項 3 5】

前記タグ配列がヘキサヒスチジン配列 (配列番号 1 7) とデカヒスチジン配列 (配列番号 1 8) とをさらに含む請求項 3 4 に記載の単離核酸分子。

【請求項 3 6】

50

前記人工的に改変された疎水性タンパク質が、

- (a) GP67-Myc-EE-ヒトm2 mACHR (配列番号19) と、
 - (b) メリチン-F1agタグ-ヒトm1 mACHR-EE (配列番号20) と
- からなる群から選択される請求項35に記載の単離核酸分子。

【請求項37】

- (a) (i) 膜タンパク質、
- (ii) 内在性膜タンパク質、
- (iii) 膜貫通タンパク質、
- (iv) モノトピック型膜タンパク質、
- (v) ポリトピック型膜タンパク質、
- (vi) ポンプ・タンパク質、
- (vii) チャネル・タンパク質、
- (viii) 受容体キナーゼタンパク質、
- (ix) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- (x) 膜結合酵素、および
- (xi) 輸送体タンパク質

10

からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、

- (xii) 該疎水性タンパク質に両親媒性物質が結合していることと、
- (b) (i) 極性脂質、
- (ii) 両親媒性高分子ポリマー、
- (iii) 表面活性物質または界面活性剤、および
- (iv) 両親媒性ポリペプチド

20

からなる群から該疎水性タンパク質に結合する両親媒性物質を選択する工程と、

(c) 該疎水性標的タンパク質と該リガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している該疎水性標的タンパク質をマスコード・ライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、

- (d) 該複合体を非結合分子から分離する工程と、
 - (e) 質量スペクトル分析によって該リガンド分子を同定する工程と
- からなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

30

【請求項38】

- (a) (i) 膜タンパク質、
- (ii) 内在性膜タンパク質、
- (iii) 膜貫通タンパク質、
- (iv) モノトピック型膜タンパク質、
- (v) ポリトピック型膜タンパク質、
- (vi) ポンプ・タンパク質、
- (vii) チャネル・タンパク質、
- (viii) 受容体キナーゼタンパク質、
- (ix) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- (x) 膜結合酵素、および
- (xi) 輸送体タンパク質

40

からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、

- (xii) 該疎水性タンパク質に両親媒性物質が結合していることと、
- (b) (i) 極性脂質、
- (ii) 両親媒性高分子ポリマー、
- (iii) 表面活性物質または界面活性剤、および
- (iv) 両親媒性ポリペプチド

からなる群から該疎水性タンパク質に結合する両親媒性物質を選択する工程と、

- (c) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進さ

50

れるように、不均一溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコードされていないライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、

(d) 複合体を非結合分子から分離する工程と、

(e) 質量スペクトル分析によって該リガンド分子を同定する工程と

からなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

【請求項 39】

(a) (i) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列、

(i i) (1) FLAG タグ (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号 29)

、

(2) EE タグ (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号 30)、

(3) ヘマグルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号 31)

)、

(4) myc タグ (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号 32)、

および

(5) HSV タグ (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号 33)

からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列、

(i i i) (1) 膜タンパク質、

(2) 内在性膜タンパク質、

(3) 膜貫通タンパク質、

(4) モノトピック型膜タンパク質、

(5) ポリトピック型膜タンパク質、

(6) ポンプ・タンパク質、

(7) チャネル・タンパク質、

(8) 受容体キナーゼタンパク質、

(9) G タンパク質共役受容体タンパク質、

(10) 膜結合酵素、および

(11) 輸送体タンパク質

からなる群から選択される疎水性タンパク質 (HP) 配列

からなる疎水性タンパク質を選択する工程と、

(b) 該疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、

(c) 該疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、

(d) 該疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程と

からなる疎水性タンパク質を単離する方法。

【請求項 40】

(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、

(b) 下記の要素、すなわち

(i) N 末端メチオニン残基、

(i i) 該 N 末端メチオニン配列および異種シグナル配列が、

(1) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号 24)、

(2) MVRTAVLLILLVRFSEP (配列番号 25)、

(3) MKTIIALSYIFCLVFA (配列番号 26)、

(4) MMNGTEGPNFYVPFSNKTG V V R S P F E A P Q Y Y L A E P - C O O H (配列番号 27)、および

(5) MGKNPLGV R K T E T S Q V A P A - C O O H (配列番号 28)

からなる群から選択される異種シグナル配列 (SS)、

(i i i) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列、

(i v) (1) FLAG タグ (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号 1)、

(2) EE タグ (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号 2)、

10

20

30

40

50

- (3) ヘマグルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号3)、
- (4) mycタグ (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号4)、および
- (5) HSVタグ (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号5) からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列、
- (v) (1) 膜タンパク質、
- (2) 内在性膜タンパク質
- (3) 膜貫通タンパク質、
- (4) モノトピック型膜タンパク質、
- (5) ポリトピック型膜タンパク質、
- (6) ポンプ・タンパク質、
- (7) チャネル・タンパク質、
- (8) 受容体キナーゼタンパク質、
- (9) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- (10) 膜結合酵素、および
- (11) 輸送体タンパク質

からなる群から選択される疎水性タンパク質 (HP) 配列

を含む人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とを含む、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬理学および医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、新規な薬剤および医学的診断の開発に特に関連の深い個別のリガンド分子の同定のため、疎水性タンパク質をスクリーニングすることに関する。

【背景技術】

【0002】

疎水性タンパク質 (HP) の機能のアゴニストおよびアンタゴニストの開発において、疎水性タンパク質は製薬産業に独自の問題を提起している。この問題は、HPが容易に精製されず、単離された形で働くことが難しいこと (例えば溶解度の問題) から生じている。疎水性タンパク質が無極性であると仮定すると、このタンパク質はとりわけ細胞の脂質2重層とその内部の細胞小器官に結合している可能性がある。非限定的な例として、疎水性タンパク質という用語には、膜タンパク質、内在性膜タンパク質、膜貫通タンパク質、モノトピック型膜タンパク質、ポリトピック型膜タンパク質、ポンプ・タンパク質 (酵素のサブクラス)、チャネル・タンパク質、受容体キナーゼタンパク質、Gタンパク質共役受容体タンパク質、膜結合酵素、輸送体タンパク質などが含まれる。これらのタンパク質は、細胞内および細胞間のシグナル伝達と、細胞とその環境との一般的な関係、例えば溶質移動などにおいて、しばしば重要な役割を果たす。したがって疎水性タンパク質は、薬物開発の重要な標的である。

【0003】

ヒトゲノム・プロジェクトによって、ゲノムにコードされた親水性および疎水性のタンパク質の構造と機能とに関する膨大な量の情報が提供されることになる。例えば、ヒトゲノムでは1,700~5,000個のGタンパク質共役受容体タンパク質 (GPCR) が発見されると予測される (マルキーズ、エーラ (Marchese, A., et al.) (1999年) Trends Pharmacol. Sci. 第20巻: 370ページ; ヘニコフ、エスラ (Henikoff, S., et al.) (1997年) Science 第278巻: 609ページ)。しかし、疎水性タンパク質に結合するリガンドを同定するための適切なスクリーニング方法がないので、ヒトゲノム・プロジェクトによって同定された何百ものGPCRは、その研究を進めるための既知のリガンドを全く持ってい

10

20

30

40

50

ないオーファン（孤児）受容体として分類されることになる。GPCRは医学に非常に重要であるので、例えば配列データや変異体データ、リガンド結合データに関する情報を提供すべく個別のデータベースが確立されている（ホーン、エフラ（Horn, F., et al.）（1998年）Nucleic Acids Research 第26巻：227～281ページ）。したがって当技術分野では、HPリガンド同定のためのスクリーニング方法、特に処理能力の高い方法の開発が必要とされている。

【0004】

従来技術では、アフィニティ選択に基づいたHPのスクリーニングの記録がない。その代わりこれらの標的は、機能的アッセイまたはリガンド置換アッセイでスクリーニングされる。HPをスクリーニングするのに使用される全てのリガンド置換アッセイおよびほとんどの機能的アッセイは、細胞を用いた形式で実施される（例えば、いずれも細胞を用いたメラノフォア・アッセイを開示するジャヤウィックレム、シーケー（Jayawickreme, C. K.）およびコスト、ティーエー（Kost, T. A.）（1997年）Current Opinion in Biotechnology 第8巻：629～634ページならびにチェン、ジーら（Chen, G., et al.）（1999年）Molecular Pharmacology 第57巻：125～124ページ；細胞を用いた蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）に基づいたアッセイを開示するメア、エルら（Mere, L., et al.）（1999年）Drug Discovery Today 第4巻：363～369ページ；および細胞を用いたエクオリン・アッセイを開示するシェーファー、エムティーら（Schaeffer, M. T., et al.）（1999年）J. Receptor & Signal Transduction Research 第19巻：927～938ページ参照）か、または未精製の細胞膜調製物を用いる（例えば、ミクロソームを用いたアッセイを開示するクロムリッシュら（Cromlish et al.）の米国特許第5,543,297号参照：および膜調製物を使用した放射リガンド置換アッセイを開示するラベラ、エフエスら（Labelle, F. S., et al.）Fed. Proc.（1985年）第44巻：2806～2811ページ参照）かのいずれかである。これらのスクリーニング形式は分子レベルの定義が不明確であり、シグナル対ノイズ比が低く、偽陽性が生じ、標的タンパク質が発現する程度のばらつきおよび遺伝子発現パラメータの大きなばらつきの影響を受ける。

【0005】

非常にまれであるが、スクリーニングのためにHP標的が精製される。例えば、界面活性剤（デタージェント）で可溶化された形に精製されたCOX-2は、均一溶液相アッセイでその酵素活性をモニタリングすることによりスクリーニング可能であり、このアッセイにおいて酵素活性に対する小分子阻害剤を薬物リードとして同定し得る（ソング、ワイら（Song, Y., et al.）（1999年）J. Med. Chem. 第42巻：1151～1160ページ、およびバーネット、ジェイら（Barnett, J., et al.）（1994年）Biochimica et Biophysica Acta 第1209巻：130～139ページ参照）。代替例として、スクリーニングのためにHPを担体に結合することが可能である（スクラー、エルエーら（Sklar, L. A., et al.）（2000年）Biotechniques 第28巻：976～985ページ；ビエリ、シーら（Bieri, C., et al.）（1999年）Nature Biotechnology 第17巻：1105～1108ページ；およびシュミット、イーエルら（Schmid, E. L., et al.）（1998年）Anal. Chem. 第70巻：1331～1338ページ参照）。しかし、機能に関する読出し情報を使用するスクリーニング・アッセイでは、標的の機能を前もって推測する。また、医学的診断に使用される多くの造影剤の場合と同様に、多くの所望のタンパク質リガンドはアッセイ可能な機能を変化させず、タンパク質に単に結合するだけである。

【0006】

水溶性タンパク質に対するリガンドを同定するためのアフィニティ選択は、当技術分野で知られている。例えば、ナッシュら（Nash et al.）による国際公開番号第9

10

20

30

40

50

9/35109号は、アフィニティ選択と質量分析による結合リガンドの同定との組合せに有用なマスコード・コンビナトリアル・ライブラリを生成するための方法について述べている。ジンダルら（Jindal et al.）による国際特許出願の国際公開番号第97/01755号は、標的分子に結合したリガンドのアフィニティ選択について、その後の多次元クロマトグラフィ法によるリガンド分子の単離と組み合わせて述べている。さらに、パントリアノら（Pantoliano et al.）による米国特許第6,020,141号は、熱シフト・アッセイによるリガンドの同定と組み合わせたアフィニティ選択の方法について述べている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

リガンドのアフィニティ選択およびリガンド同定によるこれらの進歩にもかかわらず、純粋なHPを生物学的に活性な高次構造に維持するために必要な過剰な両親媒性物質の存在が障害となるため、水に不溶なHP標的にアフィニティ選択を適用するには基本的な問題が依然として存在している。

【0008】

水溶性タンパク質の調製と純粋なHPの調製との相違を理解することが重要である。HPは、HPの疎水性部分と両親媒性物質の疎水性部分との間の疎水的相互作用によって溶媒和する。純粋な水溶性タンパク質の調製では、全ての緩衝成分が親水性であり、水和によって、あるいは静電結合またはイオン結合に加わることによって、タンパク質を溶媒和する。それに対し、純粋なHPを調製する際の両親媒性物質は、コロイドとしての性質を溶液にもたらす。一般にHPは、100~10,000倍の過剰なモル濃度の界面活性剤中で精製される。これらの両親媒性の界面活性剤分子は、HPおよびスクリーニングされる薬物分子の両方と相互作用する。さらに両親媒性物質は、ほとんどのタンパク質とちょうど同じ大きさの、ミセルやリポソームなどの高分子アセンブリを形成する。これらの高分子アセンブリは、両親媒性物質に可溶化されたHPの溶液にコロイドとしての性質をもたらし、HPと可溶性タンパク質とがさらに区別される。

20

【0009】

可溶性タンパク質標的と比較すると、HP-両親媒性物質の調製は特に複雑であるため、結合リガンドの検出が妨げられ、スクリーニング感度が低下し、高率で偽陽性となる。典型的な調製において、このような複雑な問題を引き起こす分子の実体を、HP-両親媒性物質の複合体（20 μM、HP：両親媒性物質：1：5~250；MW=50~500 kD）と、ミセル（5000 μM MW=60 kD）と、モノマー両親媒性物質（500 μM；MW=1200）とであると特定することが可能である。同じような水溶性タンパク質の調製では、20 μMのタンパク質だけを得ることになる。どちらの場合も、緩衝剤（例えばトリスまたはリン酸ナトリウム）と塩（例えばNaClまたはKCl）を含ませることも可能である。HPタンパク質の調製では、様々な両親媒性物の存在により、可溶性タンパク質の調製では見られない特別な複雑さが示される。

30

【0010】

したがって当技術分野では、HP標的の特定の生物学的機能とは関係なく両親媒性物質の存在下で実施可能な、アフィニティ選択に基づいたHPスクリーニング法が、引き続き求められている。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、HP標的の特定の生物学的機能とは関係なく両親媒性物質の存在下で実施可能な、アフィニティ選択に基づいたHPスクリーニング法を提供する。

【0012】

本発明は、両親媒性物質の存在下で薬物様小分子のHPに対する特異的結合の検出を可能にすることによって、HPリガンドのアフィニティ選択に関連した問題を解決する。さらに本発明は、スクリーニングを行うのに有用な精製HPを生成するための新規な方法およ

50

び組成物も提供する。これらの発見は、組成物および方法を含む本発明を提供するために利用されている。

【0013】

第1の態様では、本発明は、(a)疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1個の複合体の形成が促進されるように、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、リガンド分子を選択する工程と、(b)該複合体を非結合分子から分離する工程と、(c)リガンド分子を同定する工程とからなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法を提供する。

【0014】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、均一溶液相の条件下で行われる。第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、不均一溶液相の条件下で行われる。第1の態様のある実施形態では、リガンド分子の選択が、多次元クロマトグラフィを使用して行われる。

【0015】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、膜タンパク質、内在性膜タンパク質、膜貫通タンパク質、モノトピック型膜タンパク質、ポリトピック型膜タンパク質、ポンプ・タンパク質、チャネル・タンパク質、受容体キナーゼタンパク質、Gタンパク質共役受容体タンパク質、膜結合酵素、および輸送体タンパク質からなる群から選択される。

【0016】

第1の態様のある実施形態では、多数の分子はマスコードされた分子ライブラリである。第1の態様のある実施形態では、多数の分子はマスコードされていない分子のライブラリである。第1の態様のある実施形態では、両親媒性物質が、(a)極性脂質と、(b)両親媒性高分子ポリマーと、(c)表面活性物質(サーファクタント)または界面活性剤と、(d)両親媒性ポリペプチドとからなる群から選択される。第1の態様のある実施形態では、リガンド分子の同定が、質量スペクトル分析によって行われる。第1の態様のある実施形態では、リガンド分子のデコンボリューションが、質量スペクトル分析によって行われる。第1の態様のある実施形態では、複合体の非結合分子からの分離が、固相クロマトグラフィの媒体を用いて行われる。

【0017】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、(a)少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(b)アフィニティ精製に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(c)疎水性タンパク質(HP)配列とからなる。前記態様のある実施形態では、疎水性タンパク質配列が、(a)膜タンパク質と、(b)内在性膜タンパク質と、(c)膜貫通タンパク質と、(d)モノトピック型膜タンパク質と、(e)ポリトピック型膜タンパク質と、(f)ポンプ・タンパク質と、(g)チャネル・タンパク質と、(h)受容体キナーゼタンパク質と、(i)Gタンパク共役受容体タンパク質と、(j)膜結合酵素と、(k)輸送体タンパク質とからなる群から選択される。前記態様のある実施形態では、タグ配列が、(a)FLAGタグ(NH₂-DYKDDDDK-COOH)(配列番号1)と、(b)EEタグ(NH₂-EEEEYMPME-COOH)(配列番号2)と、(c)ヘマグルチニン・タグ(NH₂-YPYDVPDYA-COOH)(配列番号3)と、(d)mycタグ(NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH)(配列番号4)と、(e)HSVタグ(NH₂-QPELAPEDPED-COOH)(配列番号5)と、(f)ロドプシン・タグ(NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PF EAPQYYLAEPWQFSM-COOH)(配列番号6)とからなる群から選択されたエピトープ・タグ配列からなる。

【0018】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、(a)タグ1-タグ2-HPと、(b)タグ1-HP-タグ2と、(c)HP-タグ1-タグ2とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列からなる。前記態様のある実施

形態では、本発明は、疎水性標的タンパク質が、(a) Myc タグーEE タグーヒト m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mACHR) (配列番号7) と、(b) Flag タグーヒト β 2 アドレナリン受容体ーEE タグ (配列番号8) と、(c) ヒトニューロキニン3 受容体ーHSV タグーMyc タグ (配列番号9) と、(d) Flag タグーヒト m1 mACHRーEE タグ (配列番号10) と、(e) ラット m3 mACHRーHSV タグー8 His タグ (配列番号11) とからなる群から選択される方法を提供する。前記態様のある実施形態では、本発明は、疎水性標的タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列 (SS) をさらに含む方法を提供する。前記態様のある実施形態では、異種シグナル配列が、(a) メリチン・シグナル配列 NH₂－KFLVNVAVFMVYISYIYA－COOH (配列番号12) と、(b) GP シグナル配列 NH₂－VRTAVLLILLVRFSEPCOOH (配列番号13) と、(c) ヘマグルチニン・シグナル配列 NH₂－KTIIALSYIFCLVFACOOH (配列番号14) と、(d) ロドプシン・タグ1 シグナル配列 NH₂－MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPEAPQYYLAEP－COOH (配列番号15) と、(e) ロドプシン・タグID4 シグナル配列 NH₂－GKNPLGVRKTESQVAPA－COOH (配列番号16) とからなる群から選択される。前記態様のある実施形態では、タグ配列がヘキサヒスチジン配列 (配列番号17) とデカヒスチジン配列 (配列番号18) とをさらに含む。前記態様の別の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、(a) GP67 SS－Myc タグーEE タグーヒト m2 mACHR (配列番号19) と、(b) メリチン SS－Flag タグーヒト β 2 アドレナリン受容体ーEE タグ (配列番号20) と、(c) ヘマグルチニン SS－ヒトニューロキニン3 受容体ーHSV タグーMyc タグ (配列番号21) と、(d) メリチン SS－Flag タグーヒト m1 mACHRーEE タグ (配列番号22) と、(e) ヘマグルチニン SS－ラット m3 mACHRーHSV タグー8 His タグ (配列番号23) とからなる群から選択される。

【0019】

第2の態様では、本発明は、(a) 疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、(b) 疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、(c) 疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程とからなる疎水性タンパク質を単離する方法を提供する。

【0020】

第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、(a) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(b) アフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(c) 疎水性タンパク質 (HP) 配列とからなる。前記態様のある実施形態では、疎水性タンパク質配列が、(a) 膜タンパク質と、(b) 内在性膜タンパク質と、(c) 膜貫通タンパク質と、(d) モノトピック型膜タンパク質と、(e) ポリトピック型膜タンパク質と、(f) ポンプ・タンパク質と、(g) チャネル・タンパク質と、(h) 受容体キナーゼタンパク質と、(i) Gタンパク質共役受容体タンパク質と、(j) 膜結合酵素と、(k) 輸送体タンパク質とからなる群から選択される。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質のタグ配列が、(a) FLAG タグ (NH₂－DYKDDDDK－COOH) (配列番号1) と、(b) EE タグ (NH₂－EEEEYMPME－COOH) (配列番号2) と、(c) ヘマグルチニン・タグ (NH₂－YPYDVPDYA－COOH) (配列番号3) と、(d) myc タグ (NH₂－KHKLQLRNSGA－COOH) (配列番号4) と、(e) HSV タグ (NH₂－QPELAPEDPED－COOH) (配列番号5) と、(f) ロドプシン・タグ (NH₂－MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPEAPQYYLAEPWQFSM－COOH) (配列番号6) とからなる群から選択されたエピトープ・タグ配列からなる。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、(a) タグ1－タグ2－HP と、(b) タグ1－HP－タグ2 と、(c) HP－タグ1－タグ2 とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列からなる。

【0021】

第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、(a) Myc タグーEE タグーヒト m2 mACHR (配列番号7) と、(b) Flag タグーヒト β 2 アドレナリン受容体ーEE タグ (配列番号8) と、(c) ヒトニューロキニン3 受容体ーHSV タグーMyc タグ (配列番号9) と、(d) Flag タグーヒト m1 mACHRーEE タグ (配列番号10) と、(e) ラット m3 mACHRーHSV タグー8 His タグ (配列番号11) とからなる群から選択される。前記態様のある実施形態では、疎水性タンパク質がアミノ末端に異種シグナル配列 (SS) をさらに含む。前記態様のある実施形態では、異種シグナル配列が、(a) メリチン・シグナル配列 NH₂－KFLVNVALVFMMVYISYIYA－COOH (配列番号12) と、(b) GPシグナル配列 NH₂－VRTAVLLILLVRFSEPCOOH (配列番号13) と、(c) ヘマグルチニン・シグナル配列 NH₂－KTIIALSYIFCLVFA－COOH (配列番号14) と、(d) ロドプシン・タグ1シグナル配列 NH₂－MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEP－COOH (配列番号15) と、(e) ロドプシン・タグID4シグナル配列 NH₂－GKNPLGVRKTEETSQVAPA－COOH (配列番号16) とからなる群から選択される。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質のタグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号17) とデカヒスチジン配列 (配列番号18) とからさらになる。

10

【0022】

前記態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、(a) GP67 SS－Myc タグーEE タグーヒト m2 mACHR (配列番号19) と、(b) メリチン SS－Flag タグーヒト β 2 アドレナリン受容体ーEE タグ (配列番号20) と、(c) ヘマグルチニン SS－ヒトニューロキニン3 受容体ーHSV タグーMyc タグ (配列番号21) と、(d) メリチン SS－Flag タグーヒト m1 mACHRーEE タグ (配列番号22) と、(e) ヘマグルチニン SS－ラット m3 mACHRーHSV タグー8 His タグ (配列番号23) とからなる群から選択される。

20

【0023】

第3の態様では、本発明は、(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、(b) 下記の要素、すなわち (i) N末端メチオニン残基、(ii) 異種シグナル配列 (SS)、(iii) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、(iv) アフィニティ精製に有用な少なくとも2つのタグ配列、および (v) 疎水性タンパク質 (HP) 配列からなる人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とからなる、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子を提供する。前記態様のある実施形態では、N末端メチオニン配列および異種シグナル配列が、(a) MKFLVNVALVFMMVYISYIYA (配列番号24) と、(b) MVRTAVLLILLVRFSEPCOOH (配列番号25) と、(c) MKTIIALSYIFCLVFA (配列番号26) と、(d) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEP－COOH (配列番号27) と、(e) MGKNPLGVRKTEETSQVAPA－COOH (配列番号28) とからなる群から選択される。

30

【0024】

前記態様のある実施形態では、タグ配列が、(a) FLAG タグ (NH₂－DYKDDD DK－COOH) (配列番号1) と、(b) EE タグ (NH₂－EEEEYMPME－COOH) (配列番号2) と、(c) ヘマグルチニン・タグ (NH₂－YPYDVPDYA－COOH) (配列番号3) と、(d) myc タグ (NH₂－KHKL EQLRNSGA－COOH) (配列番号4) と、(e) HSV タグ (NH₂－QPELAPEDPED－COOH) (配列番号5) とからなる群から選択されたエピトープ・タグ配列からなる。

40

【0025】

第3の態様のある実施形態では、人工的に改変された疎水性タンパク質の要素が、(a) SS－タグ1－タグ2－HP と、(b) SS－タグ1－HP－タグ2 と、(c) SS－HP－タグ1－タグ2 とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される。前記態様のある実施形態では、人工的に改変された疎水性タンパク質が、

50

(a) GP67 SS-Myc タグーEE タグーヒト m2 mAChR (配列番号 19) と、(b) メリチン SS-Flag タグーヒト β 2 アドレナリン受容体-EE タグ (配列番号 20) と、(c) ヘマグルチニン SS-ヒト ニューロキニン3 受容体-HSV タグーMyc タグ (配列番号 21) とからなる群から選択される。第3の態様のさらなる実施形態では、タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号 17) とデカヒスチジン配列 (配列番号 18) とからさらになる。

【0026】

第4の態様では、本発明は、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法であって、(a) (i) 膜タンパク質、(ii) 内在性膜タンパク質、(iii) 膜貫通タンパク質、(iv) モノトピック型膜タンパク質、(v) ポリトピック型膜タンパク質、(vi) ポンプ・タンパク質、(vii) チャンネル・タンパク質、(ix) 受容体キナーゼタンパク質、(x) Gタンパク共役受容体タンパク質、(xi) 膜結合酵素、および (xii) 輸送体タンパク質からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、該疎水性タンパク質に、(i) 極性脂質、(ii) 両親媒性高分子ポリマー、(iii) 表面活性物質または界面活性剤、および (iv) 両親媒性ポリペプチドからなる群から選択される両親媒性物質が結合していることと、(b) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一または不均一な溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコード・ライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、(c) 非結合分子から複合体を分離する工程と、(d) 質量スペクトル分析によってリガンド分子を同定する工程とからなる方法を提供する。

【0027】

第5の態様では、本発明は、疎水性タンパク質に対するリガンドを同定するための方法であって、(a) (i) 膜タンパク質、(ii) 内在性膜タンパク質、(iii) 膜貫通タンパク質、(iv) モノトピック型膜タンパク質、(v) ポリトピック型膜タンパク質、(vi) ポンプ・タンパク質、(vii) チャンネル・タンパク質、(ix) 受容体キナーゼタンパク質、(x) Gタンパク共役受容体タンパク質、(xi) 膜結合酵素、および (xii) 輸送体タンパク質からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、疎水性タンパク質に、(i) 極性脂質、(ii) 両親媒性高分子ポリマー、(iii) 表面活性物質または界面活性剤、および (iv) 両親媒性ポリペプチドからなる群から選択される両親媒性物質が結合していることと、(b) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一または不均一な溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコードされていないライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、(c) 非結合分子から複合体を分離する工程と、(d) 質量スペクトル分析によってリガンド分子を同定する工程とからなる方法を提供する。

【0028】

第6の態様では、本発明は、疎水性タンパク質を単離する方法であって、(a) (i) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(ii) (A) FLAG タグ (NH₂-DYKD DDDK-COOH) (配列番号 29)、(B) EE タグ (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号 30)、(C) ヘマグルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号 31)、(D) myc タグ (NH₂-KHKL EQLRNSGA-COOH) (配列番号 32)、および (E) HSV タグ (NH₂-QPEL APE DPE D-COOH) (配列番号 33) からなる群から選択されたアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(iii) (A) 膜タンパク質、(B) 内在性膜タンパク質、(C) 膜貫通タンパク質、(D) モノトピック型膜タンパク質、(E) ポリトピック型膜タンパク質、(F) ポンプ・タンパク質、(G) チャンネル・タンパク質、(H) 受容体キナーゼタンパク質、(I) Gタンパク共役受容体タンパク質、(J) 膜結合酵素、および (K) 輸送体タンパク質からなる群から選択された疎水性タンパク質 (HP) 配

列とからなる疎水性タンパク質を選択する工程と、(b) 疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、(c) 疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、(d) 疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程とからなる方法を提供する。

【0029】

第7の態様では、本発明は、(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、(b) 下記の要素、すなわち (i) N末端メチオニン残基と、(ii) N末端メチオニン配列および異種シグナル配列が、(1) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号24)、(2) MVRTAVLLLVRFSEIP (配列番号25)、(3) MKTIIALSYIFCLVFA (配列番号26)、(4) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PF EAPQYYLAEPCOOH (配列番号27)、および(5) MGKNPLGVVKTE TSQVAPACOOH (配列番号28) からなる群から選択される異種シグナル配列(SS)と、(iii) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(iv) (1) FLAGタグ(NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号1)、(2) EEタグ(NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号2)、(3) ヘマグルチニン・タグ(NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号3)、(4) mycタグ(NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号4)、および(5) HSVタグ(NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号5) からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(v) (1) 膜タンパク質、(2) 内在性膜タンパク質、(3) 膜貫通タンパク質、(4) モノトピック型膜タンパク質、(5) ポリトピック型膜タンパク質、(6) ポンプ・タンパク質、(7) チャンネル・タンパク質、(8) 受容体キナーゼタンパク質、(9) Gタンパク質共役受容体タンパク質、(10) 膜結合酵素、および(11) 輸送体タンパク質からなる群から選択される疎水性タンパク質(HP) 配列とを含む人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とを含む、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明は、薬理学および医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、新規な薬剤および医学的診断の開発に特に関連の深い個別のリガンド分子の同定のため、疎水性タンパク質をスクリーニングすることに関する。

【0031】

本明細書で引用される特許および科学文献は、当業者が利用可能な知識を明らかにする。発行された米国特許、許可された出願、公開された外国出願、および本明細書で引用された参考文献を本願明細書に援用する。これらの出典と本明細書との矛盾は、後者を優先することによって解消される。

【0032】

本発明は、HP標的の特定の生物学的機能とは無関係に両親媒性物質の存在下で実施可能な、アフィニティ選択に基づいたHPスクリーニング法を提供する。

【0033】

本発明の態様は、分子生物学、細胞生物学、および免疫学の分野で一般的な技法および方法を利用する。これらのタイプの方法に有用な実験室用参考文献は、当業者に容易に利用可能である。例えば、Molecular Cloning、A Laboratory Manual 第2版、サムブルック、ジェイ(Sambrook, J.)、フリッシュ、ビーエフ(Fritsch, B. F.)、およびマニアティス、ティー(Manias, T.) 編、(1989年)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press) ; Current Protocols In Molecular Biology and Current Protocols in Immunology、ワイリー・インターサイエンス(Wiley Interscience) [ニューヨーク(Ne 40 50]

w York) 所在] ; ハーロー・アンド・レーン (Harlow & Lane)、Antibodies: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・プレス (Cold Spring Harbor Press) [ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor) 所在] を参照されたい。

【0034】

本明細書における本発明は、疎水性タンパク質の調製および精製に関し、また疎水性タンパク質に特異的に結合するリガンドを同定する方法に関する。本明細書で使用する「疎水性タンパク質」という用語は、両親媒性物質と共に調製された任意の精製タンパク質を指す。あるいはこの用語は、純度1%を超えて精製され、または純度10%を超えて精製され、または純度25%を超えて精製され、または純度50%を超えて精製されたときに、安定性（保存寿命または凍結融解サイクルに耐える能力）を高めるため、あるいは酵素分析、リガンド結合アッセイ、円偏光2色性、平均サイズ、形状、または密度の流体力学的評価、高次構造に特異的な抗体との相互作用を含めた一般的な実験室技法により観察される高次構造の完全性を維持するため、機能的アッセイに両親媒性物質の存在を必要とするかもしくはその存在が利益となる、任意のタンパク質を指してもよい。好ましい実施形態において、本発明の疎水性タンパク質は哺乳動物の疎水性タンパク質である。特に好ましい実施形態では、本発明の疎水性タンパク質はヒトの疎水性タンパク質である。

【0035】

「疎水性タンパク質」という用語は、疎水性タンパク質の同定のために設計されたアルゴリズムの下記の非限定的な例、すなわち (a) DAS-Dense Alignment Surface 法を使用した、原核細胞における膜貫通領域の予測（ストックホルム大学）、エム、チェルゾ (M. Cserzo)、イー、ワリン (E. Wallin)、アイ、シモン (I. Simon)、ジー、フォン・ヘイネ (G. von Heijne)、およびエー、エロフソン (A. Elofsson) : 原核生物の膜タンパク質における膜貫通 α ヘリックスの予測: Dense Alignment Surface 法 (Prediction of transmembrane α -helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method) ; Prot. Eng. 第10巻、第6号、673~676ページ、1997年; (b) HMMTOP-タンパク質の膜貫通ヘリックスおよびトポロジーの予測（ハンガリー科学アカデミー）、ジー、イー、タスナディ (G. E. Tusnady) およびアイ、シモン (I. Simon) (1998年) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction. J. Mol. Biol. 第283巻、489~506ページ; (c) 隠れマルコフモデル予測、イー、エル、エル、ゾーンハンマー (E L L Sonnhammer)、ジー、フォン・ヘイネ (G. von Heijne)、およびエー、クロー (A. Krogh) : A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. 分子生物学のためのインテリジェント・システムに関する第6回国際会議要旨集 (ISMB98)、175~182ページ、1998年; (d) TMAP-多重配列アライメントに基づく膜貫通検出（カロリンスカ研究所 (Karolinska Institute) ; スウェーデン) 参考文献なし: URL <http://www.mbb.ki.se/tamp/> を参照のこと; および (e) TopPred 2-膜タンパク質のトポロジー予測（ストックホルム大学）を用いたバイオインフォマティクス支援手段によって同定されたタンパク質も含む。「膜タンパク質構造予測、疎水性の分析と正電荷の分布の偏り (Membrane Protein Structure Prediction, Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule)」、ガンナー、フォン・ヘイネ (Gunnar von Heijne)、J. Mol. Biol. (1992年) 第225巻、487~494ページ、ならびにエム、チェルゾ (M. Cserzo)、イー、ワリン (E. Wallin)、アイ、シモン (I. Simon)、ジー、フォン・ヘイネ (G. von Heijne)、

10

20

30

40

50

およびエー、エロフソン (A. E l o f s s o n) : 原核生物の膜タンパク質における膜貫通 α ヘリックスの予測 : Dense Alignment Surface 法 (Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins): the Dense Alignment Surface method) ; Prot. Eng. 第10巻、第6号、673~676ページ、1997年。

【0036】

これらの方法の比較のため、Protein Engineering 誌、第10巻、第6号 (1997年) に記載されている「原核生物の膜タンパク質における膜貫通 α ヘリックスの予測 : Dense Alignment Surface 法 (Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method)」、ミクロス チェルゾ (Miklos Cserzo)、エリック ワリン (Erik Wallin)、イスタヴァン シモン (Istvan Simon)、ガンナー フォン ヘイネ (Gunnar von Heijne)、およびアーネ・エロフソン (Arne Elofsson) を参照されたい。

【0037】

単なる典型的な例として、疎水性タンパク質 (本明細書で使用される用語として) の非限定的な例を表1に示す。これらのタンパク質は、全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のローカス名で表示されるように、GenBank にリスト化されている。

【0038】

【表1】

表1: 疎水性タンパク質の非限定的な例	
一般名	NCBI ローカス
Kv1.3 Shaker ファミリーK ⁺ チャネル ポリトピック型	ローカス NP_002223 523 aa PRI 31-OCT-2000 定義 電位依存性カリウムチャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー3 [ヒト] 受入番号 NP_002223 PID g4504815 バージョン NP_002223.1 GI: 4504815
m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 G タンパク質共役受容体 クラスA、 ポリトピック型	ローカス NP_000730 466 aa PRI 31-OCT-2000 定義 コリン作動性受容体、ムスカリン性2 ; ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 [ヒト] 受入番号 NP_000730 PID g4502817 バージョン NP_000730.1 GI: 4502817 DB ソース REFSEQ : 受入番号 NM 000739.1
セクレチン受容体 G タンパク質共役受容体 クラスB、 ポリトピック型	ローカス NP_002971 440 aa PRI 31-OCT-2000 定義 セクレチン受容体 [ヒト] 受入番号 NP_002971 PID g4506825 バージョン NP_002971.1 GI: 4506825 DB ソース REFSEQ : 受入番号 NM 002980.1

【表1A】

表 1: 疎水性タンパク質の非限定的な例	
一般名	NCBI ローカス
メタボトロピック・グルタミン酸受容体、タイプ 4 Gタンパク質共役受容体 クラス C、 ポリトピック型	ローカス NP_000832 912 aa PRI 31-OCT-2000 定義 グルタミン酸受容体、メタボトロピック 4 [ヒト] 受入番号 NP_000832 PID g4504141 バージョン NP_000832.1 GI: 4504141 DB ソース REFSEQ: 受入番号 NM_000841.1
上皮成長因子受容体 膜貫通受容体キナーゼ	ローカス AAB19486 10 aa PRI 29-JUN-2000 定義 上皮成長因子受容体; EGFR [ヒト] 受入番号 AAB19486 PID g8815559 バージョン AAB19486.2 GI: 8815559 DB ソース ローカス S 51343 受入番号 S51343.1
シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-1) 内在性膜酵素 モノトピック型	ローカス PGH2_HUMAN 604 aa PRI 15-DEC-1998 定義 プロスタグランジン G/H 合成酵素 2 前駆体 (シクロオキシゲナーゼ-2) (COX-1) (プロスタグランジン-エンドペルオキシド合成 酵素 2) (プロスタグランジン H 2 合成酵素 2) (PGH 合成酵素 2) (PGHS-2) (PHS II) 受入番号 P35354 PID g3915797 バージョン P35354 GI: 3915797 DB ソース swissprot: ローカス PGH2 HUMAN, 受 入番号 P35354
Ca ⁺⁺ ATPアーゼ 内在性膜酵素 ポリトピック型	ローカス NP_001675 1205 aa PRI 31-OCT-2000 定義 ATPアーゼ、Ca ⁺⁺ 輸送、原形質膜 4 [ヒト] 受入番号 NP_001675 PID g4502289 バージョン NP_001675.1 GI: 4502289 DB ソース REFSEQ: 受入番号 NM_001684.1 EC 3.6.1.38

10

20

30

40

【表 1 B】

表 1: 疎水性タンパク質の非限定的な例	
一般名	NCBI ローカス
シトクロムCオキシダーゼ 内在性膜酵素 ポリトピック型	13種の異なるポリペプチド・サブユニット 詳細はProtein Data Bank #1OCC 参照 http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=chains&pdbId=1OCC&page=&pid=4725 EC 1.9.3.1
アクアポリン、タイプ3 チャネル、 ポリトピック型	ローカス NP_004916 292 aa PRI 01-NOV-2000 定義 アクアポリン3 [ヒト] 受入番号 NP_004916 PID g4826645 バージョン NP_004916.1 GI: 4826645 DB ソース REFSEQ: 受入番号 NM 004925.2
外膜ホスホリパーゼA 内在性膜酵素 ポリトピック型 β -バレル	詳細はProtein Data Bank #1QD5 参照 EC 3.1.1.32
セロトニン輸送体 輸送体、 トポロジー不明	ローカス NP_001036 630 aa PRI 31-OCT-2000 定義 溶質キャリアファミリー6 (神経伝達物質輸送体、セロトニン)、メンバ4; 溶質キャリアファミリー6 (神経伝達物質輸送体、セロトニン)、[ヒト] 受入番号 NP_001036 PID g4507043 バージョン NP_001036.1 GI: 4507043 DB ソース REFSEQ: 受入番号 NM 001045.1
エリスロポエチン受容体 非酵素的膜貫通受容体	ローカス NP_058698 507 aa ROD 01-NOV-2000 定義 エリスロポエチン受容体 [ラット] 受入番号 NP_058698 PID g8393319 バージョン NP_058698.1 GI: 8393319 DB ソース REFSEQ: 受入番号 NM 017002.1

当業者には理解されるように、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法は、小分子を結合するリガンドのスクリーニング方法と同義である。さらに、本明細書で使用するように、「スクリーニング」という用語は、例えば疎水性タンパク質などのポリペプチドと小分子との相互作用を検出するのに使用される手順を指し、 $K_d < 200 \mu M$ でタンパク質に結合するリガンドと、タンパク質に結合しないかまたは $K_d > 200 \mu M$ でタンパク質に非常に弱く結合するにすぎない大きなリガンド集合とを区別するのに有用である。

【0039】

本発明は、疎水性タンパク質リガンドの同定において、質量スペクトル分析（質量分析法（MS））を利用する。MS技法は、疎水性タンパク質を含有するサンプルを分析するた

10

20

30

40

50

めにはまれにしか行われないが、その理由はこれらのサンプルが界面活性剤の両親媒性物質を含有するからである。界面活性剤は、検体のイオン形成、すなわちMSにとって極めて重要な現象を抑制し、MSを著しく妨げるので、疎水性タンパク質のMS分析がうまく行われたという報告はほとんどない。それにもかかわらず、いくつかの研究室は、MS分析の前に界面活性剤を除去する方法を明らかにすることにより精製済みの疎水性タンパク質のMS分析を行うことを試みてきた。これらの研究室の全てが、タンパク質サンプルを検出器にかけるためにマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)を使用する。

【0040】

しかし、疎水性タンパク質のサンプルを調製する既知の方法全てが、MS分析の前にポリペプチドから界面活性剤を抽出するために有機溶媒および／または酸を使用する。そのような処理によりポリペプチドが変性し、変性によりリガンドが検体の疎水性タンパク質に結合することができなくなる。疎水性タンパク質とリガンドとの相互作用に関する研究にMSを使用することに興味を持っている研究者にとって、変性を生じる調製法は適切ではない。さらに、MALDI-MSによる分析のため膜タンパク質を調製することは、本発明によって提供される方法に比べて労力を要する仕事である。

【0041】

これとは対照的に、ある好ましい実施形態では、本発明は、膜タンパク質サンプルがSEC分離からMS検出器に移るときにそのサンプルを流体として扱うことが可能であるエレクトロスプレーイオン化(ESI)MSを使用する。したがって、MS分析は、サンプルがRPCカラムに送られた後30秒未満で進行する。

【0042】

質量スペクトル分析の前にタンパク質サンプルから界面活性剤を除去しなければならない理由は周知であり、例えば下記の参考文献：(a) *BioTechniques* (1997年)第22巻：244～250ページ；ジェイ ピーシー ヴィッサーズ(J. P. C. Vissers)、ジェイ ピー シャーベット(J. -P. Chervet)、ケイ サンボーン(K. Sanborn)、およびジェイ ピー ザルツマン(J. -P. Salzmann)；(b) *Protein Science* (1994年)第3巻：1975～1983ページ；アール アール オゴルザレク ルー(R. R. Ogorszal ek Loo)、エヌ デールズ(N. Dales)およびピー シー アンドリュース(P. C. Andrews)；(c) *J. Mass. Spectrom.* (1995年)第30巻：1462～8ページ、ロシンカ ビー(Rosinke B)、ストルパット ケイら(Strupat, K., et al.)；*Methods Enzymol.* (1996年)第270巻：519～51ページ；ベアビス アールシー(Beavis, RC)およびチェイト ビーティー(Chait, BT)；および*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990年)第87巻：6873～7ページ；ベアビス アールシー(Beavis, RC)およびチェイト ビーティー(Chait, BT)；ファーンレイ アイ エムら(Fearnley, I. M. et al.)、*Biochem. Soc. Trans.*、(1996年)第24巻：12～917ページ、に示されている。

【0043】

第1の態様では、本発明は、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法であって、(a) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1個の複合体の形成が促進されるように、両親媒性物質に結合された疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、リガンド分子を選択する工程と、(b) この複合体を非結合分子から分離する工程と、(c) リガンド分子を同定する工程とからなる方法を提供する。

【0044】

本発明のアフィニティ・スクリーニング法は、機能的選択法と区別される。機能的選択法は、ある特異的なタンパク質-リガンド相互作用またはタンパク質-タンパク質相互作用を有意であると認める基準に基づいてリガンドを選択することを含み、そのようなリガ

10

20

30

40

50

ド選択は、タンパク質に起因し得る作用（例えば酵素の化学触媒作用）、またはタンパク質とその他のある分子との間の何らかの相互作用（例えば、非酵素の場合は、タンパク質と既知の小分子リガンドとの相互作用）を確認することのいずれかに依存する。手短に言えば、これらのスクリーニング法は一般に、酵素的アッセイまたは生体機能的アッセイあるいはリガンド置換アッセイに基づくものである。

【0045】

本発明の方法の様々な実施形態は、新規な薬物リードを発見するために自動リガンド同定システム（ALIS）を利用することが可能である。ALISは、化合物のその標的タンパク質に対する親和性に基づいてリガンドを選択し、質量スペクトル分析によってリガンドを同定する（国際特許出願国際公開番号第99/35109号を参照のこと）。本明細書で述べる発明では、両親媒性物質と複合したHPにALISを利用する。

10

【0046】

本明細書で使用する「アフィニティ選択」という用語は、選択されたタンパク質標的に対するある分子の親和性に基づいたリガンド選択を意味し、そのようなリガンド選択は、タンパク質がその小分子に結合すること以外、問題のタンパク質の機能的活性には左右されない。

【0047】

本明細書で使用する「両親媒性物質」という用語は、疎水性ポリペプチドの水溶性を高める界面活性剤、リン脂質、または表面活性物質としての性質を通常有する任意の分子、特に、水溶液中で会合コロイドとして振る舞うことが知られている任意の分子を指すのに使用され、そのような両親媒性物質の非限定的な例には、リン脂質およびその他の極性脂質（例えばホスファチジルコリン、リゾリン脂質、コレステロール、レシチン、セラミドなど）；両親媒性高分子ポリマー（例えばクリストフ トリベット（Christophe Tribet）およびジーンールク ポポット（Jean-Luc Popot）の研究（トリベット シーラ（Tribet, C., et al.）J. L. Natl. Acad. Sci. USA（1996年）第93巻：15047～50ページ））；アルキルサッカライド、アルキルチオグリコシド、アルキルジメチルアミンオキシド、コール酸塩およびCHAPSシリーズ、FOS-CHOLINE（登録商標）シリーズ、CYMAL（登録商標）シリーズもしくはCYGLU（登録商標）シリーズなどの胆汁酸誘導体、グルカミド、ならびにアルキルポリオキシエチレンなどを含む表面活物物質；または両親媒性構造をとることが知られているポリペプチド（例えばシー イー シャフマイスター（C. E. Schafmeister）およびアール エム ストラウド（R. M. Stroud）の研究（シャフマイスター、シー イーら（Schafmeister, C. E. et al.）、RM Science（1993年）第262巻：734～8ページ））が含まれるであろう。

20

30

【0048】

本明細書で使用する「多数の分子」という用語は、疎水性標的タンパク質に対する特異的結合性に関して試験される複数の分子を指す。「分子」という用語は、サイズが150～5000原子質量単位（amu）の範囲内にある任意の化合物を意味する。そのような化合物は、当技術分野で知られている任意の手段によって生成することが可能である。多数の分子を生成する特に好ましい方法は、コンビナトリアル・ケミストリーを利用する。「コンビナトリアル・ライブラリ」は、構造上関連のある、もしくは関連のない1組の化学的もしくは生化学的構築単位を、所与の化合物の長さに対してあらゆる可能な方法で結合することによって形成される、複数の分子または化合物を指す。あるいはこの用語は、特定の1組の化学的構築単位を選択的に結合することによって形成される、複数の化学的または生化学的化合物を指す。例えば、20種のアミノ酸をランダムに結合して6量体ペプチドにすると、6400万種以上の化合物を生成することになる。「コンビナトリアル・ライブラリ」の手法によれば、可能な限り多くの異なる化合物が作製され、次いで、問題の標的分子、例えば疎水性タンパク質に対する結合活性に関してそれらをスクリーニングすることにより候補化合物が選択される。

40

50

【0049】

現在、コンビナトリアル・ライブラリを構築するための、当技術分野で周知の数多くの方法がある。非限定的な例として、下記の参考文献は、コンビナトリアル・ライブラリを構築するための方法を提供する：いくつか例を挙げると、米国特許第6,147,344号；（国際公開第99/35109号；第6,114,309号；第6,025,371号；第6,017,768号；第5,962,337号；第5,919,955号；および第5,856,496号がある。本明細書で使用する「多数の分子」という用語は、例えば体液、組織または細胞から得られた複数の天然分子または天然化合物を指してもよい。これらのサンプルを、リガンド・スクリーニング・プロトコルで使用する前にインビトロで、例えばタンパク質分解により消化するなどして処理してもよい。

10

【0050】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、均一溶液相の条件下で行われる。第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、不均一溶液相の条件下で行われる。第1の態様のある実施形態では、リガンド分子の選択は多次元クロマトグラフィを使用して実施される。

【0051】

本明細書で使用する「均一溶液相」という用語は、起こりうるタンパク質-リガンド相互作用を促進する目的でタンパク質と1つまたは複数のリガンドとを組み合わせたタンパク質調製物を意味するが；そのような調製物は、タンパク質もリガンドも支持要素に結合しないよう-40～60℃の温度範囲においてはゾルの状態であり；これらの調製物は、カットオフ・サイズが5.0 μMの半透膜を通過するか、もしくは沈降係数が500スベドベリ未満のように挙動するかのいずれか、またはその両方であり；そのような調製物の例には、両親媒性物質に可溶化されたタンパク質や、プロテオリポソームに取り込まれたタンパク質、細胞由来のウイルス様粒子に取り込まれたタンパク質などと、リガンドとの組合せが含まれると考えられる。

20

【0052】

本明細書で使用する「不均一溶液相」という用語は、起こりうるタンパク質-リガンド相互作用を促進する目的でタンパク質と1つまたは複数のリガンドとを組み合わせたタンパク質調製物を意味するが；そのような調製物は、タンパク質またはリガンドのいずれかが支持要素に結合するよう-40～60℃の温度範囲において混合物の状態であり；これらの調製物は、カットオフ・サイズが5.0 μMの半透膜を通過することができないか、もしくはこれらが500スベドベリを超える沈降係数を有するかのいずれかに挙動するかのいずれか、またはその両方であり；そのような調製物の例には、タンパク質が共有結合もしくは非共有結合または両親媒性物質の自己会合に依存する結合のいずれかを介してビーズ／固定要素に付着している、ビーズ／固定要素の表面に存在するタンパク質とリガンドの組合せ、または固定相に固定されたリガンドとタンパク質との組合せが含まれると考えられる。

30

【0053】

本明細書で使用する「多次元クロマトグラフィ」という用語は、連携する複数のクロマトグラフ法を含むサンプル処理手順を意味する。クロマトグラフ法の代表的なタイプには、（1）固相クロマトグラフィ媒体：小粒子（<5 μM）、固体多孔質キャスティング、フィルタ、または半透膜を含めた様々な材料のいずれかであって、一般に樹脂、ゲル、固定化人工膜、固相要素もしくはその他の名称と呼ばれるものであり、かつクロマトグラフィまたは電気泳動による分離または分画化のように、その表面上またはその表面を通過して可溶化検体が通過し、またはその表面と可溶化検体とが相互に作用する固定表面を提供する目的で使用するものと、（2）液相クロマトグラフィ媒体：固相クロマトグラフィ媒体と組み合わせて使用する場合、電気泳動による分離または分画化における使用に適した溶液または流体とが含まれる。

40

【0054】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質は、膜タンパク質、内在性膜タン

50

パク質、膜貫通タンパク質、モノトピック型膜タンパク質、ポリトピック型膜タンパク質、ポンプ・タンパク質、チャネル・タンパク質、受容体キナーゼタンパク質、Gタンパク質共役受容体タンパク質、膜結合酵素、および輸送体タンパク質からなる群から選択される。

【0055】

第1の態様のある実施形態では、多数の分子はマスコードされた分子ライブラリである。第1の態様のある実施形態では、多数の分子はマスコードされていない分子ライブラリである。

【0056】

本明細書で使用する「マスコード・ライブラリ」という用語は、マスコードされたコンビナトリアル・ライブラリを指す。マスコード・コンビナトリアル・ライブラリの化合物は、一般式が $X(Y)_n$ であって、Xは骨格であり、各Yは周辺部分であり、nは1より大きい整数で典型的には2から約6までである。本明細書で使用する「骨格」という用語は、2つ以上の周辺部分が共有結合を介して結合している分子の一部分を指す。骨格は、マスコードされた化合物群の各メンバに共通な、分子の一部分である。本明細書で使用する「周辺部分」という用語は、骨格に結合した分子の一部分を指す。マスコードされた化合物群の各メンバは骨格に結合したn個の周辺部分の組合せを含むことになり、この一連の化合物がマスコード・コンビナトリアル・ライブラリを形成する。マスコード・ライブラリについては、本願明細書に援用される特許出願国際公開番号第9935109A1号にさらに詳細に述べられている。

10

20

【0057】

本明細書で使用する「マスコードされていない分子のライブラリ」という文言は、マスコード・コンビナトリアル・プロセスによって作製されたのではない任意の複数の分子または化合物を意味する。したがってこの用語には、コンビナトリアル・ライブラリを作製するその他の方法のいずれか、および全てが含まれる。さらにこの用語は、標的タンパク質の構造に基づいて薬物を設計しようとする「構造に基づく薬物設計」の方法によって構築された化合物群と、体液、組織、または細胞から得られた天然の化合物ライブラリも含む。

【0058】

第1の態様のある実施形態では、両親媒性物質が、(a)極性脂質と、(b)両親媒性高分子ポリマーと、(c)表面活性物質または界面活性剤と、(d)両親媒性ポリペプチドとからなる群から選択される。第1の態様のある実施形態では、リガンドの同定を質量スペクトル分析によって行う。第1の態様のある実施形態では、リガンド分子のデコンボリューションを質量スペクトル分析によって行う。第1の態様のある実施形態では、非結合分子からの複合体の分離を固相クロマトグラフィ媒体により行う。

30

【0059】

本明細書で使用する「リガンド(の)同定」という用語は、スクリーニングで検出された小分子の構造組成を正確に特定し得る任意のプロセスを意味する。

【0060】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質は、(a)少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(b)アフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(c)疎水性タンパク質(HP)配列とからなる。この態様のある実施形態では、疎水性タンパク質配列が、(a)膜タンパク質と、(b)内在性膜タンパク質と、(c)膜貫通タンパク質と、(d)モノトピック型膜タンパク質と、(e)ポリトピック型膜タンパク質と、(f)ポンプ・タンパク質と、(g)チャネル・タンパク質と、(h)受容体キナーゼタンパク質と、(i)Gタンパク質共役受容体タンパク質と、(j)膜結合酵素と、(k)輸送体タンパク質とからなる群から選択される。この態様のある実施形態では、タグ配列が、(a)FLAGタグ($\text{NH}_2\text{-DYKDDDDK-COOH}$) (配列番号1)と、(b)EEタグ($\text{NH}_2\text{-EEEEYMPME-COOH}$) (配列番号2)と、(c)ヘマグルチニン・タグ($\text{NH}_2\text{-YPYDVPDYA-COOH}$) (配列番号3)と、(d)

40

50

）myc タグ（NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH）（配列番号4）と、（e）HSV タグ（NH₂-QPELAPEDPED-COOH）（配列番号5）と、（f）ロドプシン・タグ（NH₂GTEGPNFYVPFSSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAE PWQFSM-COOH）（配列番号6）とからなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む。

【0061】

第1の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、（a）タグ1-タグ2-HPと、（b）タグ1-HP-タグ2と、（c）HP-タグ1-タグ2とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む。この態様のある実施形態では、本発明は、疎水性標的タンパク質が、（a）Myc タグ-EE タグ-ヒトm2 mACHR（配列番号6）と、（b）Flag タグ-ヒトβ2 アドレナリン受容体-EE タグ（配列番号7）と、（c）ヒトニューロキニン3受容体-HSV タグ-Myc タグ（配列番号9）と、（d）Flag タグ-ヒトm1 mACHR-EE タグ（配列番号10）と、（e）ラットm3 mACHR-HSV タグ-8His タグ（配列番号11）とからなる群から選択される方法を提供する。この態様のある実施形態では、本発明は、疎水性標的タンパク質がアミノ末端に異種シグナル配列（SS）をさらに含む方法を提供する。この態様のある実施形態では、異種シグナル配列が、（a）メリチン・シグナル配列NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH（配列番号12）と、（b）GPシグナル配列NH₂-VRTAVLLILLVRFSEPP-COOH（配列番号13）と、（c）ヘマグルチニン・シグナル配列NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH（配列番号14）と、（d）ロドプシン・タグ1シグナル配列NH₂-MNGTEGPNFYVPFSSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEPP-COOH（配列番号15）と、（e）ロドプシン・タグID4シグナル配列NH₂-GKNPLGV RKTETSQVAPA-COOH（配列番号16）とからなる群から選択される。この態様のある実施形態では、タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列（配列番号17）とデカヒスチジン配列（配列番号18）とをさらに含む。さらにこの態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、（a）GP67 SS-Myc タグ-EE タグ-ヒトm2 mACHR（配列番号19）と、（b）メリチンSS-Flag タグ-ヒトβ2 アドレナリン受容体-EE タグ（配列番号20）と、（c）ヘマグルチニンSS-ヒトニューロキニン3受容体-HSV タグ-Myc タグ（配列番号21）と、（d）メリチンSS-Flag タグ-ヒトm1 mACHR-EE タグ（配列番号22）と、（e）ヘマグルチニンSS-ラットm3 mACHR-HSV タグ-8His タグ（配列番号23）とからなる群から選択される。

【0062】

第2の態様では、本発明は、（a）疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、（b）疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、（c）疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程とからなる疎水性タンパク質を単離する方法を提供する。

【0063】

第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、（a）少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、（b）アフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、（c）疎水性タンパク質（HP）配列とからなる。この態様のある実施形態では、疎水性タンパク質配列が、（a）膜タンパク質と、（b）内在性膜タンパク質と、（c）膜貫通タンパク質と、（d）モノトピック型膜タンパク質と、（e）ポリトピック型膜タンパク質と、（f）ポンプ・タンパク質と、（g）チャネル・タンパク質と、（h）受容体キナーゼタンパク質と、（i）Gタンパク質共役受容体タンパク質と、（j）膜結合酵素と、（k）輸送体タンパク質とからなる群から選択される。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質のタグ配列が、（a）FLAG タグ（NH₂-DYKDDDDDK-COOH）（配列番号1）と、（b）EE タグ（NH₂-EEEEYMPME-COOH）（配列番号2）と、（c）ヘマグルチニン・タグ（NH₂-YPYDVPDYA-COOH）（配列

番号3)と、(d) myc タグ (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号4)と、(e) HSV タグ (NH₂-QP ELAPEDPED-COOH) (配列番号5)と、(f) ロドプシン・タグ (NH₂-MNGTEGP NFYVPFSNK TG VVRSPFEAPQYYLAE PWQFSM-COOH) (配列番号6)とからなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、(a) タグ1-タグ2-HPと、(b) タグ1-HP-タグ2と、(c) HP-タグ1-タグ2とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む。

【0064】

第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質が、(a) Myc タグ-EE タグ-ヒト m2 mACHR (配列番号7)と、(b) Flag タグ-ヒト β2 アドレナリン受容体-EE タグ (配列番号8)と、(c) ヒトニューロキニン3受容体-HSV タグ-Myc タグ (配列番号9)と、(d) Flag タグ-ヒト m1 mACHR-EE タグ (配列番号10)と、(e) ラット m3 mACHR-HSV タグ-8His タグ (配列番号11)とからなる群から選択される。この態様の実施形態では、疎水性タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列(SS)をさらに含む。この態様のある実施形態では、異種シグナル配列が、(a) メリチン・シグナル配列 NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH (配列番号12)と、(b) GPシグナル配列 NH₂-VRTAVLLILLVRFSEPCOOH (配列番号13)と、(c) ヘマグルチニン・シグナル配列 NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH (配列番号14)と、(d) 20 ロドプシン・タグ1シグナル配列 NH₂-MNGTEGP NFYVPFSNK TG VVRSPFEAPQYYLAEPCOOH (配列番号15)と、(e) ロドプシン・タグ ID4シグナル配列 NH₂-GKNPLGV RKTET SQVAPA-COOH (配列番号16)とからなる群から選択される。第2の態様のある実施形態では、疎水性タンパク質のタグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号17)とデカヒスチジン配列 (配列番号18)とをさらに含む。

【0065】

第2の態様のある実施形態では、疎水性標的タンパク質が、(a) GP67 SS-Myc タグ-EE タグ-ヒト m2 mACHR (配列番号19)と、(b) メリチン SS-Flag タグ-ヒト β2 アドレナリン受容体-EE タグ (配列番号20)と、(c) ヘマグルチニン SS-ヒトニューロキニン3受容体-HSV タグ-Myc タグ (配列番号21)と、(d) メリチン SS-Flag タグ-ヒト m1 mACHR-EE タグ (配列番号22)と、(e) ヘマグルチニン SS-ラット m3 mACHR-HSV タグ-8His タグ (配列番号23)とからなる群から選択される。

【0066】

第3の態様では、本発明は、(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、(b) 下記の要素、すなわち (i) N末端メチオニン残基、(ii) 異種シグナル配列(SS)、(iii) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、(iv) アフィニティ精製に有用な少なくとも2つのタグ配列、および (v) 疎水性タンパク質 (HP) 配列からなる人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とからなる、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子を提供する。

【0067】

「真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列」という文言は、真核細胞内での複製を可能にする複製起点と、選択可能なマーカー、例えば抗生物質耐性マーカーと、構造遺伝子の転写を促進するための、ウイルス、原核細胞、もしくは真核細胞由来のプロモーター配列要素とからなる任意のポリヌクレオチド配列を意味する。ベクター・ポリヌクレオチド配列の起源は、ウイルス、原核細胞、真核細胞、またはこれらを組み合わせたものである。当技術分野で理解されるように、ベクター配列は真核細胞での発現のために設計されているが、任意選択で原核細胞の複製起点を含んでもよい。適切なベクター・ポリヌクレオチド配列の非限定的な例には、下記のもの、すなわち pVL1 50

392 (ファーマーミンゲン (Pharming en)、[米国カリフォルニア州サンディエゴ所在]) や pBAC-1 (登録商標) (ノバゲン (Novagen)、[米国ウィスコンシン州マディソン所在]) などのバキュロウイルス・ベクターと、pCDNA3.1 (インビトロゲン (Invitrogen)、[米国カリフォルニア州サンディエゴ]) や pTriEx-1 (登録商標) (ノバゲン (Novagen) [米国ウィスコンシン州マディソン所在]) などの哺乳動物の発現ベクターが含まれる。

【0068】

適切なDNA配列は、様々な手順によってベクターに挿入し得る。一般にDNA配列は、当技術分野で知られている手順によって、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順およびその他の手順は、当業者の技術の範囲内とみなされる。

10

【0069】

ある実施形態では、本発明は、上述の構築物を含有する宿主細胞に関する。宿主細胞は、哺乳動物細胞などの高等真核細胞でも酵母細胞などの下等真核細胞でもよく、または宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞でもよい。宿主細胞への上記構築物の導入は、形質導入または形質転換またはトランスフェクションまたはエレクトロポレーションなどの（ただしこれらに限定されない）当技術分野で知られている任意の手段によって実施可能である。

【0070】

適切な異種シグナル配列 (SS) の例には、ミツバチのメリチンSS (NH₂-MKFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH) (配列番号12) (テッシャー、ディーシー (Tessier D. C.)、(1991年) Gene、第98巻: 177ページ) (インビトロゲンドットコム (Invitrogen. com) のpMelBac製品も参照のこと)、バキュロウイルスgp67 SS (NH₂-MVRTAVLLILLVRFSEP-COOH) (配列番号13) (クレッチュマー、ティーラ (Kretzschmar T. et al.)、(1996年) J. Immunol Methods、第195巻: 93~101)、インフルエンザA型ウイルス・ヘマグルチニンSS (NH₂-MKTIIIALSYIFCLVFA-COOH) (配列番号14) (ヴェルホーエン、エム (Verhoeven, M.)、(1980年) Nature、第286巻: 771~776ページ)、ロドプシン・タグ1 SS (NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEP-COOH) (配列番号15)、またはロドプシン・タグID4 SS (NH₂-GKNPLGVRKTEETSQVAPACOOH (配列番号16) が含まれる。一般に、そのような適切なSSの長さは75aaよりも短くなる。これらのシグナル配列は、動物細胞で発現したときにタンパク質から切断されても切断されなくてもよい。例えばロドプシン・タグ1は、細胞により原形質膜に提示された場合はタンパク質から切断されないが、ロドプシン・タグID4シグナル配列は切り離される。

20

30

【0071】

適切なエピトープ・アフィニティ・タグの非限定的な例には、FLAG (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号29)、"EE" (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号30)、ヘマグルチニン (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号31)、myc (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号32)、または単純ヘルペスウイルス・タグ ("HSV"; NH₂-QPPELLAPEDPED-COOH) (配列番号33) が含まれる。

40

【0072】

疎水性タンパク質に関するこれらの設計要素は、下記の順序、すなわち (1) SS-タグ1-タグ2-HP; (2) SS-タグ1-HP-タグ2; (3) SS-HP-タグ1-タグ2; のうちの1つの順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される。

【0073】

この態様のある実施形態では、N末端メチオニン配列と異種シグナル配列が、(a) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号24) と、(b) MVRTAVLLILLVRFSEP (配列番号25) と、(c) MKTIIIALSYIFCLVFA (配

50

列番号26)と、(d) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PF EAPQ
YYLAEP-COOH (配列番号27)と、(e) MGKNPLGV RKTETSQV
APA-COOH (配列番号28)とからなる群から選択される。

【0074】

この態様のある実施形態では、タグ配列が、(a) FLAGタグ (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号1)と、(b) EEタグ (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号2)と、(c) ヘマグルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号3)と、(d) mycタグ (NH₂-KHKL EQLRNSGA-COOH) (配列番号4)と、(e) HSVタグ (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号5)と、(f) ロドプシン・タグ (NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PF EAPQYYLAEPWQFSM-COOH) (配列番号6)とからなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む。

【0075】

第3の態様のある実施形態では、人工的に改変された疎水性タンパク質の要素が、(a) SS-タグ1-タグ2-HPと、(b) SS-タグ1-HP-タグ2と、(c) SS-HP-タグ1-タグ2とからなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される。この態様の実施形態では、人工的に改変された疎水性タンパク質が、(a) GP67-Myc-EE-ヒトm2 mACHR (配列番号19)と、(b) メリチン-F lag タグ-ヒトβ2アドレナリン受容体-EE (配列番号20)と、(c) ヘマグルチニンSS-ヒトニューロキニン3受容体-HSV-Myc (配列番号21)とからなる群から選択される。第3の態様の別の実施形態では、タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号17)とデカヒスチジン配列 (配列番号18)とをさらに含む。第3の態様のある実施形態では、人工的に改変された疎水性タンパク質が、(a) GP67-Myc-EE-ヒトm2 mACHR (配列番号19)と、(b) メリチン-F lag Tag-ヒトm1 mACHR-EE (配列番号20)と、(c) ヘマグルチニンSS-ラットm3 mACHR-HSV-8His (配列番号21)とからなる群から選択される。

【0076】

単離ポリヌクレオチドのHP配列は、両親媒性物質の存在下で単離されるタンパク質をコードする任意のポリヌクレオチドでよい。あるいはこの用語は、純度1%を超えて精製され、または純度10%を超えて精製され、または純度25%を超えて精製され、または純度50-99%を超えて精製されたときに、安定性 (保存寿命または凍結融解サイクルに耐える能力) を高めるため、あるいはリガンド結合アッセイ、円偏光2色性、平均サイズ、形状、または密度の流体力学的評価、高次構造に特異的な抗体との相互作用を含めた一般的な実験室技法により観察される高次構造の完全性を維持するため、機能的アッセイに両親媒性物質の存在を必要とするかもしくはその存在が利益となる、任意のタンパク質を指してもよい。好ましい実施形態では、本発明の疎水性タンパク質は哺乳動物の疎水性タンパク質である。特に好ましい実施形態では、本発明の疎水性タンパク質はヒト疎水性タンパク質である。

【0077】

単離ポリヌクレオチドのHP配列は、疎水性タンパク質の同定のために設計されたアルゴリズムに関する下記の非限定的な例、すなわち (a) DAS-Dense Alignment Surface法を使用した原核細胞における膜貫通領域の予測 (ストックホルム大学)、チェルゾ、エムら (Cserzo, M. et al.)、1997年、Prot. Eng. 第10巻: 673~676ページ; (b) HMMTOP-タンパク質の膜貫通ヘリックスおよびトポロジーの予測 (ハンガリー科学アカデミー)、ジーイー、タスナディ (G. E. Tusnady) およびアイシモン (I. Simon)、1998年、J. Mol. Biol. 第283巻、489~506ページ; (c) 隠れマルコフモデル予測、ゾーンハンマー、イーエルエルら (Sonnhhammer, E. L. L. et al.)、1998年、タンパク質配列における膜貫通ヘリックスを予測するための隠れマルコフモデル (A hidden Markov model for predicting transmembrane helices i

n protein sequences)、分子生物学のためのインテリジェント・システムに関する第6回国際会議要旨集(I S M B 98)、175~182ページ;(D) T M A Pー多重配列アライメントに基づく膜貫通検出(カロリンスカ研究所(K a r o l i n s k a I n s t i t u t e);スウェーデン)(参考文献なし:U R L <http://www.mbb.ki.se/tamp/>を参照のこと)および(e) T o p P r e d 2ー膜タンパク質のトポロジー予測(ストックホルム大学)、フォン・ヘイネ、ジー(v o n H e i j n e, G.) (1992年) J. M o l. B i o l. 第225巻、487~494ページおよびチェルゾ、エムら(C s e r z o, M. e t a l.)、1997年、P r o t. E n g. 第10巻、673~676ページ;を用いたバイオインフォマティクス支援手段によって同定されたタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含みうる。

10

【0078】

本発明のH Pポリヌクレオチドによってコードし得るタンパク質の代表的かつ非限定的な例を、本明細書の表1に示す。

【0079】

適切なG e n B a n k受入番号により上記に特定された全ての核酸配列および該核酸配列によってコードされる各アミノ酸配列を、引用により本願明細書に援用する。

【0080】

第4の態様では、本発明は、(a) (i) 膜タンパク質、(i i) 内在性膜タンパク質、(i i i) 膜貫通タンパク質、(i v) モノトピック型膜タンパク質、(v) ポリトピック型膜タンパク質、(v i i) ポンプ・タンパク質、(v i i i) チャネル・タンパク質、(i x) 受容体キナーゼタンパク質、(x) Gタンパク質共役受容体タンパク質、(x i i) 膜結合酵素、および(x i i i) 輸送体タンパク質からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、疎水性タンパク質に、(i) 極性脂質、(i i) 両親媒性高分子ポリマー、(i i i) 表面活性物質または界面活性剤、および(i v) 両親媒性ポリペプチドからなる群から選択される両親媒性物質が結合していることと、(b) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一または不均一な溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコード・ライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、(c) 非結合分子から複合体を分離する工程と、(d) 質量スペクトル分析によってリガンド分子を同定する工程とからなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法を提供する。

20

30

【0081】

第5の態様では、本発明は、(a) (i) 膜タンパク質、(i i) 内在性膜タンパク質、(i i i) 膜貫通タンパク質、(i v) モノトピック型膜タンパク質、(v) ポリトピック型膜タンパク質、(v i i) ポンプ・タンパク質、(v i i i) チャネル・タンパク質、(i x) 受容体キナーゼタンパク質、(x) Gタンパク質共役受容体タンパク質、(x i i) 膜結合酵素、および(x i i i) 輸送体タンパク質からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、疎水性タンパク質に、(i) 極性脂質、(i i) 両親媒性高分子ポリマー、(i i i) 表面活性物質または界面活性剤、および(i v) 両親媒性ポリペプチドからなる群から選択される両親媒性物質が結合していることと、(b) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一または不均一な溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコードされていないライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、(c) 非結合分子から複合体を分離する工程と、(d) 質量スペクトル分析によってリガンド分子を同定する工程とからなる、疎水性タンパク質に対するリガンドを同定する方法を提供する。

40

【0082】

第6の態様では、本発明は、(a) (i) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、(i i) (A) F L A Gタグ(NH₂-D Y K D D D D K-COOH)(配列番号29)、(B) E Eタグ(NH₂-E E E E Y M P M E-COOH)(配列番号30)、(C) ヘマグ

50

ルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号31)、(D) mycタグ (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号32)、および (E) HSVタグ (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号33) からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列、(iii) (A) 膜タンパク質、(B) 内在性膜タンパク質、(C) 膜貫通タンパク質、(D) モノトピック型膜タンパク質、(E) ポリトピック型膜タンパク質、(F) ポンプ・タンパク質、(G) チャネル・タンパク質、(H) 受容体キナーゼタンパク質、(I) Gタンパク質共役受容体タンパク質、(J) 膜結合酵素、および (K) 輸送体タンパク質からなる群から選択される疎水性タンパク質 (HP) 配列からなる疎水性タンパク質を選択する工程と、(b) 疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、(c) 疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、(d) 疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程とからなる、疎水性タンパク質を単離する方法を提供する。

【0083】

第7の態様では、本発明は、(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、(b) 下記の要素、すなわち (i) N末端メチオニン残基と、(ii) N末端メチオニン配列および異種シグナル配列が、(1) MKFLVNVALLVFMVVYISYIYA (配列番号24)、(2) MVRTAVLLILLVRFSEPP (配列番号25)、(3) MKTIIALLSYIFCLVFA (配列番号26)、(4) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEPP-COOH (配列番号27)、および (5) MGKNPLGVVKTEETSQVAPAP-COOH (配列番号28) からなる群から選択される異種シグナル配列 (SS) と、(iii) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列と、(iv) (1) FLAGタグ (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (配列番号1)、(2) EEタグ (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (配列番号2)、(3) ヘマグルチニン・タグ (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (配列番号3)、(4) mycタグ (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (配列番号4)、および (5) HSVタグ (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (配列番号5) からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列と、(v) (1) 膜タンパク質、(2) 内在性膜タンパク質、(3) 膜貫通タンパク質、(4) モノトピック型膜タンパク質、(5) ポリトピック型膜タンパク質、(6) ポンプ・タンパク質、(7) チャネル・タンパク質、(8) 受容体キナーゼタンパク質、(9) Gタンパク質共役受容体タンパク質、(10) 膜結合酵素、および (11) 輸送体タンパク質からなる群から選択される疎水性タンパク質 (HP) 配列とを含む人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とからなる、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子を提供する。

【0084】

以下の実施例は、本発明の、ある好ましい実施形態をさらに例示するものであり、本発明の範囲をどのようにも限定するものではない。

(実施例1)

COX-1のアフィニティ選択およびALISによる同定
 ケイマン・ケミカル社 (Cayman Chemical Company) [米国ミシガン州アナーバー (Ann Arbor) 所在] の精製ヒツジCOX-1 (SDS-PAGEで>95%) を、界面活性剤を交換することによってスクリーニング用に調製した。納品時にタンパク質に含まれていた界面活性剤、Tween-20を除去するために、イオン交換クロマトグラフィを行った。80mM Tris-8.0、0.09% Tween-20、270μM DDC、および240μM ドデシル-β-D-マルトシド (DβM) の緩衝液中に0.27mg/mLのCOX-1溶液を約6mL、すなわち理論上の収量が1.8mgとなるものを、80mM tris、pH8.0、240μM DβM (TBS-AGD) の緩衝液を含んだPoros (登録商標) HQカラムにアプライした。このカラムを、流量5mL/分で10分間、0~0.5M NaClの直線勾配で展

開した。タンパク質溶出画分を、280nmの吸光度をモニタすることによって同定した。

【0085】

この処理の後、タンパク質含有試料18mLを合わせ、製造業者の使用説明書に従って（ミリポアインコーポレイティッド社（Millipore, Inc.）[米国マサチューセッツ州ベッドフォード（Bedford）所在]）Amicon（登録商標）-30 Centricon（登録商標）で濃縮した。その結果、濃度約1.8mg/mlのCOX-1が得られ、これをスクリーニング用に1.3mg/mL（20μM COX-1）に希釈した。最終的なタンパク質調製物中の緩衝液は、2.4mM DβM、80mM tris-8.0、約50mM NaClからなると推定された。このCOX-1溶液に 10
、ケイマン・ケミカル社（Cayman Chemical Company）が用いる処理手順に従って20μMヘミンと300μM ジエチルジチオカルバメート（DDC）を即座に添加した。

【0086】

次いで、COX-1タンパク質調製物を添付のサンプル調製標準操作手順書（SOP、表2）に従ってサンプル調製に使用した。

【0087】

【表2】

【表 2 A】

続き
表 2
疎水性タンパク質リガンドスクリーニング手順

結合混合物の成分:	
最終タンパク質濃度	10 μ M
最終ライブラリー濃度	2.5 mM
個別リガンドの終濃度	1 μ M
全体積(1 回注入分)	12 μ L
ストック試薬:	
COX-1 標的タンパク質(2 $\times$ 、-80 度で保存)	80 mM Tris/240 μ M DBM 中、1.3 mg/mL (20 μ M)
BlacB 対照タンパク質(6 $\times$ 、4 度で保存)	1 $\times$ SEC 中、5.5 mg/mL (約 150 μ M) BlacB
ライブラリー(40 $\times$ 、80 度で保存)	DMSO 中、100mM
個別リガンド(40 $\times$ 、-80 度で保存)	DMSO 中、40 μ M
SEC プレミックス:	
SEC 緩衝液ストック(1M Tris 8.0)	400 μ L
水	4.6 mL
スクリーニング手順	
1. SEC プレミックス溶液ストック 80 mM Tris 8.0)を調製し、摂氏 42 度に予め平衡化する	
2. DMSO に溶かしたライブラリー／リガンドのストックが準備され、融解して室温になったことを確認する。	
3. データベースに基づき、各 250 μ L 容ポリプロピレン製オートサンプリングバイアルにラベルする	
4. 各ライブラリー／リガンドストックを、500 μ L 容のシリコン処理チューブに加える； 摂氏-80 度で一晩保存する	100 mM ライブラリー保存溶液 1 μ L または 40 μ M 個別リガンド保存溶液 1 μ L

続き

5. ライブライリー／リガンドを含まないタンパク質対照には、リガンド／ライブライリーストックの代わりに DMSO を添加する
1 μ L DMSO
 6. 予め一定分量に分けたライブライリー／リガンドストックを室温で融解する；温めたプレミックスを各ライブライリーに加え、ピペッティングおよびボルテックス撹拌により直ちに混合する
19 μ L の温めたプレミックス
 7. 室温で少なくとも 10 分間、最大 RPM で遠心分離する
 8. 水中で、標的タンパク質および対照タンパク質のストックを融解する
分析用カラムにかけて、界面活性剤を DBM に交換する
(50〜75 個のサンプルでは 3 ml (500 K ユニット) で十分)
 9. Centricon (登録商標) -30 を用いて、薄まった COX-1 を約 10 倍に濃縮して 1.3〜1.5 mg/ml とする。参照標準として BSA 1 mg/ml (シグマ社 P 0914) を用いるバイオラッド (Bio-Rad) のアッセイによりタンパク質濃度を測定する。Centricon の通過画分についてタンパク質のアッセイを行い、[COX-1] を補正する
 10. COX-1 に、1 当量のヘミン (シグマ社 3281, DMSO 中 3.3 μ M) と DDC (シグマ社 D3056) (300 μ M にする) を添加し、必要になるまでタンパク質を氷中に保存する。
 11. 清澄化した上澄みを、新しいポリプロピレン製オートサンプルバイアルに慎重に移す
6 μ L の上澄み
 12. 低温室内で、標的または対照タンパク質ストックを一定分量に分けてライブライリーの入ったバイアルに入れ、ピペッティングにより十分撹拌する
6 μ L タンパク質
- タンパク質+ライブライリー／リガンド混合物を、4 度で 30 分間インキュベートする (室温のインキュベーションではない)
- 注記: SEC クロマトグラフィーの場合: 50 mm GPC- μ ペプチドカラムは 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO 中で操作する

10

20

30

このサンプル調製 SOP により、COX-1 と、約 2500 種の薬物様小分子からなり、各分子の濃度が 1 μ M であるマスコード・コンビナトリアル・ライブラリとを組み合わせる結合アッセイが実施される。サンプルを、4 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。全体積が 12 μ L なので、サンプルは 240 pmol のタンパク質と 12 pmol の各ライブラリ成分とを含有していた。対照試験として、無関係の膜タンパク質、ジアシルグリセロールキナーゼ (カルbiochem インコーポレイティッド社 (Calbiochem, Inc.) [米国カリフォルニア州サンディエゴ所在]) も同じ緩衝液で 20 μ M に調製し、同じ 2500 種のライブラリと共にインキュベートし、同様に処理した。

40

【0088】

次いでこれらの混合物を個々に ALIS 分析に供した。適度に高い親和性の任意のリガンドが、COX 画分の収集時に COX に結合していれば、質量スペクトル分析によってその質量が同定される。マスコードであるおかげで、構築単位とコア分子との厳密な組合せを

50

識別することが可能である（米国特許第6, 147, 344号参照）。同じ化合物がジアシルグリセロールキナーゼの対照実験で生じなければ、その化合物はCOX-1に特異的なリガンドとして同定してよい。

【0089】

次いで混合物を個々に、下記のように修正を加えたALIS分析に供した。流量2 mL／分の溶出緩衝液TBS（80 mM tris、pH 8.0、150 mM NaCl、2.5 % DMSO）を用いて、4.6 mm×50 mm×5 μmのSECカラムで0℃でサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）を実施することにより、界面活性剤に可溶化された大きなタンパク質を薬物様小分子から分離した。タンパク質を含有する溶出SEC画分を、230 nmでモニタするUV-VIS検出によって特定し、サンプルループを経て低流量（100 μL／分）の逆相クロマトグラフィ（RPC）システムへ移した。RPCカラム（ヒギンス（Higgins）製C-18；1 mm×50 mm×5 μm）を60℃に維持して、複合体からのリガンドの解離を促進させる。このRPCカラムから、5 %～95 %アセトニトリル（0.1 %ギ酸対イオン）水溶液（重量／0.1 %ギ酸）で5分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量分析計に供する。適度に高い親和性の任意のリガンドが、そのCOX画分の収集時にCOXに結合していれば、質量スペクトル分析によってその質量が同定される。マスコードであるおかげで、構築単位とコア分子との厳密な組合せを識別することが可能である（米国特許第6, 147, 344号参照）。同じ化合物がジアシルグリセロールキナーゼの対照実験で生じなければ、その化合物はCOX-1に特異的なリガンドとして同定してよい。図6は、ALISを使用した非結合小分子からのタンパク質の分離を示す。

【0090】

対照実験では、この方法でスクリーニングされたCOX-1により、既知のCOX-1リガンドを大量の小分子混合物から抽出可能であることが実証された（図7）。被験ライブラリが、25 μMメクロフェナメート（meclofenamate）、25 μMインドメタシン、各1 μMの様々な被験ライブラリからなる場合、これら既知のCOX-1リガンドはALISスクリーニング法によって回収、同定される。

【0091】

この実験により、330, 000種の薬物様小分子全体をスクリーニングした後、41種の小分子がCOX-1リガンドとして同定されたが、その1例を図8に示す。これらのCOX-1リガンド分子を、小規模ライブラリに対する2つのスクリーニンにより同定したが、さらなる試験に向けてそれらの単一の分子の調製物を用意する。さらにこれらのヒット分子の多くは、既知のCOX-1リガンドであるメクロフェナメートと結合に関して競合することが観察される（図9）。

（実施例2）

質量スペクトル分析による、m2 mAChRタンパク質に結合しているリガンドの同定従来のクローニング法に従い、ムスカリン性アセチルコリン受容体のm2サブタイプ（m2R）をコードする遺伝子構築物を、バキュロウイルス発現ベクターにクローニングした（Baculovirus Expression Vector System、第6版、1999年、ファーマーゲン（Pharmingen）〔米国カリフォルニア州サンディエゴ所在〕を参照のこと）。この遺伝子構築物は、アミノ末端メチオニンのすぐ後に読み枠を合わせてメリチン・シグナル配列（配列番号12）が続き、そのすぐ後に読み枠を合わせてFLAG M1エピトープ・タグ（配列番号1）が続き、そのすぐ後に読み枠を合わせてm2ムスカリン性アセチルコリン受容体（NCBI受入番号X04708）の配列が続くポリペプチドをコードするものであった。したがって完全長ポリペプチド配列は、以下のとおりであった。

【0092】

【化1】

NH₂-

MKFLVNVALVFMVYISYIYADYKDDDDKMMNNSTNSSNSGLALTSPYKT
FEVVFIVLVAGSLSLVTIIGNILVMVSIKVNRLQTVNNYFLFSLACADL
IIGVFSMNLYTLYTVIGYWPLGPPVCDLWLALDYVVSNASVMNLLIISFD
RYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVLSFILWAPAILFWQFIVGVRT
VEDGECYIQFFSNAAVTFGTATAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKSRIKGD
KKEPVANQEPVSPSLVQGRIVKPNNNNMPGSDEALEHNKIQNGKAPRDAV
TENCVQGEKESSNDSTSVSAVASNMRDDEITQDENTVSTSLGHSKDENS
KQTCIKIVTKTQKSDSCTPANTTVELVGSSGQNGDEKQNIIVARKIVKMTK
QPAKKKPPPSREKKVTRTILAILLAFIITWAPYNMVLINTFCAPCIPNT
VWTIGYWLICYINSTINPACYALCNATFKKTFKHLLMCHYKNIGATR-
COOH (配列番号34)

10

発現されると、メリチン・シグナル配列はA1a(21)の後で切断され、FLAG M1抗体樹脂(シグマ(Sigma) [米国ミズーリ州セントルイス所在])が特異的に結合するアミノ末端FLAGエピトープが現れる。このバキュロウイルス発現ベクターは、従来の方法(Baculovirus Expression Vector System、第6版、1999、ファーマーゲン(Pharmingen) [米国カリフォルニア州サンディエゴ所在])により昆虫細胞において上記ポリペプチドを発現させる目的でバキュロウイルスを生成させるために使用した。

20

【0093】

FLAGタグm2Rを精製するために、上記ポリペプチドを発現する昆虫細胞60gを0.6LのTBS(50mM Tris-Cl, pH7.4、100mM NaCl)に懸濁し、そのサンプルを窒素キャピテーションによりホモジナイズした。ホモジネートを4℃で30分間、500×gの遠心分離にかけて、ホモジナイズされていない細胞を除去した。ペレットを廃棄し、上澄みを4℃で45分間、100,000×gの超遠心分離にかけた。超遠心分離後の上澄みを廃棄し、ペレット化した細胞膜を、0.5%(重量/容積)のジギトニンを含むTBS(TBS-D緩衝液)中に再懸濁して、タンパク質濃度を2.5mg/mLにした。この懸濁液を4℃で60分間攪拌しながらインキュベートした後、4℃で45分間、100,000×gの超遠心分離にかけて、不溶物をペレットとした。可溶性の上澄みを、抗体アフィニティ精製を行うために、TBS-D緩衝液で予め平衡化したFLAG M1抗体樹脂の5mLカラムに流速0.7mL/分でアプライした。可溶性物質をFLAG M1抗体樹脂にロードした後、カラムを50mLのTBS-D緩衝液で洗浄し、次いでFLAGタグm2Rタンパク質を100μg/mLのFLAGペプチド(シグマ(Sigma) [米国ミズーリ州セントルイス所在])を含むTBS-D緩衝液でカラムから溶出させた。精製されたFLAGタグ付きm2Rを含む溶出カラム画分を、SDS-PAGEにより同定した。

30

40

【0094】

ムスカリン性リガンドを結合することが可能な精製FLAGタグm2Rタンパク質の濃度を算定するために、ピーターソン(Peterson)の方法(ピーターソン、ジーエルら(Peterson, G. L. et al.) (1995年) J. Biol. Chem. 第270巻; 17808ページ)に従ってガラス繊維フィルタ結合アッセイを実施した。

【0095】

このm2R調製物は、FLAGペプチド100μg/mLを含むTBS-D中の6μMのm2Rからなるものであった。各m2Rポリペプチドは、多数のジギトニン分子と可逆的に会合可能であり、化学量論上m2R:ジギトニンが1:5~500で膜タンパク質一界

50

面活性剤複合体を生成する。この調製物を、以下に概説するサンプル調製プロトコルによるA L I Sサンプル調製用の、m 2 Rストックとした。

【0096】

その他の試薬ストックを調製した。保存シクロオキシゲナーゼ1 (C O X) を実施例1の方法に従って調製し、T B S中に濃度6 μ MのC O Xを得た。個々のリガンドストック (シグマ (S i g m a) [米国ミズーリ州セントルイス所在]) ピレンゼピン、キヌクリジニルベンジラート (Q N B)、およびアトロピンを、T B S中400 μ Mに調製した。4つのコンビナトリアル・ケミカル・ライブラリを、平均2500~5000種の薬物様小分子の各濃度が400 μ Mとなるように、ジメチルスルホキシド (D M S O) 中に調製した。これら4つの薬物ライブラリを、N M G-66、N G M-41、N G L-10-A-41、およびN G L-116-A-470とした。D M S Oに溶解したアトロピンを上記個々の薬物ライブラリに添加することによって400 μ Mアトロピンを含有する4つの被験ライブラリストックを調製し、N M G-66+アトロピinstock、N G M-41+アトロピinstock、N G L-10-A-41+アトロピinstock、およびN G L-116-A-470+アトロピinstockを得た。D M S Oに溶解したQ N Bを上記個々の薬物ライブラリに添加することによって400 μ M Q N Bを含有する4つの被験ライブラリストックを調製し、N M G-66+Q N Bstock、N G M-41+Q N Bstock、N G L-10-A-41+Q N Bstock、およびN G L-116-A-470+Q N Bstockが得られた。5%ジギトニン100 μ Lと水4.6 mLを合わせ、さらに400 μ Lの1 M T r i s-C l、p H 7.5を合わせ、次いで42 $^{\circ}$ Cで平衡化することによって、プレミックス緩衝液を調製した。

【0097】

タンパク質 (被験タンパク質m 2 Rまたは対照タンパク質C O X) を、リガンド (Q N B単独、アトロピン単独、ピレンゼピン単独、アトロピン+薬物ライブラリ、またはQ N B+薬物ライブラリ) と組み合わせた、あるいは対照としてタンパク質をD M S Oと組み合わせた結合反応物を調製した。各場合において、D M S OまたはD M S Oに可溶化されたリガンドが2 μ L入ったポリプロピレン・チューブにプレミックス緩衝液38 μ Lを分注し、ボルテックス攪拌によって混合し、室温で10分間、8,000 $\times$ gで遠心分離して不溶性物質を除去した。水性のD M S O単独または水性のD M S Oに溶解されたリガンドのいずれかを含有する (薬物ライブラリを含まない場合と含む場合) 清澄化した上澄み (2 μ L) を、4 $^{\circ}$ Cのポリプロピレン・チューブに移した。標的タンパク質m 2 R (8 μ L) または対照タンパク質C O X (8 μ L) を上澄みに添加し、ピペッティングにより十分混合し、4 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。

【0098】

次いでこれらの結合反応調製物をA L I S分析にかけた。結合反応調製物は、平衡結合状態が確立される方法で、4.8 μ Mの標的膜タンパク質 (m 2 R) または4.8 μ Mの対照膜タンパク質 (C O X) と、各濃度が1~10 μ Mの約2500種の多数の薬物様小分子とを混合する。次いでタンパク質に対する高親和性リガンド ($K_{i d} < 100 \mu$ M) をA L I Sにより同定する。対照タンパク質C O Xには結合しない標的タンパク質m 2 Rの小分子リガンドを、標的タンパク質に特異的なリガンドとみなす。これとは別に、多数の薬物分子を用いた実験と比較するため、m 2 RまたはC O Xと個々の (個別の) m 2 Rリガンドとを組み合わせた結合反応物も調製した。このA L I S分析は、サイズ排除クロマトグラフィ (S E C) の後に逆相クロマトグラフィ (R P C)、その後に質量スペクトル (M S) 分析を行う一連の操作によって下記のように進めた。

【0099】

これらの調製された結合反応混合物を、個別にA L I S分析にかけた。適度に高い親和性でm 2 Rに結合したリガンドを、下記のようにタンパク質含有S E C画分と共に回収した。流速2 mL/分の、50 mM T r i s-C l、p H 7.5、150 mM N a C l、2.5% D M S Oの溶出緩衝液を使用して、4 $^{\circ}$ Cで4.6 mm $\times$ 50 mm $\times$ 5 μ mのS E Cカラム上でS E Cにより、界面活性剤に可溶化された大きな分子を非結合の薬物様小分

子から分離した。タンパク質含有画分を、230 nmでモニタする紫外線電子吸収分光法で同定した。

【0100】

タンパク質含有画分を、サンプル・ループを介して低流量(100 μL/分)RPCシステムへ移した。RPCカラム(ヒギンス(Higgins)製C-18; 1 mm×50 mm×5 μm)を60℃に維持して、複合体からのリガンドの解離を促進させる。このRPCカラムから、5%~95%アセトニトリル(0.1%ギ酸対イオン)水溶液(重量/0.1%ギ酸)で5分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量分析計に供する。タンパク質-界面活性剤m2R複合体に対するその高い親和性により、タンパク質含有SEC画分と共に回収された質量分析済みのリガンドを、その精確な質量を予測することによって同定した。

10

【0101】

実験では、このようにALIS分析でスクリーニングされたm2Rにより、m2R-界面活性剤複合体に対して高い親和性を有する既知のm2Rリガンドのその高親和性に基づいて、既知のm2Rリガンドを多数の薬物様小分子の混合物から抽出可能であることが実証された。このALIS形式のスクリーニングでは、薬物ライブラリが存在しない場合にm2R-界面活性剤複合体に結合したm2Rリガンドを回収するのと全く同様に、薬物ライブラリからm2Rリガンドが回収された(図10)。

【0102】

これらの実験のデータを図10に示す。これらの実験では、各濃度が1~10 μMである約2500種の薬物様小分子を提示するコンビナトリアル薬物ライブラリ(NGM-66、NGM-340、NGL-10-A-41、NGL-116-A-470)が存在しない状態またはその存在下で、2.0 μM m2Rと10 μMピレンゼピン、QNB、またはアトロピンとを混合することによって、平衡結合反応が確立された。結合反応物をALIS分析にかけ、リガンド回収の程度を、質量分析計のシグナル強度によって定量した。x軸は、ピレンゼピン、QNB、およびアトロピンのそれぞれの質量に対する質量スペクトルのシグナル応答を相対的な単位で表す。

20

(実施例3)

HPリガンドのアフィニティに基づいた選択およびALIS同定における置換アッセイ
代表的なHPとして、m2 mAChRをピーターソンらの方法(ピーターソン、ジーエルら(Peterson, G. L. et al.) (1995年) J. Biol. Chem. 第270巻: 17808ページ)に従い精製する。標的タンパク質をTBS-AGD緩衝液中で20 μMの濃度に調整し、濃度1 μMの既知のムスカリン性リガンド、ピレンゼピン(分子量=424.3)と共にインキュベートする。対照試験として、無関係の膜タンパク質、グリコホリンも、TBS-AGD中で20 μMに調製し、濃度1 μMの化合物ピレンゼピン(分子量=424.3)と共にインキュベートする。

30

【0103】

m2 mAChR/ピレンゼピン混合物にマスコード化合物ライブラリを加え、サンプルを分析し、ライブラリ化合物によってHPタンパク質からピレンゼピンが外れて置換されたかどうか決定する。ピレンゼピンの置換は、ライブラリ化合物が、ピレンゼピン自体と同じ部位にピレンゼピンより緊密に結合することを示す。

40

【0104】

置換アッセイは、下記のように実施する。m2 mAChRと、1 μMのピレンゼピンと、1 μMの各ライブラリ化合物との混合物をALIS分析にかける。この分析では、ピレンゼピンの質量に対応するMSシグナルをモニタし、ライブラリ化合物の質量は無視する。ライブラリ化合物によって、ピレンゼピンの質量に対応するMSシグナルが定量的に低減される場合、ライブラリ化合物によって、HPタンパク質、この場合はmAChRタンパク質から、ピレンゼピンが外れて置換されたと推測される。ライブラリ化合物とのインキュベーションにより、ピレンゼピンの質量に対応するMSシグナルが変化しない場合、ライブラリ化合物はm2 mAChRリガンドを含まないと考えられる。ライブラリ化合

50

物とのインキュベーションを行った場合と行わない場合のピレンゼピンMSシグナルを比較することによって、ライブラリ化合物がピレンゼピンと置換されたかどうか、したがってmAChRタンパク質に結合したかどうか評価することが可能である。

(実施例4)

m2 mAChRマスコード・リガンドのアフィニティ選択およびALISによる同定
代表的なHPとして、m2 mAChRをピーターソンらの方法（ピーターソン、ジェ
エル（Peterson, G. L.）（1995年）J. Biol. Chem. 第270
巻：17808ページ）に従い精製する。該タンパク質をTBS-AGD緩衝液中で20
μMに調整し、各濃度が1 μMであるマスコード化合物の2500分子のライブラリと共
にインキュベートする。22℃で30分間インキュベートした後、ALIS分析までの間
サンプルを4℃に冷却する。対照試験として、無関係の膜タンパク質、グリコホリンも、
TBS-AGD中で20 μMに調製し、マスコード・ライブラリと共にインキュベートす
る。化合物がmAChRに特異的に結合するかどうかを決定するため、mAChR-化合
物の混合物をALIS分析により分析する。タンパク質のピークを回収しMSにより測定
したとき、マスコード・ライブラリのメンバの1つに相当する質量が現れれば、その化
合物は結合リガンドであると特定される可能性がある。その同じ化合物がグリコホリン対照
実験では現れない場合、その時はその化合物をmAChRに特異的なリガンドであると特
定することが可能である。マスコードであるおかげで、構築単位とコアとの厳密な組合せ
を特定することが可能である（アニスら（Annis et al.）による米国特許第
6, 147, 344号参照）。MS-MS分析（アニスら（Annis et al.）
による米国特許第6, 147, 344号参照）を使用することにより、コアに構築単位を
組み合わせたものの正確な構造を特定することも可能である。

(実施例5)

COX-1リガンドのアフィニティ選択と、オンライン蛍光検出を用いる修正ALISに
よる同定
代表的なHPとして、COX-1タンパク質をジョンソンら（Johnson et al.
）の方法に従い仔ヒツジの精囊から精製した（ジョンソン、ジェイエル（John
son J. L.）（1995年）Arch. Biochem. Biophys. 第32
4巻：26～34ページ）。COX-1サンプルを、TBS-AGE（50mM tris、
pH 8.0、150mM NaCl、800mMドデシルβ-D-マルトシド、2.
5% DMSO）中で20 μMに調整し、各化合物の濃度が1 μMである2500種のマス
コード化合物のライブラリと混合してインキュベートする。22℃で30分間インキュベ
ートした後、そのサンプルをALIS分析までの間4℃に冷却した。全体積は12 μLで
あるので、サンプルは240 pmolのタンパク質と、12 pmolの各ライブラリ成分
とを含有する。対照試験として、無関係の膜タンパク質、グリコホリンも、TBS-AG
D中で20 μMに調製し、同じ2500分子のライブラリと共にインキュベートして、同
様に処理する。

【0105】

次いでこの混合物を下記のように修正ALIS分析に個々に供する。流量2 mL／分の溶
出緩衝液TBS（50mM tris、pH 8.0、150mM NaCl、2.5% D
MSO）を用いて、4.6mm×50mm×5 μmのSECカラムで0℃でサイズ排除ク
ロマトグラフィ（SEC）を実施することにより、界面活性剤に可溶化された大きなタン
パク質を薬物様小分子から分離する。タンパク質を含有する溶出SEC画分を、240～
250 nmで励起しかつ340 nmでの発光をモニタするオンライン蛍光検出によって特
定し、サンプルループを介して低流量（100 μL／分）逆相クロマトグラフィ（RPC
）システムへ移す。RPCカラム（ヒギンス（Higgins）製C-18；1mm×5
0mm×5 μm）を60℃に維持して、複合体からのリガンドの解離を促進させる。この
RPCカラムから、5%～95%アセトニトリル（0.1%ギ酸対イオン）水溶液（重量
／0.1%ギ酸）で5分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量
分析計に供する。適度に高い親和性のリガンドが、COX-1画分の回収時にCOX-1

に結合していれば、質量スペクトル分析によってそのリガンドの質量が同定される。

【0106】

マスコードであるおかげで、構築単位とコア分子との厳密な組合せを特定することが可能である（アニスら（Annis et al.）による米国特許第6, 147, 344号参照）。同じ化合物がグリコホリン対照実験では現れない場合、その化合物はCOX-1タンパク質の特異的なリガンドとして同定し得る。

（実施例6）

COX-1リガンドのアフィニティ選択と、オンライン光散乱検出を用いる修正ALISによる同定

代表的なHPとして、COX-1タンパク質をジョンソンら（Johnson et al.）の方法に従い仔ヒツジの精囊から精製した（ジョンソン、ジェイエル（Johnson J. L.）（1995年）Arch. Biochem. Biophys. 第324巻：26～34ページ）。COX-1サンプルを、TBS-AGE（50mM tris、pH8.0、150mM NaCl、800mMドデシルβ-D-マルトシド、2.5% DMSO）中で20μMに調整し、各化合物の濃度が1μMである2500種のマスコード化合物のライブラリと混合してインキュベートする。22℃で30分間インキュベートした後、そのサンプルを、修正ALIS分析までの間4℃に冷却する。全体積は12μLであるので、サンプルは240pmolのタンパク質と、12pmolの各ライブラリ成分とを含有する。対照試験として、無関係の膜タンパク質、グリコホリンもTBS-AGD中で20μMに調製し、同じ2500分子のライブラリと共にインキュベートし、同様に処理する。

【0107】

次に、これら対照混合物および試験混合物を下記のように修正ALIS分析に個々に供する。流量2mL/分の溶出緩衝液TBS（50mM tris、pH8.0、150mM NaCl、2.5% DMSO）を用いて、4.6mm×50mm×5μmのSECカラムで0℃でサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）を実施することにより、界面活性剤に可溶化された大きなタンパク質を薬物様小分子から分離する。タンパク質を含有する溶出SEC画分を、オンライン光散乱検出によって特定し、サンプルループを介して低流量（100μL/分）逆相クロマトグラフィ（RPC）システムへ移す。RPCカラム（ヒギンス（Higgins）製C-18；1mm×50mm×5μm）を60℃に維持して、複合体からのリガンドの解離を促進させる。このRPCカラムから、5%～95%アセトニトリル（0.1%ギ酸対イオン）水溶液（重量/0.1%ギ酸）で5分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量分析計に供する。適度に高い親和性のリガンドが、COX-1画分の回収時にCOX-1に結合していれば、質量スペクトル分析によってそのリガンドの質量が同定される。

【0108】

マスコードであるおかげで、構築単位とコア分子との厳密な組合せを特定することが可能である（アニスら（Annis et al.）による米国特許第6, 147, 344号参照）。同じ化合物がグリコホリン対照実験で現れない場合、その化合物はCOX-1タンパク質の特異的なリガンドとして同定し得る。

（実施例7）

m2 mACHRに結合するリガンドの不均一溶液相のスクリーニング：アフィニティ選択およびALIS分析を用いる同定

HPリガンドを、タグ付き標的配列を固体支持体に固定化する不均一溶液相のスクリーニング法を使用することによってスクリーニングすることも可能である。例えば、免疫沈降（IP）に基づくスクリーニング・プロトコルで沈降性固定要素として使用するために、抗flag抗体を吸着させたプロテインAアガロースビーズ（抗flagビーズ）を準備する。

【0109】

概要を述べると、TBS-AG緩衝液（50mM tris、pH8.0、150mM

NaCl、800mMドデシルβ-D-マルトシド)を使用して、プロテインAアガロースの50% (容積/容積) スラリー (サンタクルーズバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology)、[米国ミズーリ州セントルイス所在]) 100μLを1.5mLエッペンドルフチューブ内で、室温で、(1) ビーズを1mLのTBS-AGと合わせる、(2) サンプルをひっくり返すことによって20分間混合する、(3) 10000×gで遠心分離し、その後慎重に上澄みを除去してペレット状のアガロースビーズをチューブの底に残す、というサイクルを3回実施して洗浄する。

【0110】

ビーズを洗浄した後、ビーズのペレット50μLを1.0mLのTBS-AG中に入れる。この混合物に、TBS-AG緩衝液に溶かした1mg/mLのβ-ガラクトシダーゼ50μLを添加し、混合物を4℃で60分間インキュベートして、タンパク質がビーズに非特異的に結合するのを阻止する。この混合物に、1.0μg/mLの抗flag抗体 (シグマ社 [米国モンタナ州セントルイス所在]) を10μL添加し、混合物を4℃で60分間インキュベートする。並行して、同様に処理した別の対照アガロース・ビーズ調製物を、抗flag抗体の代わりにTBS-AG 10μLで処理する。次いで抗フラグ抗体を吸着させたビーズと対照ビーズとを洗浄して、過剰な抗体およびタンパク質を除去し、最後にTBS-AG緩衝液0.10mLに再懸濁し、0.5mLエッペンドルフチューブに移す。

10

【0111】

m2 mACHR-flag タグ-His タグタンパク質を発現するCHO細胞を培養し、溶解し、ホモジナイズする。m2 mACHRを含有する細胞膜を、ショ糖ステップ勾配超遠心分離により精製する。このショ糖ステップ勾配超遠心分離工程により、ほとんどの非膜タンパク質および細胞破壊片が除去される。超遠心分離工程により、膜様の細胞内下部構造の特定の集団を単離することも可能である。mACHRに富む膜を、界面活性剤 (ドデシルβ-D-マルトシド、DβMまたはCYMAL-7; (アナトレース社 (AnaTrace) [米国オハイオ州モーミー (Maumee) 所在])) により可溶化し、アフィニティ精製の3工程に供する。

20

【0112】

初めに、ポリヒスチジン・タグの付加されたC末端を利用するために金属キレート・アフィニティ・クロマトグラフィ (MCAQ) を使用し、その後、第2のアフィニティ精製、すなわちFLAGタグの付加されたN末端に基づく抗体アフィニティ精製を行うことになる (コビルカ、ビーケー (Kobilk a, B. K.) (1995年) Anal. Biochem. 第231巻: 269ページ)。第3に、固体化mACHRリガンド3-(2'-アミノベンズヒドリルオキシ)-トロパン (ABT) のカラムを通したりガンド・アフィニティ精製を行い、その後、脱塩工程により活性m2 mACHRタンパク質の最終的な濃縮が行われる。

30

【0113】

サンプルを、TBS-AGD緩衝液でmACHRタンパク質が20μMになるよう調整し、各化合物の濃度が1μMである2500種のマスコード化合物のライブラリと共にインキュベートする。体積40μL中で反応を行う。22℃で30分間インキュベートした後、そのサンプルをMS分析までの間4℃に冷却する。比較試験として、β-ガラクトシダーゼをTBS-AGD中で20μMになるよう同様に調製し、マスコード・ライブラリと共にインキュベートする。

40

【0114】

m2 mACHRタンパク質-化合物の混合物を、下記の手順により、MS分析による分析用に調製する。m2 mACHRタンパク質またはβ-ガラクトシダーゼタンパク質のいずれかをを用いた試行由来の、精製タンパク質-ライブラリ混合物を、それぞれ体積20μLずつに2分割する。m2 mACHR-ライブラリ混合物の場合、一方をIP用に抗flagビーズ (抗flag/プロテインAアガロース) と合わせ、もう一方を対照アガロース・ビーズ (緩衝液/プロテインAアガロース・ビーズ) と合わせることにによって模

50

擬 I P に供する。同様に β -ガラクトシダーゼ混合物の場合、一方の $20\ \mu\text{L}$ を対照 I P 用に抗 f l a g ビーズと合わせ、他方の $20\ \mu\text{L}$ を、対照アガロース・ビーズと合わせることによって模擬 I P に供する。ひっくり返すことによって混合し、これらの I P を引き続き 4°C で 60 分間進行させる。その後、各 I P を室温で、(1) ビーズを $1\ \text{mL}$ の T B S - A G と合わせる、(2) ひっくり返すことによって 2 分間混合する、(3) $10000\ \text{g}$ で遠心分離し、その後慎重に上澄みを除去してチューブの底にペレット状のアガロース・ビーズを残す、というサイクルを 3 回実施して洗浄する。最後に、各 $50\ \mu\text{L}$ のベッド・ボリュームのビーズ調製物を、次にさらに $50\ \mu\text{L}$ の T B S ($50\ \text{mM}$ t r i s、 $\text{pH } 8.0$ 、 $150\ \text{mM}$ N a C l) に再懸濁し、 4°C に保持する。このプロセスの完了時には、4 種の不均一ビーズ調製物、すなわち (1) m2 m A C h R / 抗 f l a g / プロテイン A アガロース (m2 ビーズ) と、(2) m2 m A C h R / 緩衝液 / プロテイン A アガロース・ビーズ (m2 対照ビーズ) と、(3) β -ガラクトシダーゼ / 抗 f l a g / プロテイン A アガロース・ビーズ (β -l a c ビーズ) と、(4) β -ガラクトシダーゼ / 緩衝液 / プロテイン A アガロース・ビーズ (β -ガラクトシダーゼ対照ビーズ) が作製される。

【0115】

これらのビーズを基にした調製物は、下記の手法でスクリーニングするのに有用な不均一溶液相系を構成する。各 $100\ \mu\text{L}$ のビーズ調製物を $50\ \mu\text{L}$ の 30% アセトニトリル水溶液と混合し、 60°C に 5 分間加熱して、結合しているリガンドをタンパク質から解離させる。次いで混合物を $10,000\times\text{g}$ で遠心分離にかけてビーズをペレット化し、上澄み中の解離タンパク質を新しいチューブに移す。

【0116】

I P 手順により、リガンドのアフィニティ選択と、結合していないライブラリ分子からの m2 m A C h R-リガンド複合体の物理的分離との両方が可能になる。これらの上澄みは、 $50\ \text{mM}$ T r i s、 $\text{pH } 8.0$ 、 $150\ \text{mM}$ N a C l、 $80\ \text{mM}$ ドデシル β -D-マルトシド、および 10% アセトニトリルを含有する。これらの上澄みサンプル約 $60\ \mu\text{L}$ を個々に、低流量 ($100\ \mu\text{L}/\text{分}$) 逆相クロマトグラフィ (R P C) システムに注入する。R P C カラム (ヒギンス (H i g g i n s) 製 C-18; $1\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}\times 5\ \mu\text{m}$) を 60°C に維持する。この R P C カラムから、 $5\%\sim 95\%$ アセトニトリル (0.1% ギ酸対イオン) 水溶液 (重量/ 0.1% ギ酸) で 5 分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量分析計に供する。

【0117】

m2 m A C h R タンパク質ビーズの上澄み中にあり、m2 m A C h R タンパク質対照ビーズ、 β -l a c ライブラリのビーズ、または β -l a c 対照ビーズの上澄みにはない質量で 2500 分子のマスコード・ライブラリのある化合物に相当する質量を観測することによって、m2 m A C h R-リガンドを同定する。この手順で選択されたマスコード化合物の構造は、容易に特定される (アニスら (A n n i s e t a l.) による米国特許第 6,147,344 号参照)。M S - M S 分析 (アニスら (A n n i s e t a l.) による米国特許第 6,147,344 号参照) を使用することにより、コアと構築単位の組み合わせの正確な構造を示すことも可能である。

(実施例 9)

m2 m A C h R に結合するリガンドの不均一溶液相のスクリーニング：アフィニティ選択および M S 分析と組み合わせた置換アッセイを使用する同定

F l a g タグが付加された m2 m A C h R タンパク質を、本明細書で既に概説したように精製し、濃度 $20\ \mu\text{M}$ になるよう T B S - A G D 緩衝液に再懸濁する。タンパク質を、各化合物の濃度が $1\ \mu\text{M}$ である 2500 のマスコード化合物のライブラリと、 $1\ \mu\text{M}$ のピレンゼピン、すなわち m2 m A C h R タンパク質の既知のリガンドと共に、体積 $40\ \mu\text{L}$ 中でインキュベートする。 22°C で 30 分間インキュベートした後、M S 分析までの間サンプルを 4°C に冷却した。比較試験として、 β -ガラクトシダーゼを同様に $20\ \mu\text{M}$ になるよう T B S - A G D 中に調製し、マスコード・ライブラリおよびピレンゼピンと共に

インキュベートする。

【0118】

m2 mACHRタンパク質またはβ-ガラクトシダーゼのいずれかを用いた試行由来の精製タンパク質-ライブラリーピレンゼピン混合物を、それぞれ体積20μLずつに2分割する。m2 mACHR-ライブラリーピレンゼピン混合物の場合、一方をIP用に抗flagビーズ（抗flag/プロテインAアガロース）と合わせ、他方を対照アガロース・ビーズ（緩衝液/プロテインAアガロース・ビーズ）と合わせることで、模擬IPに供する。プロテインAアガロース・ビーズは、本明細書で既に述べたように調製する。同様にβ-ガラクトシダーゼ混合物の場合、一方の20μLを対照IP用に抗flagビーズと合わせ、他方の20μLを対照アガロース・ビーズと合わせることで、模擬IPに供する。ひっくり返すことによって混合し、これらのIPを引き続き4℃で60分間進行させる。次いで各IPを室温で、（1）ビーズを1mLのTBS-AGと合わせる、（2）ひっくり返すことによって2分間混合する、（3）10000gで遠心分離し、その後慎重に上澄みを除去してチューブの底にペレット状のアガロース・ビーズを残す、というサイクルを3回実施して洗浄する。最後に、各50μLのベッド・ボリュームのビーズ調製物を、次にさらに50μLのTBS（50mM Tris、pH8.0、150mM NaCl）に再懸濁し、4℃に保持する。このプロセスの完了時には、4種の不均一なビーズ調製物、すなわち（1）m2 mACHR/抗flag/プロテインAアガロース（m2ビーズ）と、（2）m2 mACHR/緩衝液/プロテインAアガロース・ビーズ（m2対照ビーズ）と、（3）β-ガラクトシダーゼ/抗flag/プロテインAアガロース・ビーズ（β-ガラクトシダーゼ・ビーズ）と、（4）β-ガラクトシダーゼ/緩衝液/プロテインAアガロース・ビーズ（β-ガラクトシダーゼ対照ビーズ）が作製される。

10

20

【0119】

これらのビーズを基にした調製物は、下記の手法でスクリーニングするのに有用な不均一溶液相系を構成する。各100μLのビーズ調製物を50mLの30%アセトニトリル水溶液と混合し、60℃に5分間加熱して、結合しているピレンゼピンをタンパク質から解離させる。次いで混合物を10,000×gで遠心分離にかけ、ビーズをペレット化し、上澄み中の解離タンパク質を新しいチューブに移す。IP手順により、リガンドのアフィニティ選択と、結合していないライブラリー分子からのm2 mACHR-リガンド複合体の物理的分離との両方が可能になる。これらの上澄みは、50mM Tris、pH8.0、150mM NaCl、80mMドデシルβ-D-マルトシド、10%アセトニトリル、および<50pmolのピレンゼピンを含有する。これらの上澄み約60μLを、低流量（100μL/分）逆相クロマトグラフィ（RPC）システムに注入する。RPCカラム（ヒギンス（Higgins）製 C-18；1mm×50mm×5μm）を60℃に維持する。このRPCカラムから、5%～95%アセトニトリル（0.1%ギ酸対イオン）水溶液（重量/0.1%ギ酸）で5分間の勾配を用いてリガンドを溶出し、分析のため高分解能の質量分析計に供する。

30

【0120】

m2 mACHRタンパク質対照ビーズ、β-ガラクトシダーゼ・ライブラリー試験ビーズ、またはβ-ガラクトシダーゼ対照ビーズの上澄み由来のピレンゼピンに相当する質量は、m2 mACHRタンパク質ビーズのMS分析におけるピレンゼピンの質量応答値よりも高いはずである。したがって2500分子のマスコード・ライブラリーは、ピレンゼピンよりも高い親和性でm2 mACHRタンパク質に結合するリガンドを含有することが推測される。ヒットを含むライブラリーを、ヒットを含まないその他のライブラリーの中からこのように検出し選択することが可能である。

40

（実施例10）

多重化による疎水性タンパク質スクリーニング成果の向上

両親媒性物質-可溶化HPを、スクリーニング成果を高める3次元高次構造に維持するには、HPを、スクリーニング・サンプル調製物中で多重化する。多重化は、標的タンパク

50

質といくらかの既知のモル当量の1つ以上のアクセサリタンパク質（A P）とを組み合わせ、任意の調製方法を指すよう定義される。A Pの使用に関して最も好ましいスクリーニング条件の選択が行われるように、5つの独立した基準が明らかにされている：その基準とは、（1）A Pの存在下で、A Pの非存在下よりも高い親和性で標的H Pが既知のアゴニストに結合することが観察されること；（2）A Pの存在下で、A Pの非存在下よりも高い親和性で標的H Pが既知のアнтаゴニストに結合することが観察されること；（3）A Pの存在下で、H Pが、酵素アッセイ、インビトロアッセイ、または細胞を用いるアッセイをおこなった場合により高い機能活性を有することが示されること；（4）A Pの存在下、H Pがその多量体化状態を変化させることが示されること；および（5）A Pの存在下、H Pがより高い高次構造上の安定性または不変性を有することが示されること、
10

【0121】

第1の例として、 $G_{\alpha i 1 \beta 1 \gamma 2}$ - グアノシン二リン酸（GDP）をヘテロトリマーA Pとして用いたm2 mAChRの多重化スクリーニング法を示す。 $G_{\alpha i 1 \beta 1 \gamma 2}$ - GDP複合体は、下記の方法によって示されるように、その存在によってm2 mAChRのアンタゴニストN-メチルスカルポラミン（N-methylscopolamine）（NMS）に対する親和性が5倍高まるため、m2 mAChRに対するA Pであると確認された。リンケン（Rinken）およびハガ（Haga）の方法（リンケン、エー（Rinken, A.）およびハガ、ティー（Haga, T.）（1993年）Arch. Biochem. Biophys. 第301巻：158～164ページ）により実施された³H-NMS結合アッセイから、3H-NMSに対するm2 mAChRの見掛けのKdが0.17 nMであり、一方、m2 mAChR- $G_{\alpha i 1 \beta 1 \gamma 2}$ - GDP複合体のKdが432 nMであることが示された。このH P/A P複合体をスクリーニングするため、m2 mAChR/ $G_{\alpha i 1 \beta 1 \gamma 2}$ - PLを実施例11で説明するように調製し、リガンド化合物とのインキュベーション段階で50 μ M GDPを結合緩衝液に添加し、本明細書に示すアフィニティ選択およびALISまたは修正ALISを利用する方法のいずれかに従ってリガンド結合に関してスクリーニングを行った。
20

【0122】

第2の例として、ヒトオピオイド受容体の、ヘテロダイマー化した κ および δ サブタイプの多重化スクリーニングを示す。ヒト κ オピオイド受容体は、ジョーダン（Jordan）およびデヴィ（Devi）の方法（ジョーダン、ビー エー（Jordan, B. A.）およびデヴィ、エル エー（Devi, L. A.）（1999年）Nature 第399巻：697～708ページ）によって示されるように、その存在によってヒト δ オピオイド受容体の多量体化状態がモノマーからヘテロダイマーに変化するので、ヒト δ オピオイド受容体に対するA Pであることが確認された。
30

【0123】

スクリーニング用に δ/κ オピオイド受容体ヘテロ二量体複合体を調製するには、以下の方法を使用する。ヒト κ オピオイド受容体を精製し、TBS-AG中に透析分離し、濃度50 μ Mになるようにする。ヒト δ オピオイド受容体を精製し、TBS-AG中に透析分離し、濃度50 μ Mになるようにする。これら2つの等体積の調製物を合わせて二量体化させる。
40

【0124】

次いで二量体化したオピオイド受容体複合体を、本明細書に示すアフィニティ選択およびALISまたは修正ALISを利用した方法のいずれかに従い、リガンド結合に関してスクリーニングする。

（実施例11）

定義されたGPCRプロテオリポソーム（GPCR-PL）の調製方法

界面活性剤に可溶化されたGPCRを高次構造上の安定性をもたらすため、界面活性剤ミセルによる可溶化を、以下の基準、すなわち：（1）PLの脂質組成が、PLの脂質含量の90%を構成する6種以下の個別の脂質部分を有するものと定義され、特徴付けられる
50

こと、(2) HP-PL調製物の90%が、3桁以内に収まる明確な単峰形の粒子サイズ分布を有し、平均的な粒子サイズが5~10000nmの範囲内であること、(c) PL調製物の収量>50nM HPであること；を満たすものとして定義されたプロテオリポソームによる可溶化に変更した。

【0125】

m2 mACHRタンパク質を含むHP-PLを調製するため、下記の手順を使用する。合成脂質（アバンティポーラーリピッズ（Avanti Polar Lipids）[米国アラバマ州アラバスター（Alabaster）所在]）D-リボフィトスフィンゴシン-1-ホスフェートおよびセラミド-C18:0をそれぞれクロロホルムに溶かしたものを、ガラスの試験管内で一緒にして1mLの体積（それぞれ5mM）とし、アルゴン流中で24時間、室温でクロロホルムを蒸発させる。次いで脂質残分をTBS 0.40mLで湿らせ、28℃で30分間超音波処理し、混合物を1.5mLポリプロピレンチューブに移す。この脂質混合物に、ピーターソン、ジーエルら（Peterson, G. L. et al.）が記述するように調製した50μM m2 mACHRを0.2mL添加する（ピーターソン、ジーエルら（Peterson, G. L. et al.）（1995年）J. Biol. Chem. 第270巻：17808ページ）。この結果、脂質とタンパク質との粗製混合物が得られる。

10

【0126】

次いでタンパク質-脂質粗製混合物を、5分、22℃の槽中の超音波処理を30分間隔で（6回）実施しながら8℃で3時間インキュベートする。次いでこの混合物を20℃で、製造業者のプロトコルに従って（アバンティポーラーリピッズ（Avanti Polar Lipids）[米国アラバマ州アラバスター（Alabaster）所在]）容積の小さい押し出し機で100nmポリカーボネート膜に11回通す。この結果、体積0.6mLのPL粗製物、16μM m2 mACHR、および過剰な両親媒性物質（DBMおよび脂質）が得られる。過剰な脂質および界面活性剤を除去するため、予め4℃でTBSで平衡化した10mLの脱塩体（G-50セファデックス（sephadex、登録商標）カラム）に、PL粗製物を通過させる。PL粗製物を脱塩カラムに通した後、4℃のTBSを使用してその物質をカラムから溶出する。この脱塩操作は、流速0.5mL/分で実施する。タンパク質濃度は、サンプル10μLと0.2% Triton X-100 10μLとを合わせ、その混合物をバイオラッド社（Bio-Rad）比色タンパク質アッセイ（バイオラッドインコーポレイテッド社（Bio-Rad Inc.）[米国カリフォルニア州ハーキュリーズ（Hercules）所在]）に使用することにより推定する。次いでTBSで希釈することにより濃度を10μMに調整する。

20

30

【0127】

コールター（Coulter）のN4サブミクロン・パーティクル・アナライザを使用して、製造業者のプロトコルに従いサイズ分布を明らかにする。これとは別に、サイズ分布と平均粒子サイズの評価を、流速1.0mL/分で溶出緩衝液TBSを用いた分析用SECカラム（G2000swXL、5×300mm、5μm；トソーハース（Tosoh-Haas））に、280nmでモニタするUV検出器を取り付け、12℃に冷却した状態で20μLを注入することにより分析SECによって実施する。8.23分に溶出する単一ピークによりGPCR-PLの保持時間が同定され、これを分子サイズ・マーカ溶出時間の標準曲線と比較し、GPCR-PLの見掛けの平均サイズが940,000ダルトンのタンパク質のサイズに匹敵することが示された。

40

【0128】

プロテオリポソームは、APと複合体を形成したHPを用いて調製することもできる。この手順では、界面活性剤ミセルによる可溶化を、以下の基準、すなわち：（1）PLの脂質組成が、PLの脂質含量の90%を構成する6種以下の個別の脂質部分を有するものと定義され、特徴付けられたこと、（2）HP-PL調製物の90%が、3桁以内に収まる明確な単峰形の粒子サイズ分布を有し、平均的な粒子サイズが5~10000nmの範囲内であること、（3）PL調製物の収量>50nM HPであること；（4）PL調製物

50

が、アクセサリタンパク質（AP）と呼ばれる少なくとも1つの他のタンパク質を含み、その存在により標的HPにとって好ましい高次構造が維持されること；を満たすものとして定義されたプロテオリポソームへの可溶化に変更する。

【0129】

m2 mACHRを有するHP-PLを調製するため、下記の手順を使用した。合成脂質（アバンティポーラーリピッド（Avanti Polar Lipids）[米国アラバマ州アラバスター（Alabaster）所在]）D-リボフィトスフィンゴシン-1-ホスフェートとセラミド-C18:0をそれぞれクロロホルムに溶かしたものを、ガラスの試験管内で一緒にして1mLの体積（それぞれ5mM）にし、アルゴン流中で24時間、室温でクロロホルムを蒸発させる。次いで脂質残分を0.40mLのTBSに2mM MgCl₂を加えたもの（TBSM）で湿らせ、28℃で30分間超音波処理し、混合物を1.5mLポリプロピレンチューブに移す。これとは別に、記述（参照文献）に従い精製した100μM G_{β1γ2}と100μM G_{αi1}とを等体積で合わせることに
10
よって50μM G_{αi1β1γ2}を調製し、TBSMに800mM DbMを加えたものに透析分離した（TBSM-AG）。該脂質混合物に、ピーターソン、ジーエルら（Petreson, G. L. et al.）が記述するように（ピーターソン、ジーエルら（Peterson, G. L. et al.）（1995年）J. Biol. Chem. 第270巻；17808ページ）調製した50μM m2 mACHRを0.2mLと、50μM G_{αi1β1γ2}を0.2mL添加する。この混合物に、50mM GDPを10μL添加する。その結果、脂質、HP、およびAPの粗製混合物が得られる。
20

【0130】

次いでHP/AP-脂質粗製混合物を、5分、22℃の槽中の超音波処理を30分間隔で（6回）実施しながら8℃で3時間インキュベートする。次いでこの混合物を20℃で、製造業者のプロトコルに従って（アバンティポーラーリピッド（Avanti Polar Lipids）[米国アラバマ州アラバスター（Alabaster）所在]）容積の小さい押出し機で100nmポリカーボネート膜に11回通す。この結果、体積0.8mLのPL粗製物、12μM mACHR、12μM G_{αi1β1γ2}、および過剰な両親媒性物質（DbMおよび脂質）が得られる。過剰な脂質および界面活性剤を除去するため、予め4℃でTBSにより平衡化した10.0mLの脱塩体（G-50セファデックス・カラム）に、PL粗製物を通過させる。PL粗製物を脱塩カラムに通した後、4℃のTBSを使用してその物質をカラムから溶出する。この脱塩操作は、流速0.5mL/分で実施する。タンパク質濃度は、サンプル10μLと0.2% Triton X-100
30
10μLとを合わせ、その混合物をバイオラッド社（Bio-Rad）比色タンパク質アッセイ（バイオラッドインコーポレイテッド社（Bio-Rad Inc.）[米国カリフォルニア州ハーキュリーズ（Hercules）所在]）に使用することにより推定する。次いでTBSで希釈することにより濃度を20μMに調整する。

【0131】

サイズ分布を明らかにするために、製造業者のプロトコルに従いコールター（Coulter）のN4サブミクロン・パーティクル・アナライザを使用する。これとは別に、サイズ分布と平均粒子サイズの評価を、流速1.0mL/分で溶出緩衝液TBSを用いた分析用SECカラム（G2000swXL、5×300mm、5μm；トソーハース（Toso-Haas））に、280nmでモニタするUV検出器を取り付け、12℃に冷却した状態で20μLを注入することにより分析SECによって実施する。注入後8.23分に溶出する単一ピークによりHP/AP-PLの保持時間が同定され、これを分子サイズ・マーカー溶出時間の標準曲線と比較する。その結果得られる見掛けの平均サイズは940,000ダルトンのタンパク質のサイズに匹敵することが示された。
40

【0132】

スクリーニング対照として使用される対照AP-PLは、以下の基準、すなわち：（1）PLの脂質組成が、PLの脂質含量の90%を構成する6個以下の個別の脂質部分を有するものと定義され特徴付けられること、（2）HP-PL調製物の90%が、3桁以内に
50

収まる明確な単峰形の粒子サイズ分布を有し、平均的な粒子サイズが5～10000nmの範囲内であること、(3)PL調製物が、標的HPが存在しないこと以外は類似のHP/AP-PLを正確に模倣するように設計されること、という基準を満たすよう作製される。

【0133】

m2 mACHRを有するAP-PLを調製するため、下記の手順を使用する。合成脂質(アバンティポーラーリピッド(Avantipolar lipids)[米国アラバマ州アラバスター(Alabaster)所在])D-リボースフィトスフィンゴシン-1-ホスフェートとセラミド-C18:0をそれぞれクロロホルムに溶かしたものを、ガラスの試験管内で一緒にして1mLの体積(それぞれ5mM)にし、アルゴン流中で24時間、室温でクロロホルムを蒸発させる。次いで脂質残分を0.40mLのTBSに2mM MgCl₂を加えたもの(TBSM)で湿らせ、28℃で30分間超音波処理し、混合物を1.5mLポリプロピレンチューブに移す。これとは別に、ハウ、ワイラ(Hou, Y. et al.) J. Biol. Chem. (2000年)第275巻:38961～6ページの記述に従って精製した100μM G_{β1γ2}と100μM G_{αi1}とを等体積で合わせるによって50μM G_{αi1β1γ2}を調製し、TBSMに800mM DbMを加えたものに透析分離した(TBSM-AG)。該脂質混合物に、TBS-AGを0.2mLと、50μM G_{αi1β1γ2}を0.2mL添加する。この混合物に、50mM GDPを10μL添加する。その結果、脂質およびAPの粗製混合物が得られる。タンパク質濃度は、サンプル10μLと0.2% Triton X-100 10μLとを合わせ、その混合物を、製造業者の使用説明書に従ってバイオラッド社(Bio-Rad)比色タンパク質アッセイに使用することにより推定する。次いでTBSで希釈することにより濃度を10μMに調整する。

【0134】

次いでAP-脂質粗製混合物を、5分、22℃の槽中の超音波処理を30分間隔で(6回)実施しながら8℃で3時間インキュベートする。次いでこの混合物を20℃で、製造業者のプロトコルに従って(アバンティポーラーリピッド(Avantipolar lipids)[米国アラバマ州アラバスター(Alabaster)所在])容積の小さい押し出し機で100nmポリカーボネート膜に11回通す。この結果、体積0.8mLのPL粗製物、12μM mACHR、12μM G_{αi1β1γ2}、および過剰な両親媒性物質(DbMおよび脂質)が得られる。過剰な脂質および界面活性剤を除去するため、予め4℃でTBSにより平衡化した10.0mLの脱塩体(G-50セファデックス・カラム)に、PL粗製物を通過させる。PL粗製物を脱塩カラムに通した後、4℃のTBSを使用して、その物質をカラムから溶出させる。この脱塩操作は、流速0.5mL/分で実施する。

【0135】

サイズ分布を明らかにするために、製造業者のプロトコルに従いコールター(Coulter)のN4サブミクロン・パーティクル・アナライザを使用する。これとは別に、サイズ分布と平均粒子サイズの評価を、流速1.0mL/分で溶出緩衝液TBSを用いた分析用SECカラム(G2000swXL、5×300mm、5μm; トーソーハース(Toso-Haas))に、280nmでモニタするUV検出器を取り付け、12℃に冷却した状態で20μLを注入することにより分析SECによって実施する。8.23分に溶出する単一ピークによりAP-PLの保持時間が同定され、これを分子サイズ・マーカ溶出時間の標準曲線と比較する。得られた見掛けの平均サイズは、940,000ダルトンのタンパク質のサイズに匹敵する。

【0136】

次いで本明細書で述べたプロテオリポソームを、本明細書に示すアフィニティ選択およびALISまたは修正ALISを利用する方法のいずれかに従い、リガンド結合についてスクリーニングする。

(実施例12)

HPの2重エピトープ・アフィニティ精製

本発明のタグ付きHPタンパク質をコードする核酸配列の構築は、核酸クローニングの技術分野で一般的な通常の手順を利用する当業者の技術範囲に十分含まれる。

【0137】

タグ付きHP、例えばメリチン-Flagタグ-ヒトm1 mAChR-EEタグタンパク質や、メリチン-Flagタグ-ヒトβ2アドレナリン受容体-EEタグタンパク質を、ウイルス発現系の製造業者（ファーマーゲン（Pharmingen）[米国カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在]）により提供される方法に従って、組換えバキュロウイルスから生成する。

【0138】

概要を述べると、組換えウイルスを、その組換えタンパク質発現能に基づいて選択する。発現タンパク質を、感染昆虫細胞を界面活性剤により可溶化した細胞溶解物のウェスタン・ブロット分析により確認する。Flagエピトープ、EEエピトープ、またはHPタンパク質そのもののいずれかを認識する1次抗体を使用し、ウェスタン・ブロットによりHPタンパク質が発現するかどうか、またはHPタンパク質がどの程度発現するかを明らかにする。可能であれば、発現タンパク質が機能を有することを確認するために、機能的アッセイを行う。例えばメリチン-Flagタグ-ヒトm1 mAChR-EEタグタンパク質の場合、リンケン（Rinken）およびハガ（Haga）の方法（リンケン、エー（Rinken, A.）およびハガ、ティー（Haga, T.）（1993年）Arch. Biochem. Biophys. 第301巻：158～164ページ）に従って細胞を用いた³H-N-メチルスカルアミン結合分析を行い、それによって、ウイルスに誘導されたタンパク質発現が機能を有し、細胞当たりの受容体が 0.5×10^6 個のBmaxと、 0.10 nMのKdとを示すことが確認された。次いでこのバキュロウイルスを、従来の方法（ファーマーゲン（Pharmingen）[米国カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在]）によって 2.0×10^8 pfu/mLに達する高い力価に増幅した。

【0139】

次に、タンパク質を単離するため大量の昆虫細胞培養物を得る。概要を述べると、高力価のウイルスストックが所定の構築物を生成するとすぐに、Sf21昆虫細胞をバイオリアクタ内で波動攪拌しながら（ウェーブバイオテクノロジー（Wave Biotechnology）[米国ニュージャージー州ベッドミンスター（Bedminster）所在]）細胞密度 2×10^6 /mLまで増殖させる10リットル規模の生産を10回実施した。生産する各タンパク質について、これらの細胞に感染効率（MOI）5で高力価ウイルスストックを接種し、感染後2日で細胞をハーベストした。

【0140】

次いでHPタンパク質を可溶化する。例えば、mAChRタンパク質発現細胞を $10,000 \times g$ で30分間遠心分離することによって回収する。10回のバイオリアクタによる生産の全ての細胞ペレットを一緒にし、その細胞ペレットを、 1 mM EDTA、 $10 \mu g/mL$ ペプスタチンおよび $1 \mu g/mL$ pメチルスルホニルフルオリド、ならびに 20 mM ドデシル-β-D-マルトシド（DbM）を加えた氷冷TBS緩衝液 500 mLに再懸濁する。この細胞スラリーを、A型乳棒のDounceホモジナイザで $4^\circ C$ で50回のストロークに供し、細胞を破碎して膜タンパク質を可溶化する。この懸濁液を清澄にするために、該物質を $4^\circ C$ で60分間、 $40000 \times g$ で遠心分離にかけて、不溶性物質を除去する。次いで上澄みを回収し、可溶性メリチン-Flagタグ-ヒトm1 mAChR-EEタンパク質の供給源として使用する。（注記：ミツバチのメリチン・シグナル配列は、発現および昆虫細胞原形質膜への移動の過程で細胞プロテアーゼにより切断される。それ以降は、該可溶化タンパク質をFlagタグ-ヒトm1 mAChR-EEと呼ぶ）。

【0141】

次いで各可溶化組換えHPを、抗体アフィニティ・カラムでアフィニティ精製を2回行う

ことにより精製する。抗E Eタグカラムと抗F l a gタグカラムの両方を同じように準備する。概要を述べると、製造業者のプロトコルに従って（アマシャムファルマシア（A m e r s h a m P h a r m a c i a [米国ニュージャージー州ピスカタウェイ（P i s c a t a w a y）所在]）、35mgの精製抗エピトープ抗体を結合緩衝液中に透析し、C N B r 活性化セファロース・ビーズ10mLに結合させる。次いで樹脂を1.2×15cmポリプロピレン・カラムに移し、次にエピトープ・アフィニティ・カラムを4℃でT B S - A Gを用いて平衡化する。

【0142】

次に、50mLの可溶化H Pタンパク質、例えばF l a g タグーヒトm1 m A C h R - E Eを、毎分0.2mLの流速で抗E Eアフィニティ・カラムにアプライする。次いで、カラム体積の5倍量のT B S - A Gにより同じ流速でそのカラムを洗浄した。次いで特異的に結合したH Pを、T B S - A G中体積15mLに可溶化して10mMとした過剰なE Eペプチド（NH₂-E E E E Y M P M E - C O O H；シグマゲノシス（S i g m a - G e n o s y s）[米国ミズーリ州セントルイス所在]）の大量添加によりカラムから溶出させる。次いで溶出液を、抗F l a g タグ・アフィニティ・カラムに同様にアプライし、同様に洗浄し、過剰な抗F L A Gペプチド（NH₂-D Y K D D D D K - C O O H；シグマゲノシス（S i g m a - G e n o s y s）[米国ミズーリ州セントルイス所在]）でカラムから溶出させる。次いでこの物質を、100倍容のT B S - A Gを2回交換して4℃で1晩透析する。

【0143】

次いでショ糖勾配超遠心分離を使用して、誤って折り畳まれたポリペプチドを除去する。概要を述べると、該物質を、T B S - A Gに溶かした5%～25%ショ糖の不連続なステップ勾配に供し、4℃で4時間、100000×gでベックマンS W T i . 50ロータにより遠心分離する。適正な高次構造のH P、例えばF l a g タグーヒトm1 m A C h R - E Eは、5%～25%の界面で回収される。次いでこの物質を、100倍容のT B S - A Gを2回交換して4℃で1晩の最後の透析に供する。

【0144】

H P溶液のタンパク質濃度を、比色タンパク質アッセイ（バイオラッドラボラトリーズインコーポレイテッド社（B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , I n c .）[米国カリフォルニア州ハーキュリーズ（H e r c u l e s）所在]）によって決定し、必要に応じて希釈または攪拌限外濾過セル（ミリポア（M i l l i p o r e）[米国マサチューセッツ州ベッドフォード（B e d f o r d）所在]）で濃縮することによって、50μMに調整する。界面活性剤濃度も、ヒギンス（H i g g i n s）C-18カラムを使用してR P C - U Vで決定し、この場合、リガンドの混合物50μLを、20分かけて、5%～95%アセトニトリル（0.1%ギ酸対イオン）水溶液（w/0.1%ギ酸）の勾配を使用して溶出し、分析のため高分解能質量分析計へ供する。D b MのR tは、同一の条件下で個別に対照実験を行うことにより決定する。界面活性剤の量を定量するためには、タンパク質サンプルからのD b Mピークの面積を、既知濃度のD b MサンプルのD b Mピーク高をアッセイする同一条件下の複数回のR P Cから作製された標準曲線と比較する。界面活性剤濃度が0.48mM（4×cmc）よりも低いと推定される場合、T B Sに溶かした高濃度のD b Mを少量添加することによって調整する。

（実施例13）

H Pのエピトープ・アフィニティおよび金属キレート・アフィニティ・クロマトグラフィ（M C A C）

H Pはまた、例えばヘマグルチニンS S - ラットm3 m A C h R - H S V - 8 H i sに代表されるように、エピトープ・アフィニティ・タグおよび金属キレート・アフィニティ・タグを備えて構成される。概要を述べると、製造業者（ファーマingen（P h a r m i n g e n）[米国カリフォルニア州サンディエゴ所在]）により提示される下記の方法に従って、ヘマグルチニンS S - ラットm3 m A C h R - H S V - 8 H i sをコードする単離核酸分子を組換えバキュロウイルスの産生に使用する。ウイルス産生、大量の昆虫細

10

20

30

40

50

胞培養およびタンパク質発現、エピトープ・アフィニティ・カラムの調製、可溶化HPの調製、ならびにエピトープ・アフィニティ精製は、HSVエピトープ・アフィニティ・カラムを調製する際に抗FLAG抗体の代わりに抗HSV抗体を使用し、FLAGペプチドの代わりにHSVペプチド(NH₂-QPELAPEDPED-COOH; シグマゲノシス(Sigma-Genosys))を使用してヘマグルチニンSS-ラットm3 mAChR-HSV-8Hisタンパク質をカラムから溶出すること以外、全て本明細書で既に述べたように行った。また、ヘマグルチニンSS-ラットm3 mAChR-HSV-8Hisタンパク質にはEEエピトープがないので、EEエピトープを使用するエピトープ・アフィニティ精製は使用しない。(注記:ヘマグルチニンSSシグナル配列は、一部の細胞株では発現および昆虫細胞の原形質膜への移動の過程で細胞プロテアーゼによって切断される可能性がある。それ以降は、該可溶化タンパク質をラットm3 mAChR-HSV-8Hisと呼ぶ。

【0145】

アフィニティ精製の最終ステップでは、Ni-NTA樹脂(キアゲン(Qiagen)) 10mLを1.2×15cmのポリプロピレン・カラムに充填し、そのカラムを流速0.2mL/分で4℃のTBS-AG 100mLで平衡化することにより調製したMCACカラムに、ラットm3 mAChR-HSV-8Hisを流速0.2mL/分でアプライする。ラットm3 mAChR-HSV-8Hisがカラムに結合したら、そのカラムを5mMのイミダゾールを含有するTBS-AG 100mLで洗浄する。次いでこのカラムを、同じ流速でTBS-AG中の5mM~350mMイミダゾールの50mL直線勾配で展開し、0.5mLずつ画分を回収する。活性mAChRを含有する画分は、既知の放射性リガンド結合アッセイによって評価されるとおり、190~240mMのイミダゾール濃度に相当する体積11mL中に溶出する。次いでこの物質を、100倍容のTBS-AGを3回交換して4℃で1晩透析し、過剰なイミダゾールを除去する。次いでこの物質を、ショ糖勾配超遠心分離にかけ、本明細書で既に述べたようにタンパク質および界面活性剤の濃度を測定し調整する。

(実施例14)

精製HPの特徴付け

本明細書で生産したHPの最終的な調製物の純度を確認するために、各サンプルを5~12%Novex(登録商標)(インビトロジェン(Invitrogen)[米国カリフォルニア州サンディエゴ所在])ゲル上で、製造業者の使用説明書に従いSDS-PAGE分析に供する。ゲル・レーン当たりサンプル10μgをロードし、タンパク質サンプルを銀染色法によって視覚化する(ピーターソン、ジーエルら(Peterson, G. L. et al.)(1995年)J. Biol. Chem. 第270巻:17808ページ)。これらの方法により調製したmAChRタンパク質の特異的な活性を、ピーターソン、ジーエルら(Peterson, G. L. et al.)の方法(ピーターソン、ジーエルら(Peterson, G. L. et al.)(1995年)J. Biol. Chem. 第270巻:17808ページ)に従って決定する。本明細書で述べた方法では一般に、タンパク質の特異的な活性は、mAChRタンパク質1mg当たりの特異的リガンド結合が11~16nmolの範囲内になるよう決定される。

【0146】

リガンド・アフィニティ・クロマトグラフィは、本発明のHPを特異的な活性に関して評価することが可能なもう1つの測定法である。例えば本明細書で述べた方法により精製したmAChRは、固定化mAChRリガンド3-(2'-アミノベンズヒドリルオキシ)ートロパン(ABT)のカラムに通して既知リガンドのアフィニティ・クロマトグラフィにかけることが可能である。

【0147】

均等物

当業者なら、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態の数多くの均等物を、通常の実験を行うだけで理解しまたは確かめることが可能であろう。そのような均等物は、上記の

特許請求の範囲に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】HPタンパク質GP67 SS-Myc タグーEE タグーヒトm2 mAChR
のアミノ酸配列（配列番号19）を示す図。

【図2】HPタンパク質メリチン-F1ag タグーヒトβ2アドレナリン受容体-EEの
アミノ酸配列（配列番号20）を示す図。

【図3】HPタンパク質ヘマグルチニンSS-ヒトニューロキニン3受容体-HSV-Myc
のアミノ酸配列（配列番号21）を示す図。

【図4】HPタンパク質メリチン-F1ag タグーヒトm1 mAChR-EEのアミノ
酸配列（配列番号22）を示す図。 10

【図5】HPタンパク質ヘマグルチニンSS-ラットm3 mAChR-HSV-8His
のアミノ酸配列（配列番号23）を示す図。

【図6】ALISスクリーニング・システムの性能をモニタするために開発されたコンピ
ュータ・インターフェースのスクリーンショットにより表示されるSECクロマトグラム
。SECカラムに注入した後のサンプル注入に伴う溶出時間に対して230nmでの相対
吸光度を垂直軸上にプロットする。この表示は、6種の異なる結合反応混合物の分析に関
する分離プロファイルをまとめたものである。いずれの場合も、混合物は、各25μMのイン
ドメタシンおよびメクロフェナメートと、10μMのCOX-1と、各1μMの約25
00種の個々のスクリーニング化合物とからなる。12～15秒の間で溶出するピークは 20
、分析のために質量分析計に送られるSEC画分を含有するCOX-1に該当する。17
秒後に溶出するピークは、非結合のライブラリ分子に該当する。

【図7】図1に示す試験ライブラリから抽出された2つの既知COX-1リガンド（NS
AID LM；インドメタシンおよびメクロフェナメートからなる）について測定された
回収率を示す質量スペクトル分析図。異なる日（10/15および10/18）の異なる
COX-1調製物は、競合ライブラリ（NGL-15-A-137、NGL-10-A-
41、NGL-116-A-470、NGM-51、NGM-108、NGM-177）
が存在しない状態で、または存在下で、既知のリガンドを結合する。標準曲線と比較する
ことにより、質量スペクトル分析では、各回収リガンドのピコモルレベルの測定が可能に
なる。測定は、インドメタシンとメクロフェナメートの両方について3連で実施した。 30

【図8】ALISによって同定された1例であるCOX-1リガンドの構造を示す図。N
GL-177-A-1128-A-2aと呼ばれるこの化合物は、ALISスクリー
ングによってCOX-1リガンドであると同定された化合物の1例である。

【図9】COX-1結合に関するメクロフェナメートとの競合を示す棒グラフ。選択され
たCOX-1ヒット化合物は、各約1μMで、頭にNGL-xと付いた10文字の名称で
識別されるが、これらがCOX-1への結合に関して25μMメクロフェナメートと競合
するかどうかを決定するため個々に試験を行った。メクロフェナメートまたは被験リガ
ンドのいずれかの質量に相当する質量スペクトルの応答を定量化した。COX-1結合に関
してメクロフェナメートと競合する被験リガンドでは、「リガンド+競合物質」の応答が
、「リガンド-競合物質」の応答よりも低くなる。また、メクロフェナメートの応答は、 40
上述の「リガンド+競合物質」の試行に関して「COX1+25μMメクロフェナメート
の試行」の場合より低くなる。例えば、NGL-169-A-1151-A-4で表され
る試験化合物はメクロフェナメートと競合するが、NGL-175-A-1127-A-
1で表される試験化合物は、はっきりと競合するとは言えない。

【図10】ALIS法による質量スペクトル分析のシグナル強度によって定量したM2R
1リガンド回収率の程度を示す棒グラフ。x軸は、ピレンゼピン、QNB、およびアトロ
ピンの各質量に対する質量スペクトルのシグナル応答を相対単位で表す。

【 1 】

MVRTAVLILLLVRFSEPKHLEQLRNSGAAABEEYMPMEMNNSTNSNNSLATSPYKT
 FEVVFIVLVAGSLSVTIIGNILVMVSIKYNRHLOTVNNYFLFSLACADLIIGVFSMNLYTLTYV
 IGVWPLGPVVCDLWLALDYVVSNASVMNLLIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVL
 SFILWAPAILFWQFIVGVRTVEDEGECYIQFFSNAAVTFGTAIAAFYLPVLIIMTVLYWHISRASKS
 RIKKDKKEPVANQDPVSPSLVQGRIVKPNNNMPSSDDGLEHNKIRDPVTENCVCQGEKESSNDS
 TSVSAVASNMRRDEITQDENTVSTSLGSHSDENSQTCIRICTKTPKSDSCITPNTTVEVVGSSG
 QNGDEKONI VARKI V KMTQOPAKKKPPSREKKVTRTILAILLAFIITWAPYNNVMVLINTFCAPC
 IPNTVMTIGYWLICYINSTINPACVALCNATFKKTFKLLMCHYKNIGATR (配列番号19)

【 2 】

MKFLVNVVALVFMVVYISYIYADYKDDDDKMGQPGNGSAFLAPNRSHPDHDVTQQRDEV
 WVVGMI VMSLI VLAIVFGNVLVITATAKFERLQTVTNFYFITSACADLVMLAVVPFGAAHILM
 KMWTFGNWCFEFTSIDVLCVTASIEITLCVIAVDRYFAITSPPKYQSLLTKNKARVILMVMIVS
 GLTSFLPIQMHWYRATHQEA INCYANETCCDFFTNQAYAIASSIVSFYVPLVIMVVFYSRVQEA
 KRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGRTHGLRRSSKFCLKEHKALKITLGIIMGTFTTLCWLPPFFI
 VNI VHVIOQNLIRKEVYIILNWI GYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSSLKAYNGYSS
 NGNTGEQSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPSDNIDSQGRNCSTNDSLLEEEYMPM
 E (配列番号20)

【 3 】

MKTIIALSYIFCLVFAMAILPAAETWIDGGGVGADAVNLITASLAAGAANTGAVETGWLQL
 LDQAGNLSSSPSALGLPVRSPAPSQPWANLTNQFVQPSWRIALWSLAYGVVAVAVLGNLIVIMI
 ILAHKRMRTVTNRYFLVNLAFSDASMAAFNTLVNFIYALHSEMYFGANYCRFQNFPPITAVFASIY
 SMTAIAVDRYMAIIDPLKPRLSATATKIVIGSIWILAFLLAFPOCLYSKTKVMPGRTLCFVQWPE
 GPKQHFTYHIIIVILVYCFPELLIMGITVYITIGITLWGBEIPGDTCDKYHEQLKAKRKVVKMMIIV
 VMTFAICWLPYHIYFILTAYQQLNRWKYIQQVYLASFWLAMSSTMVNPYIYCCLNKRFRAGFKR
 AFRWCFFIKVSSVDELELKTTRFHPNROSSMYTVTRMESMTVVFDPNADOTTRSSRKRATPRDP
 SFNGCSRRNSKGASATSSFISPPYTSVDEYSQPELAPEDPEDAAKHKLEQLRNSG (配列番号21)

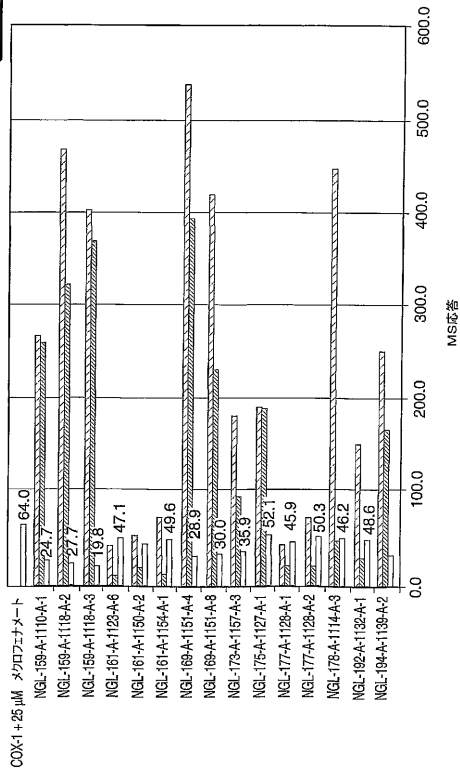
【 4 】

MKFLVNVVALVFMVVYISYIYADYKDDDDKMNTSAPPVAVSPNITVLA PGKGPWQVAFIGIT
 TGLLSLATVVTGNLLVLISPKVNTLKTNNYFLLSLACADLIIGTFSMNLYTTYLLMGHWALGTL
 ACDLWLALDYVASNASVMNLLLSFDRYFSVTRPLSYRAKRTPRRAALMIGLAWLSFVLWAPAI
 LFWQYLVGERTVLAGQCXYIQLSQPIITFTGTAMAAFYLPVTVMCTLYWRIYRETENRARELAALQ
 GSETPGKGGSSSSSERSQPGAEGSPETPGRCRCRCCRAPRLLOAYSWKEBEEDEEGSMESLTSS
 EGEEPGSEVVIKMPWVDPEAQAPTQOPPRSSPNTVKRPTKKGRDRAGKGQKPRGKEQLAKRKTFS
 LVKEKKAARTLSAILLAFILTWTPYNNIMVLVSTFCDCVPTLWELGYWLVCYVNSTINPMCYALC
 NKAFRDTFRLLLCRWDKRRWRKI PKRPGSVHRTPTPSRQCCEEEYMPME (配列番号22)

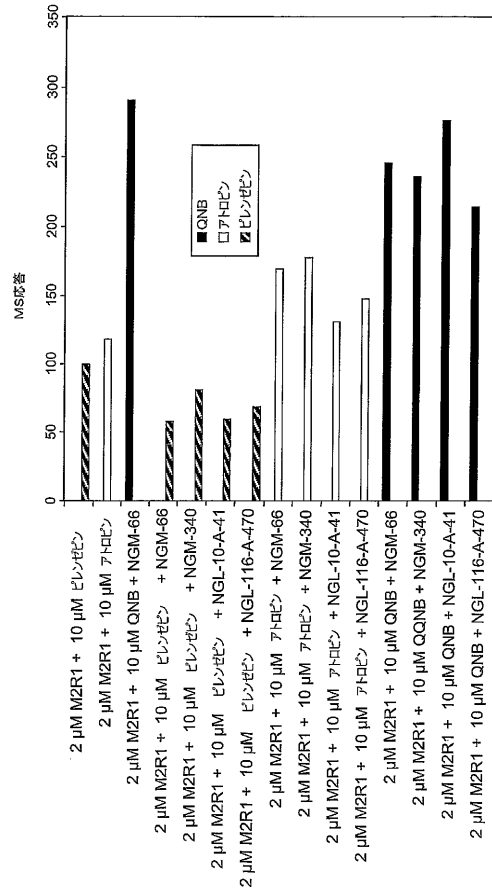
【図 9】

□ リガンド-結合物質
 ▨ リガンド+結合物質
 ▩ メタロフェナメート

COX-1リガンド結合実験11-16-00, サブライブラリー±25 μ Mメタロフェナメート



【図 10】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057792 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/68, (74) Agents: MCISAAC, Robert et al.; Hale and Dorr LLP, 60
33/53, C12N 15/00 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/50088

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date:
19 December 2001 (19.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/258,970 29 December 2000 (29.12.2000) US

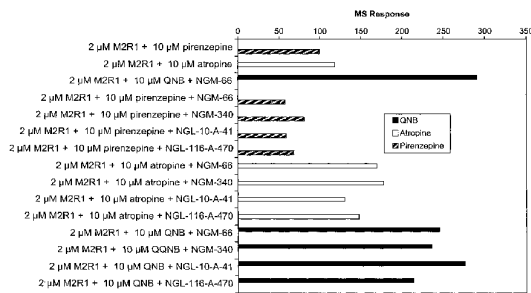
(71) Applicant: NEOGENESIS PHARMACEUTICALS, INC., [US/US], 840 Memorial Drive, Cambridge, MA 02139 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AFFINITY SELECTION-BASED SCREENING OF HYDROPHOBIC PROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to methods based on affinity selection for the identification of ligands for hydrophobic proteins bound by amphiphile. The invention also provides hydrophobic proteins and methods of isolation of hydrophobic proteins that are suitable for ligand screening.

WO 02/057792 A2

WO 02/057792

PCT/US01/50088

AFFINITY SELECTION-BASED
SCREENING OF HYDROPHOBIC PROTEINS

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The invention relates to the fields of pharmacology and medicine. More specifically, the invention relates to the screening of hydrophobic proteins for the identification of the respective ligand molecules with particular relevance to
10 the development of novel medicines and medical diagnostics.

Summary of the Related Art

Hydrophobic proteins (HPs) present a unique problem for
15 the pharmaceutical industry in the development of agonists and antagonists of hydrophobic protein function. The difficulty arises from the fact that HPs are not easily purified and are difficult to work with in isolated form (e.g., solubility difficulties, etc.). Given the nonpolar
20 nature of hydrophobic proteins, they may be found, *inter alia*, associated with the lipid bi-layer of a cell and the organelles therein. By way of nonlimiting example, the term hydrophobic protein includes membrane proteins, integral membrane proteins, transmembrane proteins, monotopic
25 membrane proteins, polytopic membrane proteins, pump proteins (a subclass of enzymes), channel proteins, receptor kinase proteins, G protein-coupled receptor proteins, membrane-associated enzymes, transporter proteins, etc. Frequently, these proteins play an important role in intra-
30 and intercellular signaling and the general relation of a cell to its environment, e.g., solute movement, etc. Thus, hydrophobic proteins are important targets for drug development.

The human genome project will provide an enormous
35 amount of information about the structure and function of

WO 02/057792

PCT/US01/50088

hydrophilic and hydrophobic proteins encoded therein. For example, it is estimated that 1,700-5,000 G protein-coupled receptor proteins (GPCRs) will be discovered in the human genome (Marchese, A., et al. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20:370; Henikoff, S., et al. (1997) *Science* 278:609). However, given the lack of suitable screening methodologies for the identification of ligands that bind hydrophobic proteins, hundreds of the GPCRs identified by the human genome project will be classified as orphan receptors, having no known ligand to advance their study. GPCRs are so important to the medical sciences that a separate database has been established to provide information on sequence data, mutant data, and ligand binding data, for example (Horn, F. et al. (1998) *Nucleic Acids Research* 26: 227-281). Thus, there is a need in the art for the development of screening methodologies, particularly high throughput methodologies, for HP ligand identification.

In the prior art, there is no record of affinity selection-based screening of HPs. Instead, these targets are screened in functional assays or ligand displacement assays. All ligand displacement assays and most functional assays used to screen HPs are either performed in cell-based formats (for example, see Jayawickreme, C.K. and Kost, T.A., (1997) *Current Opinion in Biotechnology* 8: 629-634 and Chen, G., et al. (1999) *Molecular Pharmacology* 57: 125-124, which both disclose cell-based melanophore assays; Mere, L. et al. (1999) *Drug Discovery Today* 4:363-369, which discloses a cell-based fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assay; and Schaeffer, M.T., et al. (1999) *J. Receptor & Signal Transduction Research* 19: 927-938, which discloses a cell-based aequorin assay) or use impure cell membrane preparations (for example, see Cromlish et al. US Patent No. 5,543,297, which discloses a microsome-based assay; and see Labella, F.S., et al. *Fed. Proc.* (1985) 44: 2806-2811, which discloses a radioligand displacement assay using membrane

WO 02/057792

PCT/US01/50088

preparations.). These screening formats are poorly defined at the molecular level and suffer from low signal-to-noise ratios, false positives, and variability in the degree to which the target protein is expressed and wide variability in gene expression parameters.

More rarely, HP targets are purified for screening. For example, COX-2 purified in a detergent-solubilized form can be screened by monitoring its enzymatic activity in a homogeneous solution phase assay wherein small molecule inhibitors of enzymatic activity can be identified as drug leads (see Song, Y., et al. (1999) *J. Med. Chem.* **42**: 1151-1160 and Barnett, J., et al. (1994) *Biochimica et Biophysica Acta* **1209**: 130-139 . Alternatively, the HP may be bound to a carrier for screening purposes (see Sklar, L.A. et al. (2000) *Biotechniques* **28**: 976-985; Bieri, C. et al. (1999) *Nature Biotechnology* **17**: 1105-1108; and Schmid, E.L., et al. (1998) *Anal. Chem.* **70**: 1331-1338). However, screening assays that use functional readouts presume foreknowledge of the target's function. Also, as in the case of many imaging agents used for medical diagnosis, many desired protein ligands do not modulate an assayable function and only bind to the protein.

Affinity selection to identify ligands to water-soluble proteins is known in the art. For example, International Publication No. WO 99/35109 by Nash et al. describes a method for producing mass-coded combinatorial libraries, which are useful in combination with affinity selection and the identification of the bound ligand by mass spectroscopy. International Patent Application No. WO 97/01755 by Jindal et al. describes the affinity selection of ligands bound to a target molecule combined with the subsequent isolation of the ligand molecule by multidimensional chromatographic methodology. And U.S. Patent No. 6,020,141 by Pantoliano et al. describes a method of affinity selection combined with ligand identification by thermal shift assay.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Regardless of these advances with affinity ligand selection and ligand identification, there still remains a fundamental challenge to apply affinity selection to non-water-soluble HP targets because of the hindering presence of excess amphiphile, which is required to maintain the pure HP in a biologically active conformation.

It is important to recognize the difference between a preparation of a water-soluble protein and a preparation of pure HP. The HP is solvated through hydrophobic interactions between the hydrophobic parts of the HP and the hydrophobic moiety of the amphiphile. In a preparation of pure water-soluble protein, all buffer components are hydrophilic and solvate the protein either through hydration or by participating in electrostatic or ionic bonds. By contrast the amphiphile in preparations of pure HP imparts a colloidal characteristic to the solution. Typically, HPs are purified in 100 to 10,000-fold molar excess of detergent. These amphiphilic detergent molecules interact with both the HP and the drug molecules being screened. In addition, amphiphiles form macromolecular assemblies, like micelles or liposomes, that are just as large as most proteins. These macromolecular assemblies impart a colloidal characteristic to solutions of amphiphile-solubilized HP, further distinguishing HP's from soluble proteins.

Compared to soluble protein targets, the extra complexity of HP-amphiphile preparations hampers the detection of the bound ligands, lowers screening sensitivity, and yields high rate of false positive. In a typical preparation, the molecular entities responsible for these complications could be identified as: HP-amphiphile complexes (20 μ M, HP:amphiphile::1:5-250; MW=50-500 kD), micelles (5000 μ M MW=60 kD), monomeric amphiphile (500 μ M; MW=1200). In an analogous water-soluble protein preparation, one would have only 20 μ M protein. In both

WO 02/057792

PCT/US01/50088

cases buffers (e.g. tris or Na-phosphate) and salt (e.g. NaCl or KCl) would also be present. For preparations of HP proteins, the presence of the various amphiphile entities presents extra complexity not found in soluble protein
5 preparations.

Thus, there is a continuing need in the art for an affinity selection-based HP screening method that can operate in the presence of an amphiphile without regard to the specific biological function of the HP target.

10

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides an affinity selection-based HP screening method that can operate in the presence of an amphiphile without regard to the specific biological
15 function of the HP target.

The present invention solves problems associated with affinity selection of HP ligands by enabling detection of the specific binding of a small drug-like molecules to an HP in the presence of an amphiphile. In addition, the present
20 invention also provides novel methods and compositions of matter for the production of purified HPs useful for screening purposes. These discoveries have been exploited to provide the present invention, which includes compositions and methods.

In a first aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising (a) selecting a ligand molecule by affinity selection by exposing a hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules to promote the
25 formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the ligand molecule; (b) separating the complex from the unbound molecules; and (c) identifying the ligand molecule.

In certain embodiments of the first aspect, exposure of
35 the hydrophobic target protein to a multiplicity of

WO 02/057792

PCT/US01/50088

molecules occurs under homogeneous solution phase conditions. In certain embodiments of the first aspect, exposure of the hydrophobic target protein to a multiplicity of molecules occurs under heterogeneous solution phase
5 conditions. In certain embodiments of the first aspect, selection of the ligand molecule is done using multi-dimensional chromatography.

In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein is selected from the group
10 consisting of a membrane protein, an integral membrane protein, a transmembrane protein, a monotopic membrane protein, a polytopic membrane protein, a pump protein, a channel protein, a receptor kinase protein, a G protein-coupled receptor protein, a membrane-associated enzyme, and
15 a transporter protein.

In certain embodiments of the first aspect, the multiplicity of molecules is a mass coded library of molecules. In certain embodiments of the first aspect, the multiplicity of molecules is a library of molecules that is
20 not mass coded. In certain embodiments of the first aspect, the amphiphile is selected from the group consisting of (a) a polar lipid, (b) an amphiphilic macromolecular polymer, (c) a surfactant or detergent, and (d) an amphiphilic polypeptide. In certain embodiments of the first aspect,
25 ligand molecule identification is done by mass spectral analysis. In certain embodiments of the first aspect, the ligand molecule is deconvoluted by mass spectral analysis. In certain embodiments of the first aspect, separation of the complex from the unbound molecules is accomplished with
30 solid phase chromatography media.

In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein comprises (a) at least one transmembrane domain sequence, (b) at least two tag sequences useful for affinity purification, and (c) a
35 hydrophobic protein (HP) sequence. In certain embodiments

WO 02/057792

PCT/US01/50088

thereof, the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of (a) a membrane protein, (b) an integral membrane protein, (c) a transmembrane protein, (d) a monotopic membrane protein, (e) a polytopic membrane protein, (f) a pump protein, (g) a channel protein, (h) a receptor kinase protein, (i) a G protein-coupled receptor protein, (j) a membrane-associated enzyme, and (k) a transporter protein. In certain embodiments thereof, the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d) a myc tag (NH₂-KKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), (e) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5) and (f) a rhodopsin tag (NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFAPQYYLAEPWQFSM-COOH) (SEQ ID NO:6).

In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) Tag1-Tag2-HP, (b) Tag1-HP-Tag2, and (c) HP-Tag1-Tag2. In certain embodiments of thereof, the invention provides a method wherein the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of (a) Myc tag-EE tag-Human m2 muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) (SEQ ID NO:7), (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:8), (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9), (d) Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11). In certain embodiments thereof, the invention provides a method wherein the hydrophobic target protein further comprises a heterologous signal sequence (SS) at the amino terminus. In certain embodiments thereof, the heterologous signal sequence is selected from the group consisting of (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH (SEQ ID

WO 02/057792

PCT/US01/50088

NO:12), (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEP-COOH (SEQ ID NO:13), (c) the Hemagglutinin signal sequence of NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14), (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSFPFEAPQYYLAEP-COOH (SEQ ID NO:15), and (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-GKNPLGVKRTETSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16). In certain embodiments thereof the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18). In yet certain embodiments thereof the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20), (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21), (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:23).

In a second aspect, the invention provides a method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising (a) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation, (b) purifying the hydrophobic protein by antibody affinity purification, and (c) purifying the hydrophobic protein by immobilized metal affinity chromatography.

In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein comprises (a) at least one transmembrane domain sequence, (b) at least two tag sequences useful for affinity selection, and (c) a hydrophobic protein (HP) sequence. In certain embodiments thereof, the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of (a) a membrane protein, (b) an integral membrane protein, (c) a transmembrane protein, (d) a monotopic membrane protein, (e) a polytopic membrane protein, (f) a pump protein, (g) a channel protein, (h) a receptor kinase

WO 02/057792

PCT/US01/50088

protein, (i) a G protein-coupled receptor protein, (j) a membrane-associated enzyme, and (k) a transporter protein. In certain embodiments of the second aspect, the tag sequences of the hydrophobic protein comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), (e) an HSV tag (NH₂-QPQLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5) and (f) a rhodopsin tag (NH₂-MNGTEGPNFYVFPFSNKTGVVRSFPFAPQYYLAEPPWQFSM-COOH) (SEQ ID NO:6). In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) Tag1-Tag2-HP, (b) Tag1-HP-Tag2, and (c) HP-Tag1-Tag2.

In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein is selected from the group consisting of (a) Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:7), (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:8), (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9), (d) Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11). In embodiments thereof, the hydrophobic protein further comprises a heterologous signal sequence (SS) at the amino terminus. In certain embodiments thereof, the heterologous signal sequence is selected from the group consisting of (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH (SEQ ID NO:12), (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEPP-COOH (SEQ ID NO:13), (c) the Hemagglutinin signal sequence of NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14), (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-MNGTEGPNFYVFPFSNKTGVVRSFPFAPQYYLAEPP-COOH (SEQ ID NO:15), and (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-GKNPLGVRRKTETTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16). In certain

WO 02/057792

PCT/US01/50088

embodiments of the second aspect, the tag sequences of the hydrophobic protein further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18).

5 In certain embodiments thereof, the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20), (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3
10 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21), (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:23).

In a third aspect, the invention provides an isolated
15 nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising (a) a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell, and (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements (i) an N-terminal methionine residue, (ii) a heterologous signal sequence
20 (SS), (iii) at least one transmembrane domain sequence, (iv) at least two tag sequences useful for affinity purification, and (v) a hydrophobic protein (HP) sequence. In certain embodiments thereof, the N-terminal methionine sequence and
25 the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of (a) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:24), (b) MVRTAVLILLVRFSEP (SEQ ID NO:25), (c) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26), (d) MMNGTECPNPFYVFPFSNKTGVVRSPFEAPQYVLAEP-COOH (SEQ ID NO:27), and (e) MGKNPLGVKRTETSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:28).

30 In certain embodiments thereof, the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d)

WO 02/057792

PCT/US01/50088

a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), and (e) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5).

In certain embodiments of the third aspect, the elements of the engineered hydrophobic protein are arrayed from an amino to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) SS-Tag1-Tag2-HP, (b) SS-Tag1-HP-Tag2, and (c) SS-HP-Tag1-Tag2. In certain embodiments thereof, the engineered hydrophobic protein is selected from the group consisting of (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mACHR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20), and (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21). In a further embodiment of the third aspect, the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18).

In a fourth aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising (a) selecting a hydrophobic target protein from the group consisting of (i) a membrane protein, (ii) an integral membrane protein, (iii) a transmembrane protein, (iv) a monotopic membrane protein, (v) a polytopic membrane protein, (vi) a pump protein, (vii) a channel protein, (viii) a receptor kinase protein, (ix) a G protein-coupled receptor protein, (x) a membrane-associated enzyme, and (xi) a transporter protein, wherein the hydrophobic protein is bound by amphiphile selected from the group consisting of (i) a polar lipid, (ii) an amphiphilic macromolecular polymer, (iii) a surfactant or detergent, and (iv) an amphiphilic polypeptide; (b) selecting a ligand molecule using multi-dimensional chromatography by affinity selection by exposing under homogenous or heterogeneous solution phase conditions the hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules from a mass-coded library to promote the formation of at least one

WO 02/057792

PCT/US01/50088

complex between the hydrophobic target protein and the ligand molecule, (c) separating the complex from the unbound molecules, and (d) identifying the ligand molecule by mass spectral analysis.

5 In a fifth aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising (a) selecting a hydrophobic target protein from the group consisting of (i) a membrane protein, (ii) an integral membrane protein, (iii) a transmembrane protein,
10 (iv) a monotopic membrane protein, (v) a polytopic membrane protein, (vii) a pump protein, (viii) a channel protein, (ix) a receptor kinase protein, (X) a G protein-coupled receptor protein, (Xii) a membrane-associated enzyme, and (Xiii) a transporter protein, wherein the hydrophobic
15 protein is bound by amphiphile selected from the group consisting of (i) a polar lipid, (ii) an amphiphilic macromolecular polymer, (iii) a surfactant or detergent, and (iv) an amphiphilic polypeptide; (b) selecting a ligand molecule using multi-dimensional chromatography by affinity
20 selection by exposing under homogenous or heterogeneous solution phase conditions the hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules from a library that is not mass-coded to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein
25 and the ligand molecule, (c) separating the complex from the unbound molecules, and (d) identifying the ligand molecule by mass spectral analysis.

In a sixth aspect, the invention provides a method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising: (a)
30 selecting a hydrophobic protein comprising: (i) at least one transmembrane domain sequence, (ii) at least two tag sequences useful for affinity selection selected from the group consisting of: (A) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29), (B) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID
35 NO:30), (C) a hemagglutinin tag (NH₂-YFYDVPDYA-COOH) (SEQ ID

WO 02/057792

PCT/US01/50088

NO:31), (D) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32), and (E) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33); (iii) a hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of: (A) a membrane protein, (B) an integral membrane protein, (C) a transmembrane protein, (D) a monotopic membrane protein, (E) a polytopic membrane protein, (F) a pump protein, (G) a channel protein, (H) a receptor kinase protein, (I) a G protein-coupled receptor protein, (J) a membrane-associated enzyme, and (K) a transporter protein; (b) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation; (c) purifying the hydrophobic protein by antibody affinity purification; and (d) purifying the hydrophobic protein by immobilized metal affinity chromatography.

15 In a seventh aspect, the invention provides, an isolated nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising: (a) a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell, and (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements (i) an N-terminal methionine residue, (ii) a heterologous signal sequence (SS), wherein the N-terminal methionine sequence and the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of (1) MKFLVNVALVFMVVVISYIYA (SEQ ID NO:24), (2) MVRTAVLILLVRFSEP (SEQ ID NO:25), (3) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26), (4) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEP-COOH (SEQ ID NO:27) and (5) MGKNPLGVRKTETSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:28); (iii) at least one transmembrane domain sequence, (iv) at least two tag sequences useful for affinity selection selected from the group consisting of (1) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (2) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (3) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVFDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (4) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), and (5) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5), and (v) a

WO 02/057792

PCT/US01/50088

hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of (1) a membrane protein, (2) an integral membrane protein, (3) a transmembrane protein, (4) a monotopic membrane protein, (5) a polytopic membrane protein, (6) a pump protein, (7) a channel protein, (8) a receptor kinase protein, (9) a G protein-coupled receptor protein, (10) a membrane-associated enzyme, and (11) a transporter protein.

10 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 presents the amino acid sequence of the HP protein GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19).

15 Figure 2 presents the amino acid sequence of the HP protein Mellitin-Flag Tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE (SEQ ID NO:20).

20 Figure 3 presents the amino acid sequence of the HP protein Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV-Myc (SEQ ID NO:21).

25 Figure 4 presents the amino acid sequence of the HP protein Mellitin-Flag Tag-Human m1 mAChR-EE (SEQ ID NO:22).

Figure 5 presents the amino acid sequence of the HP protein Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV-OctaHis (SEQ ID NO:23).

30 Figure 6 presents SEC chromatograms represented by a screenshot from a computer interface developed to monitor the performance of the ALIS screening system. Relative absorbance at 230 nm is plotted on the vertical axis versus elution time following sample injection after injection onto the SEC column. The view compiles separation profiles for

35

WO 02/057792

PCT/US01/50088

the analysis of six different binding reaction mixtures. In each case the mixture is composed of 25 μM each indomethacin and meclofenamate, 10 μM COX-1, and 1 μM each for approximately 2500 individual screening compounds. The peaks eluting between 12-15 seconds correspond to the COX-1 containing SEC fractions that are sent to the mass spectrometer for analysis. The peaks eluting after 17 seconds corresponds to unbound library members.

Figure 7 presents mass spectral analysis showing the estimated recovery of two known COX-1 ligands (NSAID LM, composed of indomethacin and meclofenamate) extracted from test libraries as described in Fig. 1. Different COX-1 preparations from different days (10/15 and 10/18) bind the known ligands in the absence and presence of competing libraries (NGL-15-A-137, NGL-10-A-41, NGL-116-A-470, NGM-51, NGM-108, NGM-177). By comparison to standard curves, the mass spectral analysis permits estimation of the pmol of each ligand recovered. Estimates were performed in triplicate for both indomethacin and meclofenamate.

Figure 8 presents the structure of an example COX-1 ligand identified by ALIS. This compound, termed NGL-177-A-1128-A-2a, is one example of a compound identified as a COX-1 ligand by ALIS screening.

Figure 9 presents a bar graph demonstrating competition with meclofenamate for COX-1 binding. Selected COX-1 hit compounds, each present at approximately 1 μM and identified by ten character names prefixed with NGL-x, were individually tested to determine whether they compete with 25 μM meclofenamate for binding to COX-1. The mass spectral response corresponding to the mass of either meclofenamate or the test ligand was quantified. For test ligands that are competitive with meclofenamate for COX-1 binding, the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

"ligand + competitor" response will be lower than the "ligand - competitor" response. Also, the meclofenamate response will be lower for that "ligand + competitor" trial than in the "COX1 + 25 μ M Meclofenamate trial." For
5 example, the test compound represented by NGL-169-A-1151-A-4 is competitive with meclofenamate while the test compound represented by NGL-175-A-1127-A-1 is not significantly competitive.

10 Figure 10 presents a bar graph demonstrating the extent of M2R1 ligand recovery quantified by the signal strength of the mass spectral analysis in accordance with the ALIS procedure. The x-axis is in relative units of mass spectrometric signal response for the respective masses of
15 pirenzepine, QNB, and atropine.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The invention relates to the fields of pharmacology and medicine. More specifically, the invention relates to the
20 screening of hydrophobic proteins for the identification of the respective ligand molecules with particular relevance to the development of novel medicines and medical diagnostics.

The patent and scientific literature cited herein establishes the knowledge that is available to those with
25 skill in the art. The issued U.S. patents, allowed applications, published foreign applications, and references cited herein are hereby incorporated by reference. Any conflicts between these sources and the present specification shall be resolved in favor of the latter.

30 The invention provides an affinity selection-based HP screening method that can operate in the presence of an amphiphile without regard to the specific biological function of the HP target.

Aspects of the invention utilize techniques and methods
35 common to the fields of molecular biology, cell biology and

WO 02/057792

PCT/US01/50088

immunology. Useful laboratory references for these types of methodologies are readily available to those skilled in the art. See, for example, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edition, edited by Sambrook, J., Fritsch, B. F. and Maniatis, T., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols In Molecular Biology and Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, New York; Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

10 The invention herein relates to the preparation and purification of hydrophobic proteins and to methods for the identification of ligands that bind specifically to hydrophobic proteins. As used herein, the term "hydrophobic protein" refers to any purified protein that is prepared with amphiphile. Alternatively, the term may also refer to any protein for which, when purified to greater than 1% purity or purified to greater than 10% purity or purified to greater than 25% purity or purified to greater than 50% purity, either requires or benefits from the presence of an amphiphile for functional assays, to enhance stability (shelf-life or ability to withstand freeze-thaw cycles), or to retain conformational integrity as observed by common laboratory techniques including enzymatic analysis, ligand binding assays, circular dichroism, hydrodynamic assessments of mean size, shape, or density, interaction with conformation-specific antibodies. In a preferred embodiment the hydrophobic protein of the invention is a mammalian hydrophobic protein. In a particularly preferred embodiment, the hydrophobic protein of the invention is a human hydrophobic protein.

The term "hydrophobic protein" is also meant to include proteins identified by bioinformatics-assisted means through the use of the following non-limiting examples of algorithms designed for the identification of hydrophobic proteins: (a) DAS - Prediction of transmembrane regions in prokaryotes

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- using the Dense Alignment Surface method (Stockholm University) M. Cserzo, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson: Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; Prot. Eng. vol. 10, no. 6, 673-676, 1997; (b) HMMTOP - Prediction of transmembrane helices and topology of proteins (Hungarian Academy of Sciences) G.E. Tusnady and I. Simon (1998) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction. J. Mol. Biol. 283, 489-506; (c) Hidden Markov Model Predictions ELL Sonnhammer, G. von Heijne, and A. Krogh: A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Proc. of the Sixth Intern Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB98), 175-182, 1998; (D) TMAP - Transmembrane detection based on multiple sequence alignment (Karolinska Institut; Sweden) No reference available: see URL at <http://www.mbb.ki.se/tmap/>; and (e) TopPred 2 - Topology prediction of membrane proteins (Stockholm University). "Membrane Protein Structure Prediction, Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule", Gunnar von Heijne, J. Mol. Biol. (1992) 225, 487-494 and M. Cserzo, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson: Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; Prot. Eng. vol. 10, no. 6, 673-676, 1997.
- For a comparison of these methods see "Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method", Miklos Cserzo, Erik Wallin, Istvan Simon, Gunnar von Heijne, and Arne Elofsson, to appear in Protein Engineering, vol. 10, no. 6, (1997).

WO 02/057792

PCT/US01/50088

For exemplary purposes only, non-limiting examples of hydrophobic proteins (as the term is used herein) are presented in Table 1. These proteins are listed in GenBank, as indicated by the locus designations from the National

5 Center for Biotechnology Information (NCBI).

Table 1: Non-Limiting Examples of Hydrophobic Proteins	
Common Name	NCBI Locus
Kv1.3 Shaker Family K ⁺ Channel Polytopic	LOCUS NP_002223 523 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION potassiumvoltage e-gated channel, shaker-related subfamily, member 3 [Homo sapiens]. ACCESSION NP_002223 PID g4504815 VERSION NP_002223.1 GI:4504815
m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor G Protein-Coupled Receptor Class A, Polytopic	LOCUS NP_000730 466 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION cholinergic receptor, muscarinic 2; muscarinic acetylcholine receptor M2 [Homo sapiens]. ACCESSION NP_000730 PID g4502817 VERSION NP_000730.1 GI:4502817 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_000739.1
Secretin Receptor G Protein-Coupled Receptor Class B, Polytopic	LOCUS NP_002971 440 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION secretin receptor [Homo sapiens]. ACCESSION NP_002971 PID g4506825 VERSION NP_002971.1 GI:4506825 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_002980.1

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Table 1: Non-Limiting Examples of Hydrophobic Proteins	
Common Name	NCBI Locus
Metabotropic Glutamate Receptor, Type 4 G Protein-Coupled Receptor Class C, Polytopic	LOCUS NP_000832 912 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION glutamate receptor, metabotropic 4 [Homo sapiens]. ACCESSION NP_000832 PID g4504141 VERSION NP_000832.1 GI:4504141 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_000841.1
Epidermal Growth Factor Receptor Transmembrane Receptor Kinase	LOCUS AAB19486 10 aa PRI 29-JUN-2000 DEFINITION epidermal growth factor receptor; EGFR [Homo sapiens]. ACCESSION AAB19486 PID g8815559 VERSION AAB19486.2 GI:8815559 DBSOURCE locus S51343 accession S51343.1
Cyclooxygenase-2 (COX-1) Integral Membrane Enzyme Monotopic	LOCUS PGH2 HUMAN 604 aa PRI 15-DEC-1998 DEFINITION PROSTAGLANDIN G/H SYNTHASE 2 PRECURSOR (CYCLOOXYGENASE-2) (COX-1) (PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2) (PROSTAGLANDIN H2 SYNTHASE 2) (PGH SYNTHASE 2) (PGHS-2) (PHS II). ACCESSION P35354 PID g3915797 VERSION P35354 GI:3915797 DBSOURCE swissprot: locus PGH2 HUMAN, accession P35354
Ca ⁺⁺ ATPase Integral Membrane Enzyme Polytopic	LOCUS NP_001675 1205 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 [Homo sapiens]. ACCESSION NP_001675 PID g4502289 VERSION NP_001675.1 GI:4502289 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_001684.1 EC 3.6.1.38

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Table 1: Non-Limiting Examples of Hydrophobic Proteins	
Common Name	NCBI Locus
Cytochrome c Oxidase Integral Membrane Enzyme Polytopic	13 Distinct Polypeptide Subunits See Protein Data Bank #1OCC for details. http://www.rcsb.org/pdb/cgi/execute.cgi?job=chains&pdbId=1OCC&page=&pid=4725 EC 1.9.3.1
Aquaporin, Type 3 Channel, Polytopic	LOCUS NP_004916 292 aa PRI 01-NOV-2000 DEFINITION aquaporin 3 [Homo sapiens]. ACCESSION NP_004916 PID g4826645 VERSION NP_004916.1 GI:4826645 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_004925.2
Outer Membrane Phospholipase A Integral Membrane Enzyme Polytopic β -Barrel	See Protein Data Bank #1QD5 for details. EC 3.1.1.32
Serotonin Transporter Transporter, Topology Unknown	LOCUS NP_001036 630 aa PRI 31-OCT-2000 DEFINITION solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4; Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), [Homo sapiens]. ACCESSION NP_001036 PID g4507043 VERSION NP_001036.1 GI:4507043 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_001045.1
Erythropoietin Receptor Non-Enzymatic Transmembrane Receptor	LOCUS NP_058698 507 aa ROD 01-NOV-2000 DEFINITION erythropoietin receptor [Rattus norvegicus]. ACCESSION NP_058698 PID g8393319 VERSION NP_058698.1 GI:8393319 DBSOURCE REFSEQ: accession NM_017002.1

WO 02/057792

PCT/US01/50088

As will be understood by those in the art, a method of identifying a ligand for a hydrophobic protein is synonymous with a method of screening for a ligand that binds a small molecule. Furthermore, as used herein, the term "screening" refers to a procedure used to detect the interaction between polypeptide, for example a hydrophobic protein, and a small molecule; it is useful for discriminating between ligands that bind to proteins with a $K_d < 200\mu\text{M}$ from large ensembles of ligands that either do not bind to the protein or bind only weakly with a $K_d > 200\mu\text{M}$.

The present invention utilizes mass spectrometry (MS) in the identification of hydrophobic protein ligands. The MS technique is only rarely performed to analyze samples containing hydrophobic proteins because these samples contain detergent amphiphiles. Detergents suppress analyte ion formation, a critical phenomenon for MS, and so significantly hamper MS, that reports of successful MS analysis of hydrophobic proteins are few. Nevertheless, several labs have tried to perform MS analysis of purified hydrophobic proteins by identifying methods to remove the detergent prior to MS analysis. All of these labs use matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) to present the protein sample to the detector.

However, all of the known methods for sample preparation of hydrophobic proteins use organic solvents and/or acid to extract the detergent from the polypeptide prior to MS analysis. Such treatment denatures the polypeptide, a fact that precludes the binding of ligands to the analyte hydrophobic protein. For researchers interested in using MS for the study of hydrophobic protein-ligand interactions, denaturing preparation methods are not suitable. Moreover, the preparation of a membrane protein for analysis by MALDI-MS is laborious compared to the method provided by the present invention.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

By contrast, in certain preferred embodiments the present invention uses electrospray ionization (ESI) MS which permits the fluid handling of a membrane protein sample as it passes from the SEC separation to the MS
5 detector. As such, the MS analysis proceeds in less than 30 seconds after the sample is sent to the RPC column.

The reasons why detergents must be removed from protein samples prior to mass spectrometric analysis are well known, and are provided, e.g., in the following references: (a)
10 BioTechniques (1997) 22:244-250; J.P.C. Vissers, J.-P. Chervet K. Sanborn, and J.-P. Salzmann; (b) Protein Science (1994) 3:1975-1983; R.R. Ogorzalek Loo, N. Dales and P.C. Andrews; (c) J. Mass. Spectrom. (1995) 30:1462-8. Rosinke B, Strupat, K, et al.; Methods Enzymol. (1996) 270:519-51;
15 Beavis, RC and Chait, BT; and Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6873-7; Beavis, RC and Chait, BT.; Fearnley, I.M. et al.; Biochem. Soc. Trans., (1996) 24:12-917.

In a first aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method
20 comprising (a) selecting a ligand molecule by affinity selection by exposing a hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the ligand molecule; (b) separating the
25 complex from the unbound molecules; and (c) identifying the ligand molecule.

The affinity screening methods of the invention are to be distinguished from functional selection methodologies. Functional selection methodologies involve ligand selection
30 based on criteria that identify some specific protein-ligand or protein-protein interaction as significant; such ligand selection depends on either an action assignable to the protein (e.g., chemical catalysis for enzymes) or identification of some interaction between the protein and

WO 02/057792

PCT/US01/50088

some other molecule (e.g., interaction between a protein and a known small molecule ligand in the case of non-enzymes). In summary, these screening methodologies are generally based on enzymatic or biofunctional assays or ligand displacement assays.

Various embodiments of the method of the invention may utilize an automated ligand identification system (ALIS) for the discovery of novel drug leads. ALIS selects ligands based on the affinity of the compound for its target protein and identifies the ligands by mass spectrometry (see International Patent Application WO 99/35109). The invention herein provides for the application of ALIS to amphiphile complexed HPs.

As used herein, the term "affinity selection" means a ligand selection based on the affinity of one molecule for a selected protein target; such ligand selection is independent of the functional activity of the protein of interest other than for the fact the protein binds the small molecule.

As used herein, the term "amphiphile" is used to mean any molecule generally with the properties of a detergent, phospholipid, or surfactant that enhances the water solubility of hydrophobic polypeptides; specifically any molecule known to assume an association colloid in aqueous solution; non-limiting examples of such amphiphiles would include phospholipids and other polar lipids (exemplified by phosphatidylcholines, lysophospholipids, cholesterol, lecithins, ceramides, etc); amphiphilic macromolecular polymers (exemplified by the work of Christophe Tribet and Jean-Luc Popot (Tribet, C. et al. J.L. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:15047-50); surfactants including alkyl saccharides, alkyl thioglycosides, alkyl dimethylamine oxides, bile acid derivatives like cholate and the CHAPS series, FOS-CHOLINE™ series, CYMAL™ or CYGLU™ series, glucamides, and alkyl polyoxyethylenes, etc; or polypeptides

WO 02/057792

PCT/US01/50088

known to adopt amphipathic structures (exemplified by work of C.E. Schafmeister and R.M. Stroud (Schafmeister, C.E. et al., *RM Science* (1993) 262:734-8).

As used herein, the term "multiplicity of molecules" refers to a plurality of molecules to be tested for the property of specific binding to a hydrophobic target protein. By the term "molecule" is meant, any compound in the size range of 150 to 5000 atomic mass units (amu). Such compounds may be generated by any means known in the art. Particularly favored methods of generating the multiplicity of molecules is through the use of combinatorial chemistry. A "combinatorial library" refers to a plurality of molecules or compounds which are formed by combining, in every possible way for a given compound length, a set of chemical or biochemical building blocks which may or may not be related in structure. Alternatively, the term can refer to a plurality of chemical or biochemical compounds which are formed by selectively combining a particular set of chemical building blocks. For example, twenty amino acids randomly combined into hexameric peptides will produce no less than 64 million compounds. With the "combinatorial library" approach, as many different compounds as possible are made, and then candidate compounds are selected by screening them for binding activity against the target molecule of interest, e.g., a hydrophobic protein.

There are now many methods well known in the art for the construction of combinatorial libraries. By way of non-limiting example, the following references provide methods for combinatorial library construction: U.S. Patent nos. 6,147,344; (WO 99/35109; 6,114,309; 6,025,371; 6,017,768; 5,962,337; 5,919,955; and 5,856,496, to name a few. As used herein, the term "multiplicity of molecules" may also refer to a natural plurality of molecules or compounds, obtained for example from body fluids, tissues or cells. These

WO 02/057792

PCT/US01/50088

samples may be manipulated, e.g., proteolytically digested, in vitro prior to their use in a ligand screening protocol.

In certain embodiments of the first aspect, exposure of the hydrophobic target protein to a multiplicity of molecules occurs under homogeneous solution phase conditions. In certain embodiments of the first aspect, exposure of the hydrophobic target protein to a multiplicity of molecules occurs under heterogeneous solution phase conditions. In certain embodiments of the first aspect, selection of the ligand molecule is done using multi-dimensional chromatography.

As used herein, the term "homogeneous solution phase" means a protein preparations whereby a protein is combined with (a) ligand(s) with the intent to facilitate possible protein-ligand interactions; such preparations are found as sols in the temperature range of -40 to 60°C such that neither protein nor ligand are bound to a supporting element; these preparations would either pass through a semipermeable membrane with a size cut-off of 5.0 μ M or behave as though they a sedimentation coefficient of less than 500 Svedbergs or both; examples of such preparations would include combinations of ligand(s) with proteins that are solubilized in amphiphile, proteins incorporated into proteoliposomes, proteins incorporated into cell-derived virus-like particles, etc.

As used herein, the term "heterogeneous solution phase" means a protein preparations whereby a protein is combined with (a) ligand(s) with the intent to facilitate possible protein-ligand interactions; such preparations are found as mixtures in the temperature range of -40 to 60°C such that either the protein or the ligand is bound to a supporting element; these preparations would either fail to pass through a semipermeable membrane with a size cut-off of 5.0 μ M or they would behave as though they have a sedimentation coefficient of greater than 500 Svedbergs or both; examples

WO 02/057792

PCT/US01/50088

of such preparations would include combinations of ligand(s) with proteins that are presented on the surface of a bead/stationary element whereby the protein is attached to the bead/stationary element through either a covalent or
5 non-covalent linkage or a linkage dependent upon the self-association of amphiphiles or combinations of proteins with ligands that are fixed to a stationary phase.

As used herein, the term "multi-dimensional chromatography" means a procedure for processing a sample
10 involving more than one chromatographic method in tandem. Representative types of chromatographic methods include: (1) solid phase chromatography media: any of a variety of materials including small particles (<5 μM), solid porous castings, filters, or semipermeable membranes that may
15 commonly be referred to as resins, gels, immobilized artificial membranes, stationary phase elements, or otherwise, and are used with the intent of providing stationary surfaces over which or through which solubilized analytes are passed or with which solubilized analytes
20 interact as in chromatographic or electrophoretic separations or fractionations; and (2) solution phase chromatography media: solutions or fluids suitable for use in electrophoretic separations or fractionations when used in combination with stationary phase chromatography media.

25 In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of a membrane protein, an integral membrane protein, a transmembrane protein, a monotopic membrane protein, a polytopic membrane protein, a pump protein, a
30 channel protein, a receptor kinase protein, a G protein-coupled receptor protein, a membrane-associated enzyme, and a transporter protein.

In certain embodiments of the first aspect, the multiplicity of molecules is a mass coded library of
35 molecules. In certain embodiments of the first aspect, the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

multiplicity of molecules is a library of molecules that is not mass coded.

As used herein, the term "mass-coded library" refers to a mass coded combinatorial library. The compounds of the mass-coded combinatorial library are of the general formula $X(Y)_n$, wherein X is a scaffold, each Y is a peripheral moiety and n is an integer greater than 1, typically from 2 to about 6. The term "scaffold", as used herein, refers to a molecular fragment to which two or more peripheral moieties are attached via a covalent bond. The scaffold is a molecular fragment which is common to each member of the mass-coded set of compounds. The term "peripheral moiety", as used herein, refers to a molecular fragment which is bonded to a scaffold. Each member of the set of mass-coded compounds will include a combination of n peripheral moieties bonded to the scaffold and this set of compounds forms a mass-coded combinatorial library. More details of mass-coded libraries are provided in the patent application WO9935109A1, which is incorporated herein by reference.

As used herein, the phrase "a library of molecules that is not mass-coded" means any plurality of molecules or compounds that are not produced by a mass-coded combinatorial process. Thus, the term includes any and all other methods of producing a combinatorial library. In addition, the term also includes compounds constructed by "Structure Based Drug Design" methodology, which seeks to design a drug based on the structure of the target protein, and natural libraries of compounds obtained from body fluids, tissues or cells.

In certain embodiments of the first aspect, the amphiphile is selected from the group consisting of (a) a polar lipid, (b) an amphiphilic macromolecular polymer, (c) a surfactant or detergent, and (d) an amphiphilic polypeptide. In certain embodiments of the first aspect, ligand identification is done by mass spectral analysis. In

WO 02/057792

PCT/US01/50088

certain embodiments of the first aspect, the ligand molecule is deconvoluted by mass spectral analysis. In certain embodiments of the first aspect, separation of the complex from the unbound molecules is accomplished with solid phase chromatography media.

By the term "ligand identification" as used herein is meant any process that can accurately specify the structural composition of a small molecule detected in a screen.

In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein comprises (a) at least one transmembrane domain sequence, (b) at least two tag sequences useful for affinity selection, and (c) a hydrophobic protein (HP) sequence. In certain embodiments thereof, the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of (a) a membrane protein, (b) an integral membrane protein, (c) a transmembrane protein, (d) a monotopic membrane protein, (e) a polytopic membrane protein, (f) a pump protein, (g) a channel protein, (h) a receptor kinase protein, (i) a G protein-coupled receptor protein, (j) a membrane-associated enzyme, and (k) a transporter protein. In certain embodiments thereof, the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d) a myc tag (NH₂-KKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), (e) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5) and (f) a rhodopsin tag (NH₂GTEGPNFYVPPFSNKTGVVRSPPFEAPQYVLAEPWQFSM-COOH) (SEQ ID NO:6).

In certain embodiments of the first aspect, the hydrophobic target protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) Tag1-Tag2-HP, (b) Tag1-HP-Tag2, and (c) HP-Tag1-Tag2. In certain embodiments of thereof, the invention provides a method wherein the hydrophobic target

WO 02/057792

PCT/US01/50088

protein is selected from the group consisting of (a) Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:6), (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:7), (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9), (d) 5 Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11). In certain embodiments thereof, the invention provides a method wherein the hydrophobic target protein further comprises a heterologous signal sequence (SS) at the amino terminus. In 10 certain embodiments thereof, the heterologous signal sequence is selected from the group consisting of (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH (SEQ ID NO:12), (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEP-COOH (SEQ ID NO:13), (c) the Hemagglutinin 15 signal sequence of NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14), (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-MNGTEGPNFYVFPFSNKTIGVVRSPFEAPQYLLAEP-COOH (SEQ ID NO:15), and (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-GKNFLGVKRTETTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16). In certain 20 embodiments thereof the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18). In yet certain embodiments thereof the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ 25 ID NO:19), (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20), (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21), (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag 30 (SEQ ID NO:23).

In a second aspect, the invention provides a method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising (a) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation, (b) purifying the hydrophobic protein 35 by antibody affinity purification, and (c) purifying the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

hydrophobic protein by immobilized metal affinity chromatography.

In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein comprises (a) at least one transmembrane domain sequence, (b) at least two tag sequences useful for affinity selection, and (c) a hydrophobic protein (HP) sequence. In certain embodiments thereof, the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of (a) a membrane protein, (b) an integral membrane protein, (c) a transmembrane protein, (d) a monotopic membrane protein, (e) a polytopic membrane protein, (f) a pump protein, (g) a channel protein, (h) a receptor kinase protein, (i) a G protein-coupled receptor protein, (j) a membrane-associated enzyme, and (k) a transporter protein.

In certain embodiments of the second aspect, the tag sequences of the hydrophobic protein comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVFDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), (e) an HSV tag (NH₂-QPFLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5) and (f) a rhodopsin tag (NH₂ MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFAPQYLAEPWQFSM-COOH) (SEQ ID NO:6). In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) Tag1-Tag2-HP, (b) Tag1-HP-Tag2, and (c) HP-Tag1-Tag2.

In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic protein is selected from the group consisting of (a) Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:7), (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:8), (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9), (d) Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11). In

WO 02/057792

PCT/US01/50088

embodiments thereof, the hydrophobic protein further comprises a heterologous signal sequence (SS) at the amino terminus. In certain embodiments thereof, the heterologous signal sequence is selected from the group consisting of (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-KFLVNVALVFMVVVISIYA-COOH (SEQ ID NO:12), (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEP-COOH (SEQ ID NO:13), (c) the Hemagglutinin signal sequence of NH₂-KTIIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14), (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-MNGTEGPNFYVFFSNKTVVRSPPFEAPQYYLAEF-COOH (SEQ ID NO:15), and (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-GKNPLGVKRTETTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16). In certain embodiments of the second aspect, the tag sequences of the hydrophobic protein further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18).

In certain embodiments of the second aspect, the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20), (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21), (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:23).

In a third aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising (a) a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell, and (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements (i) an N-terminal methionine residue, (ii) a heterologous signal sequence (SS), (iii) at least one transmembrane domain sequence, (iv)

WO 02/057792

PCT/US01/50088

at least two tag sequences useful for affinity purification, and (v) a hydrophobic protein (HP) sequence.

By the phrase "a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell" is meant any polynucleotide sequence comprising an origin of replication allowing replication in a eukaryotic cell, a selectable marker, e.g., antibiotic resistance marker, and a promoter sequence element to promote transcription of the structural gene, which may be viral, prokaryotic or eukaryotic in origin. The origin of the vector polynucleotide sequence may be viral, prokaryotic or eukaryotic or a combination thereof. As will be understood in the art, the vector sequence while being designed for expression in a eukaryotic cell may optionally contain a prokaryotic origin of replication. Non-limiting examples of suitable vector polynucleotide sequences include the following: baculovirus vectors such as pVL1392 (Pharmingen, San Diego, CA) and pBAC-1 (Novagen, Madison, WI) and mammalian expression vectors such as pcDNA 3.1 (Invitrogen, San Diego, CA) and pTriEx-1 (Novagen, Madison, WI).

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) by procedures known in the art. Such procedures and others are deemed to be within the scope of those skilled in the art.

In certain embodiments, the present invention relates to host cells containing the above-described constructs. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Introduction of the construct into the host cell can be effected by any means known in the art, including but not limited to transduction or transformation or transfection or electroporation.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Examples of a suitable heterologous signal sequences (SS) include the honey bee mellitin SS (NH₂-MKPLVNVALVFMVVIISYIYA-COOH) (SEQ ID NO:12) (Tessier D.C., (1991) *Gene* 98: 177), see also Invitrogen.com's pMelBac product), the baculovirus gp67 SS (NH₂-MVRTAVLILLVRFSEPCOOH) (SEQ ID NO: 13) (Kretzschmar T., et al., (1996) *J. Immunol Methods* 195: 93-101), the Influenza A virus hemagglutinin SS (NH₂-MKTIIALSYIFCLVFA-COOH) (SEQ ID NO:14) (Verhoeven, M., (1980) *Nature* 286: 771-776), the rhodopsin tag 1 SS (NH₂-MNGTEGFNFYVFPFSNKTGVVRSPPFAPQYYLAEP-COOH) (SEQ ID NO:15), or the rhodopsin tag ID4 SS (NH₂-GKNPLGVKRTETTSQVAPA-COOH) (SEQ ID NO:16). Generally, such suitable SSs will be less than 75 aa long. These signal sequences may or may not be cleaved from the protein upon expression in animal cells. For example, the rhodopsin tag 1 is not cleaved off of the protein when presented by the cell to the plasma membrane, whereas rhodopsin tag ID4 signal sequence is cleaved off.

Non-limiting examples of a suitable epitope affinity tags include FLAG (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29), "EE" (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:30), hemagglutinin (NH₂-YPYDVDPDYA-COOH) (SEQ ID NO:31), myc (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32), or herpes simplex virus tag ("HSV"; NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33).

These design elements of the hydrophobic protein are arrayed from amino to carboxy terminus in one of the following permutations: (1) SS-Tag1-Tag2-HP; (2) SS-Tag1-HP-Tag2; (3) SS-HP-Tag1-Tag2.

In certain embodiments thereof, the N-terminal methionine sequence and the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of (a) MKPLVNVALVFMVVIISYIYA (SEQ ID NO:24), (b) MVRTAVLILLVRFSEPCOOH (SEQ ID NO:25), (c) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26) (d) MMNGTEGFNFYVFPFSNKTGVVRSPPFAPQYYLAEP-COOH (SEQ ID NO:27) and (e) MGKNPLGVKRTETTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:28).

WO 02/057792

PCT/US01/50088

In certain embodiments thereof, the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (c) 5 a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVDPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (d) a myc tag (NH₂-KHKLRLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), (e) an HSV tag (NH₂-QPRLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5), and (f) a rhodopsin tag (NH₂-MNGTEGPNFYVPPSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPWQFSM-COOH) (SEQ ID NO:6).

10 In certain embodiments of the third aspect, the elements of the engineered hydrophobic protein are arrayed from an amino to carboxy terminus order selected from the group consisting of (a) SS-Tag1-Tag2-HP, (b) SS-Tag1-HP-Tag2, and (c) SS-HP-Tag1-Tag2. In embodiments thereof, the 15 engineered hydrophobic protein is selected from the group consisting of (a) GP67-Myc-EE-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin-Flag Tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE (SEQ ID NO:20), and (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV-Myc (SEQ ID NO:21). In a further 20 embodiment of the third aspect, the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18). In certain embodiments of the third aspect, the engineered hydrophobic protein is selected from the group consisting of (a) GP67-Myc-EE-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19), (b) Mellitin-Flag Tag- 25 Human m1 mAChR-EE (SEQ ID NO:20), and (c) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV-OctaHis (SEQ ID NO:21).

The HP sequence of the isolated polynucleotide may be any polynucleotide encoding a protein that is isolated with 30 amphiphile present. Alternatively, the term may also refer to any polynucleotide encoding a protein for which, when purified to greater than 1% purity or purified to greater than 10% purity or purified to greater than 25% purity or purified to greater than 50-99% purity, either requires or 35 benefits from the presence of an amphiphile for functional

WO 02/057792

PCT/US01/50088

assays, to enhance stability (shelf-life or ability to withstand freeze-thaw cycles), or to retain conformational integrity as observed by common laboratory techniques including ligand binding assays, circular dichroism, 5 hydrodynamic assessments of mean size, shape, or density, interaction with conformation-specific antibodies. In a preferred embodiment the hydrophobic protein of the invention is a mammalian hydrophobic protein. In a particularly preferred embodiment, the hydrophobic protein 10 of the invention is a human hydrophobic protein.

The HP sequence of the isolated polynucleotide may include polynucleotides encoding proteins that are identified by bioinformatics-assisted means through the use of the following non-limiting examples of algorithms 15 designed for the identification of hydrophobic proteins: (a) DAS - Prediction of transmembrane regions in prokaryotes using the Dense Alignment Surface method (Stockholm University) Cserzo, M. et al. (1997) *Prot. Eng.* **10**:673-676; (b) HMMTOP - Prediction of transmembrane helices and topology of proteins (Hungarian Academy of Sciences) G.E. Tusnády and I. Simon (1998) *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506; (c) Hidden Markov Model Predictions Sonnhammer, E.L.L. et al. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. of the Sixth Intern. 20 Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB98)*, 175-182; (d) TMAP - Transmembrane detection based on multiple sequence alignment (Karolinska Institut; Sweden) No reference available: see URL at <http://www.mbb.ki.se/tmap/>; and (e) TopPred 2 - Topology prediction of membrane proteins 25 (Stockholm University). von Heijne, G. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**:487-494 and Cserzo, M. et al. (1997) *Prot. Eng.* **10**:673-676.

Representative non-limiting examples of proteins that may be encoded by the HP polynucleotide of the invention are 30 presented herein in Table 1.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

All nucleic acid sequences and the respective amino acid sequences encoded thereby identified above by the appropriate GenBank accession numbers are herein incorporated by reference.

5 In a fourth aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising (a) selecting a hydrophobic target protein from the group consisting of (i) a membrane protein, (ii) an integral membrane protein, (iii) a transmembrane protein,
10 (iv) a monotopic membrane protein, (v) a polytopic membrane protein, (vii) a pump protein, (viii) a channel protein, (ix) a receptor kinase protein, (X) a G protein-coupled receptor protein, (Xii) a membrane-associated enzyme, and (Xiii) a transporter protein, wherein the hydrophobic
15 protein is bound by amphiphile selected from the group consisting of (i) a polar lipid, (ii) an amphiphilic macromolecular polymer, (iii) a surfactant or detergent, and (iv) an amphiphilic polypeptide; (b) selecting a ligand molecule using multi-dimensional chromatography by affinity
20 selection by exposing under homogenous or heterogeneous solution phase conditions the hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules from a mass-coded library to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the
25 ligand molecule, (c) separating the complex from the unbound molecules, and (d) identifying the ligand molecule by mass spectral analysis.

In a fifth aspect, the invention provides a method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method
30 comprising (a) selecting a hydrophobic target protein from the group consisting of (i) a membrane protein, (ii) an integral membrane protein, (iii) a transmembrane protein, (iv) a monotopic membrane protein, (v) a polytopic membrane protein, (vii) a pump protein, (viii) a channel protein,
35 (ix) a receptor kinase protein, (X) a G protein-coupled

WO 02/057792

PCT/US01/50088

receptor protein, Xii) a membrane-associated enzyme, and (Xiii) a transporter protein, wherein the hydrophobic protein is bound by amphiphile selected from the group consisting of (i) a polar lipid, (ii) an amphiphilic macromolecular polymer, (iii) a surfactant or detergent, and (iv) an amphiphilic polypeptide; (b) selecting a ligand molecule using multi-dimensional chromatography by affinity selection by exposing under homogenous or heterogeneous solution phase conditions the hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules from a library that is not mass-coded to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the ligand molecule, (c) separating the complex from the unbound molecules, and (d) identifying the ligand molecule by mass spectral analysis.

In a sixth aspect, the invention provides a method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising: (a) selecting a hydrophobic protein comprising: (i) at least one transmembrane domain sequence, (ii) at least two tag sequences useful for affinity selection selected from the group consisting of: (A) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29), (B) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:30), (C) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:31), (D) a myc tag (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32), and (E) an HSV tag (NH₂-QPQLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33); (iii) a hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of: (A) a membrane protein, (B) an integral membrane protein, (C) a transmembrane protein, (D) a monotopic membrane protein, (E) a polytopic membrane protein, (F) a pump protein, (G) a channel protein, (H) a receptor kinase protein, (I) a G protein-coupled receptor protein, (J) a membrane-associated enzyme, and (K) a transporter protein; (b) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation; (c) purifying the hydrophobic protein by antibody affinity purification; and

WO 02/057792

PCT/US01/50088

(d) purifying the hydrophobic protein by immobilized metal affinity chromatography.

In a seventh aspect, the invention provides, an isolated nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising: (a) a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell, and (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements (i) an N-terminal methionine residue, (ii) a heterologous signal sequence (SS), wherein the N-terminal methionine sequence and the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of (1) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:24), (2) MVRTAVLILLVRFSEP (SEQ ID NO:25), (3) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26), (4) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFAPQYYLAEF-COOH (SEQ ID NO:27) and (5) MGKNPLGVKRTETSQVAF-COOH (SEQ ID NO:28); (iii) at least one transmembrane domain sequence, (iv) at least two tag sequences useful for affinity selection selected from the group consisting of (1) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1), (2) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2), (3) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3), (4) a myc tag (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), and (5) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5), and (v) a hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of (1) a membrane protein, (2) an integral membrane protein, (3) a transmembrane protein, (4) a monotopic membrane protein, (5) a polytopic membrane protein, (6) a pump protein, (7) a channel protein, (8) a receptor kinase protein, (9) a G protein-coupled receptor protein, (10) a membrane-associated enzyme, and (11) a transporter protein.

The following examples are intended to further illustrate certain preferred preferred embodiments of the invention but are not meant to limit the scope of the invention in any way.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

EXAMPLES

EXAMPLE 1: AFFINITY SELECTION OF COX-1 LIGANDS AND IDENTIFICATION BY ALIS

5 Purified ovine COX-1 (>95% by SDS-PAGE) from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) was prepared for screening by exchanging the detergent. To remove the detergent in which the protein was supplied, Tween-20, ion exchange chromatography was conducted. Approximately 6 mL of 0.27
10 mg/mL COX-1 in a buffer of 80 mM Tris-8.0, 0.09% Tween-20, 270 μ M DDC, and 240 μ M dodecyl- β -D-maltoside (D β M), which would provide a theoretical yield of 1.8 mg, was applied to a Poros HQ column with a buffer of 80 mM tris, pH 8.0, 240 μ M D β M (TBS-AGD). The column was developed with a linear
15 gradient from 0 to 0.5 M NaCl over 10 minutes with a flow rate of 5 mL/minute. The eluted protein fractions were identified by monitoring absorbance at 280 nm.

After this treatment, 18 mL of protein-containing material were pooled and concentrated in an Amicon-30
20 centricon according to the manufacturer's instructions (Millipore, Inc.; Bedford, MA). This yielded a concentration of approximately 1.8 mg/mL of COX-1 which was diluted to 1.3 mg/mL (20 μ M COX-1) for screening. It is estimated that the buffer in the final protein preparation
25 consisted of 2.4 mM D β M, 80 mM tris-8.0, about 50 mM NaCl. This COX-1 solution was promptly supplemented with 20 μ M hemin, and 300 μ M diethyldithiocarbamate (DDC) in accordance with the handling procedures used by Cayman Chemical company.

30 The COX-1 protein preparation was then used for sample preparation according to the appended sample preparation standard operating procedure (SOP, Table 2).

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Continued

TABLE 2
Hydrophobic Protein Ligand Screening Procedure

Binding Mixture Components:	
Final Protein Concentration	10 μ M
Final library concentration	2.5 mM
Final discrete ligand concentration	1 μ M
Total volume (for single injection)	12 μ L
Stock Reagents:	
COX-1 Target Protein (2X, stored at -80 degrees)	1.3 mg/mL (20 μ M) in 80 mM Tris/240 μ M DDM
Blank Control Protein (6X, stored at 4 degrees)	5.5 mg/mL (~150 μ M) blank in 1X BSC
Library (42X, stored at 80 degrees)	100M in DMSO
Discrete ligands (40X, stored at -80 degrees)	40 μ M in DMSO
SBC Premix:	
SBC Buffer Stock (1M Tris 8.0)	400 μ L
Water	4.6 mL
Screening Procedure	
1. Prepare SBC premix solution stock (80 mM Tris 8.0) and pre-equilibrate to 42 degrees Celsius	
2. Check that stocks of libraries/ligands in DMSO are prepared and thawed to room temperature.	
3. Add labels from database to each 250 μ L polystyrene autosampler vial	
4. Add each library/ligand stock to a 500 μ L siliconized tube, store overnight at -80 degrees C	
1 μ L of a 100 mM library stock or 1 μ L of a 40 μ M discrete ligand stock	

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Continued

5. For protein controls w/o library/ligand, add DMSO instead of ligand/library stock 1 μ L DMSO
6. Thaw pre-aliquoted library/ligand stocks at room temp.; add warm premix to each library and mix immediately by pipetting and vortexing 19 μ L warm premix
7. Centrifuge at maximum RPM at room temp. for at least 10 minutes
8. Thaw target and control protein stocks on ice. Give to Analytical to exchange detergent to DM (3 μ L (500 Units) is enough for 50-75 samples)
9. Concentrate, dilute CCK-1 (50x to 1:3-1.5 mg/mL with Centricon-30's). Determine protein conc. with BioRad assay using BSA 1 mg/mL (Sigma P 0914) as reference standard. Assay centrificon flowthrough for protein and correct [CCK-1]
10. To CCK-1, add 1 equivalent hemin (Sigma 3931, 3.3 μ M in DMSO) and DM (Sigma P0914) to 300 μ M. Keep protein on ice until needed.
11. Carefully transfer clarified supernatants to new polypropylene autosampler vials 6 μ L supernatant
12. In cold room, aliquot target or control protein stock to vials containing libraries and mix well by pipetting 6 μ L protein

Incubate protein + library/ligand mixtures for 30 minutes at 4 degrees (no RT incubation)

Notes: For SEC chromatography: 50 mm GPC-Pepide columns run in 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO

WO 02/057792

PCT/US01/50088

This sample prep SOP yields binding assays that combine COX-1 with mass-encoded combinatorial libraries made of approximately 2500 small drug-like molecules, each member at a concentration of 1 μ M. The sample was incubated 30- minutes at 4°C. As the total volume was 12 μ L, the sample thus contained 240 pmol protein and 12 pmol of each library component. As a control test, an unrelated membrane protein, diacyl glycerol kinase (Calbiochem, Inc.; San Diego, CA), was also prepared in the same buffer at 20 μ M and incubated with the same 2500-member library and treated similarly.

Then the mixtures were individually subjected to ALIS Analysis. If any ligand of suitably high affinity was bound to the COX at the time its fraction was collected, the mass spectral analysis would identify its mass. By virtue of the mass-coding, the precise combination of building blocks and core molecule can be identified (see U.S. Patent No. 6,147,344). If the same compound failed to appear in the diacyl glycerol kinase control experiment, the compound may then be identified as a specific ligand of the COX-1.

The mixtures were then individually subjected to modified ALIS analysis as follows. The large detergent-solubilized protein was separated from the small drug-like molecules by size exclusion chromatography (SEC) over a 4.6mm x 50 mm x 5 μ m SEC column at 0°C using a running buffer of TBS (80 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO) at a flowrate of 2 mL/minute. The eluting SEC fraction-containing protein was identified by UV-VIS detection monitoring at 230 nm and transferred by way of a sample loop to a low-flow (100 μ L/minute) reverse-phase chromatography (RPC) system. The RPC column (Higgins C-18; 1 mm x 50 mm x 5 μ m) is maintained at 60°C to promote dissociation of ligands from the complex. From this RPC column, the ligand

WO 02/057792

PCT/US01/50088

is eluted into a high-resolution mass spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 5 minute. If any ligand of suitably high affinity was bound to the COX at the time its fraction was collected, the mass spectral analysis will identify its mass. By virtue of the mass encoding the precise combination of building blocks and core can be identified (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.). If the same compound failed to appear in the diacyl glycerol kinase control experiment, the compound would be identified as a specific ligand of the COX-1. Figure 6 illustrates the separation of protein from unbound small molecules using ALIS.

Control experiments demonstrated that COX-1 screened in this manner enabled known COX-1 ligands to be extracted from large mixtures of small molecules (Figure 7). When a test library composed of 25 μ M meclofenamate, 25 μ M indomethacin, 1 μ M each of various test libraries, these known COX-1 ligands are recovered and identified by the ALIS screening method.

This experiment demonstrated that after screening over 330,000 small drug-like molecules, 41 small molecules were identified as COX-1 ligands, one example of which is shown in Figure 8. These COX-1 ligand molecules were identified in two screens against small libraries, and their single molecule formulations are in preparation for further testing. Furthermore, many of these hits are observed to compete with known COX-1 ligand, meclofenamate, for binding (Figure 9).

EXAMPLE 2: IDENTIFICATION OF LIGAND BINDING TO m2 mAChR PROTEIN BY MASS SPECTROSCOPY

A gene construct encoding the m2 subtype of the muscarinic acetylcholine receptor (m2R) was cloned into a baculovirus expression vector according to conventional

WO 02/057792

PCT/US01/50088

cloning methods (see e.g., Baculovirus Expression Vector System, 6th Edition, 1999, Pharmingen, San Diego, CA). The gene construct encoded a polypeptide with an amino terminal methionine followed immediately in frame by the melittin signal sequence (SEQ ID NO:12) followed immediately in frame by the FLAG M1 epitope tag (SEQ ID NO:1) followed immediately in frame by the sequence for the m2 muscarinic acetylcholine receptor (NCBI Accession No. X04708). The full-length polypeptide sequence therefore was:

10

NH2-
 MKFLVNVALVFMVVIISYIYADYKDDDDKMMNNSTNSSNGLALTSPYKT
 FEVVFIVLVAGSLSLVTIIGNILVMVSIKVNRLQTVNNYFLFSLACADL
 IIGVFPMNLTYTLTVIGYWPLGPPVCDLWLALDYVVSNAVMNLLIISFD
 RYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVLSFILWAPAILFWQFIVGVRT
 VEDGECYIQFFSNAAVTFGTAAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKSRIKGD
 KKEPVANQEPVPSLVQGRIVKPNMNMMPGSDALEHNKIQNGKAPRDAV
 TENCVQGEKESSNDSTSVSAVASNMRDDEITQDENTVSTSLGHSKDENS
 KQTCIKIVTKTQKSDSCTPANTTVELVGSSGQNGDEKQIVARKIVKMTK
 QPAKKKPPPSREKKVTRITLAILLAFIITWAPYNVMVLINTFCAPCIPNT
 VWTIGYWLCYINSTINPACYALCNATFKKTFKHLMLCHYKNICATR-
 COOH (SEQ ID NO:34)

15

20

Upon expression, the melittin signal sequence is cleaved after Ala(21) revealing an amino terminal FLAG epitope which is bound specifically by the FLAG M1 antibody resin (Sigma; St. Louis, MO). This baculovirus expression vector was used to generate baculovirus that directed the expression of the above polypeptide in insect cells according to the conventional methods (Baculovirus Expression Vector System, 6th Edition, 1999, Pharmingen, San Diego, CA).

30

To purify FLAG-tagged m2R, 60 g of insect cells expressing the above polypeptide were suspended in 0.6 L of TBS [50 mM Tris-CL, pH 7.4, 100 mM NaCl], and the sample was homogenized by nitrogen cavitation. The homogenate was subjected to centrifugation at 500 x g for 30 minutes at 4°C to removed non-homogenized cells. The pellet was discarded and the supernatant was subjected to ultracentrifugation at

WO 02/057792

PCT/US01/50088

100,000 x g for 45 minutes at 4° C. The ultracentrifugation supernatant was discarded and the pelleted cell membranes were resuspended in TBS containing 0.5% (w/v) digitonin (TBS-D buffer) to a protein concentration of 2.5 mg/mL. This suspension was incubated, stirring for 60 minutes at 4° C before ultracentrifugation at 100,000 x g for 45

5 minutes at 4° C to pellet insoluble material. The soluble supernatant was applied to a 5 mL column of the FLAG M1 antibody resin pre-equilibrated with TBS-D buffer at a flow rate of 0.7 mL/min for antibody affinity purification. After loading the soluble material onto the FLAG M1 antibody resin, the column was washed with 50 mL of TBS-D buffer and then the FLAG-tagged m2R protein was eluted from the column with TBS-D buffer
10 containing 100 µg/mL of FLAG peptide (Sigma; St. Louis, MO). Eluted column fractions containing purified FLAG-tagged m2R were identified by SDS-PAGE.

To assess the concentration of purified FLAG-tagged m2R protein that was capable of binding muscarinic ligands, glass fiber filter-binding assays were performed according to the method of Peterson (Peterson, G.L., et al (1995) J. Biol. Chem.
15 270:17808).

This m2R preparation consisted of 6 µM m2R in TBS-D with 100 µg/mL of FLAG peptide. Each m2R polypeptide is reversibly associated with a multiplicity of digitonin molecules, creating a membrane protein-detergent complex with a stoichiometry of m2R:digitonin of 1:5-500. This preparation was designated as Stock
20 m2R for use in ALIS sample preparation according to the sample preparation protocol outlined below.

Other stock reagents were prepared. Stock cyclooxygenase 1 (COX) was prepared according to the method in Example 1 to yield a concentration of 6 µM COX in TBS. Stock discrete ligands (Sigma; St. Louis, MO) pirenzepine, quinuclidinyl benzylate (QNB), and atropine were prepared to 400 µM in TBS. Four combinatorial chemical
25 libraries were prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO) constituting on average 2500-5000 small drug-like molecules each at a concentration of 400 µM. These four drug libraries were designated NMG-66, NGM-41, NGL-10-A-41, and NGL-116-A-470. Four stock test libraries were prepared containing 400 µM atropine by adding atropine
30 dissolved in DMSO to the individual drug libraries mentioned above to yield Stock

WO 02/057792

PCT/US01/50088

NMG-66 Plus Atropine, Stock NGM-41 Plus Atropine, Stock NGL-10-A-41 Plus Atropine, and Stock NGL-116-A-470 Plus Atropine. Four stock test libraries were prepared containing 400 μ M QNB by adding QNB dissolved in DMSO to the individual drug libraries mentioned above to yield Stock NMG-66 Plus QNB, Stock NGM-41 Plus QNB, Stock NGL-10-A-41 Plus QNB, and Stock NGL-116-A-470 Plus QNB. Premix Buffer was prepared by combining 100 μ L of 5% digitonin, with 4.6 mL water, and 400 μ L 1 M Tris-Cl, pH 7.5, then equilibrated at 42°C.

Binding reactions were prepared that combined protein (either m2R test protein or COX control protein) with ligand (either QNB alone, atropine alone, pirenzepine alone, atropine plus drug library, or QNB plus drug library) or protein with DMSO as a control. In each case, 38 μ L of Premix Buffer was dispensed into polypropylene tubes containing 2 μ L of DMSO or DMSO-solubilized ligands, mixed by vortexing, and centrifuged at 8,000 x g for 10 minutes at room temperature to remove insoluble material. The clarified supernatants (2 μ L) containing either aqueous DMSO alone or aqueous DMSO-solubilized ligands (with or without drug libraries) were transferred to polypropylene tubes at 4°C. Target protein (8 μ L) m2R or control (8 μ L) protein COX was added to the supernatants, mixed well by pipetting, and incubated at 4°C for 60 minutes.

These binding reaction preparations were then subjected to ALIS analysis. The binding reaction preparations combine 4.8 μ M target membrane protein (m2R) or 4.8 μ M control membrane protein (COX) with a multiplicity of approximately 2500 small drug like molecules each at a concentration of 1-10 μ M in a manner that established equilibrium binding conditions. High affinity ligands (K_d <100 μ M) to the proteins are then identified by ALIS. Small molecule ligands of the target protein m2R that do not also bind to the control protein COX are considered as specific ligands of the target protein. Separately, for comparison to experiments with a multiplicity of drug molecules, binding reactions were also prepared combining m2R or COX with individual (discrete) m2R ligands. This ALIS Analysis proceeded as described below with a series of size exclusion chromatography (SEC), followed by reverse phase chromatography (RPC), followed by mass spectrometric (MS) analysis.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

These prepared binding reaction mixtures were individually subjected to ALIS Analysis. Ligands that bound to the m2R with suitably high affinity were collected with the protein-containing SEC fraction as follows. The large detergent-solubilized molecules were separated from the unbound small drug-like molecules by SEC over a 4.6 mm x 50 mm x 5 μ m SEC column at 4°C using a running buffer of 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO at a flowrate of 2 mL/minute. The protein containing fraction was identified with ultraviolet electronic absorption spectrometry monitoring at 230 nm.

The protein-containing fraction was transferred by way of a sample loop to a low flowrate (100 μ L/min RPC system. The RPC column (Higgins C-18; 1 mm x 50 mm x 5 μ m) is maintained at 60 °C to promote ligand dissociation from the complex. From this RPC column the ligand is eluted into a high-resolution mass spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 5 minutes. Mass analyzed ligands collected with the protein-containing SEC fraction by virtue of its high affinity for the protein-detergent m2R complex were identified by fore-knowledge of their precise mass.

Experiments demonstrated that m2R screened by ALIS Analysis in this manner enabled known m2R ligands to be extracted from mixtures of a multiplicity of small drug like molecules by virtue of the known m2R ligands' high affinity for the m2R-detergent complex. This ALIS-formatted screen recovered m2R ligands from drug libraries just as well as it recovered m2R ligands bound to the m2R-detergent complex in the absence of drug libraries (Figure 10).

Data for these experiments are presented in Figure 10. In these experiments, equilibrium binding reactions were established by combining 2.0 μ M m2R with 10 μ M pirenzepine, QNB, or atropine in the absence or presence of combinatorial drug libraries (NGM-66, NGM-340, NGL-10-A-41, NGL-116-A-470) that presented approximately 2500 small drug-like molecules each at a concentration of 1-10 μ M. The binding reactions were subjected to ALIS Analysis and the extent of ligand recovery was quantified by the signal strength of the mass spectrometer. The x-axis is in relative units of mass spectrometric signal response for the respective masses of pirenzepine, QNB, and atropine.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

**EXAMPLE 3: DISPLACEMENT ASSAY IN AN AFFINITY-BASED
SELECTION AND ALIS IDENTIFICATION OF HP
LIGANDS**

- 5 As a representative HP, m2 mAChR is purified according to the method of Peterson et al. (Peterson, G.L. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808). The target protein is adjusted to a concentration of 20 μ M in a buffer of TBS-AGD and is incubated with a known muscarinic ligand, pirenzepine
- 10 (MW = 424.3), which is at a concentration of 1 μ M. As a control test, an unrelated membrane protein, glycophorin, is also prepared in TBS-AGD at 20 μ M and is incubated with the compound pirenzepine (MW = 424.3), which is at a concentration of 1 μ M.
- 15 A library of mass-coded compounds is added to the m2 mAChR/pirenzepine mixture, and the sample is analyzed to determine if a library compound displaces pirenzepine from the HP protein. Displacement of pirenzepine indicates that the library compound binds more tightly and at the same site
- 20 as pirenzepine itself.
- The displacement assay is conducted as follows. The mixture of m2 mAChR, 1 μ M pirenzepine, and 1 μ M of each library compound are subjected to ALIS Analysis. In this analysis MS signal corresponding to the mass of pirenzepine
- 25 is monitored, while the mass of the library compounds are ignored. If the library compound quantitatively reduces the MS signal corresponding to the mass of pirenzepine, it is inferred that the library compound displaced pirenzepine from the HP protein, in this case mAChR protein. If
- 30 incubation with the library compounds does not alter the MS signal corresponding to the mass of pirenzepine, the library compounds are considered not to contain an m2 mAChR ligand. By comparing pirenzepine MS signal with and without incubation with the library compounds, one can assess

WO 02/057792

PCT/US01/50088

whether the library compound displaces pirenzepine and thus binds to the mAChR protein.

5 **EXAMPLE 4: AFFINITY SELECTION OF m2 mAChR MASS-CODED LIGANDS AND IDENTIFICATION BY ALIS**

As a representative HP, m2 mAChR is purified according to the method of Peterson et al. (Peterson, G.L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808). The protein is adjusted to 20 μ M in a buffer of TBS-AGD is incubated with a 2500-member library of mass-coded compounds, each member at a concentration of 1 μ M. After a 30 minute incubation at 22°C, the sample was chilled at 4°C pending ALIS analysis. As a control test, an unrelated membrane protein, glycophorin, is also prepared in TBS-AGD at 20 μ M and incubated with the mass-coded library. To determine if the compound specifically binds to the mAChR, the mAChR-compound mixture is analyzed by ALIS Analysis. If a mass corresponding to one of the members of the mass-coded library appears when the protein peak is collected and surveyed by MS, that compound may be identified as a binding ligand. If the same compound fails to appear in the glycophorin control experiment, the compound may then be identified as a specific ligand of the mAChR. By virtue of the mass encoding the precise combination of building blocks and core can be identified (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.). Using MS-MS analysis (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.), the exact structure of the core plus building block combination can also be pinpointed.

30 **EXAMPLE 5: AFFINITY SELECTION OF COX-1 LIGANDS AND IDENTIFICATION BY MODIFIED ALIS WITH ON-LINE FLUORESCENCE DETECTION**

As a representative HP, COX-1 protein was purified from ram seminal vesicles according to the method of Johnson et al. (Johnson, J.L. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 324:26-34). The COX-1 sample is adjusted to 20 μ M in TBS-AGD (50

WO 02/057792

PCT/US01/50088

mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 800 mM dodecyl β -D-maltoside, 2.5% DMSO) is mixed and incubated with a 2500-member library of mass-coded compounds, each member at a concentration of 1 μ M. After a 30 minute incubation at 22°C, the sample was
5 chilled at 4°C pending ALIS analysis. As the total volume is 12 μ L, the sample thus contains 240 pmol protein and 12 pmol of each library component. As a control test, an unrelated membrane protein, glycophorin, is also prepared in TBS-AGD at 20 μ M and incubated with the same 2500-member
10 library and treated similarly.

Then the mixtures are individually subjected to modified ALIS analysis as follows. The large detergent-solubilized protein is separated from the small drug-like molecules by size exclusion chromatography (SEC) over a
15 4.6mm x 50 mm x 5 μ m SEC column at 0°C using a running buffer of TBS (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO) at a flowrate of 2 mL/minutes. The eluting SEC fraction containing protein is identified by on-line fluorescence detection exciting at 240-250 nm and monitoring emission at
20 340 nm and transferred by way of a sample loop to a low-flow (100 μ L/minute) reverse-phase chromatography (RPC) system. The RPC column (Higgins C-18; 1 mm x 50 mm x 5 μ m) is maintained at 60°C to promote dissociation of ligands from the complex. From the RPC column, the ligand is eluted into
25 a high-resolution mass spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 5 minutes. Ligand of suitably high affinity bound to the COX-1 at the time its fraction is collected, and the mass of the ligand
30 is identified by mass spectral analysis.

Through the mass coding, the precise combination of building blocks and core molecule are identified (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.). If the same compound fails to appear in the glycophorin control experiment, the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

compound may then be identified as a specific ligand of the COX-1 protein.

5 **EXAMPLE 6: AFFINITY SELECTION OF COX-1 LIGANDS AND IDENTIFICATION BY MODIFIED ALIS WITH ON-LINE LIGHT SCATTERING DETECTION**

As a representative HP, COX-1 protein was purified from ram seminal vesicles according to the method of Johnson et al. (Johnson, J.L. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 324:26-34). The COX-1 sample is adjusted to 20 μ M in TBS-AGD (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 800 mM dodecyl β -D-maltoside, 2.5% DMSO) is mixed and incubated with a 2500-member library of mass-coded compounds, each member at a concentration of 1 μ M. After a 30 minute incubation at 22°C, the sample is chilled at 4°C pending modified ALIS analysis. As the total volume is 12 μ L, the sample contains 240 pmol protein and 12 pmol of each library component. As a control test, an unrelated membrane protein, glycophorin, is also prepared in TBS-AGD at 20 μ M and incubated with the same 2500-member library and treated similarly.

Next, the control and test mixtures are individually subjected to modified ALIS analysis as follows. The large detergent-solubilized protein is separated from the small drug-like molecules by size exclusion chromatography (SEC) over a 4.6mm x 50 mm x 5 μ m SEC column at 0°C using a running buffer of TBS (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5% DMSO) at a flowrate of 2 mL/minute. The eluting SEC fraction containing protein is identified by on-line light scattering detection and transferred by way of a sample loop to a low-flow (100 μ L/minute) reverse-phase chromatography (RPC) system. The RPC column (Higgins C-18; 1 mm x 50 mm x 5 μ m) is maintained at 60°C to promote dissociation of ligands from the complex. From the RPC column, the ligand is eluted into a high-resolution mass spectrometer for

WO 02/057792

PCT/US01/50088

analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 5 minutes. Ligand of suitably high affinity bound to the COX-1 protein at the time its fraction is collected, and the mass of the ligand is identified by mass spectral analysis.

Through the mass coding, the precise combination of building blocks and core molecule are identified (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.). If the same compound fails to appear in the glycoporphin control experiment, the compound may then be identified as a specific ligand of the COX-1 protein.

EXAMPLE 7: HETEROGENEOUS SOLUTION PHASE SCREENING FOR LIGANDS THAT BIND m2 mACHR: IDENTIFICATION USING AFFINITY SELECTION AND ALIS ANALYSIS

HP ligands may also be screened by utilizing a heterogeneous solution phase screening method in which a tagged target sequence is immobilized on a solid support. For example, anti-flag antibody-loaded protein A agarose beads (anti-flag beads) are prepared for use as a sedimentable stationary element in an immunoprecipitation (IP)-based screening protocol.

Briefly, using a buffer of TBS-AG (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 800 mM dodecyl β -D-maltoside), 100 μ L of 50% v/v slurry of protein A agarose (Santa Cruz Biotechnology, St. Louis, MO.) are washed in a 1.5 mL eppendorf tube with three room temperature cycles of: (1) combining the beads with 1 mL TBS-AG; (2) mixing the sample by tumbling for 20 minutes; and (3) centrifugation at 10000xg, followed by a careful removal of the supernatant that leaves the pelleted agarose beads in the bottom of the tube.

After the beads have been washed, the 50 μ L pellet of beads is brought up in 1.0 mL TBS-AG. To that mixture, 50 μ L of 1 mg/mL β -galactosidase in TBS-AG buffer is added and the mixture is incubated at 4°C for 60 minutes to block non-

WO 02/057792

PCT/US01/50088

specific binding of protein to the beads. To that mixture is added 10 μ L of 1.0 μ g/mL anti-flag antibody (Sigma, St. Louis, Montana), and the mixture is incubated at 4°C for 60 minutes. In parallel, another preparation of control agarose beads handled similarly is treated with 10 μ L of TBS-AG instead of the anti-flag antibody. The anti-flag loaded beads and the control beads are then washed to remove excess antibody and protein and, finally, resuspended in 0.10 mL of TBS-AG buffer and transferred to 0.5 mL eppendorf tubes.

CHO cells expressing an m2 mAChR-flag tag-His tag protein are cultured, lysed, and homogenized. The m2 mAChR-containing membranes of the cells are purified by sucrose step-gradient ultracentrifugation. This sucrose step-gradient ultracentrifugation step removes most non-membrane proteins and cell debris. The ultracentrifugation step also has the potential of isolating specific populations of membranous cellular substructures. The mAChR-enriched membranes are solubilized with detergent (dodecyl- β -maltoside, D β M or CYMAL-7; (Anatrace; Maumee, OH)) and subjected to three steps of affinity purification.

First, metal chelate affinity chromatography (MCAQ) will be used to take advantage of the polyhistidine-tagged C-terminus, followed by a second affinity purification, an antibody affinity purification based on the FLAG-tagged N-terminus (Kobilka, B.K. (1995) *Anal. Biochem.* 231: 269). Third, ligand affinity purification over a column of immobilized mAChR ligand 3-(2'-aminobenzhydryloxy)-tropane (ABT), followed by a desalting step will yield a final enrichment of active m2 mAChR protein.

The sample is adjusted to 20 μ M m2 mAChR protein in a buffer of TBS-AGD and is incubated with a 2500-member library of mass-coded compounds, each member at a concentration of 1 μ M. The reaction is done in a volume of

WO 02/057792

PCT/US01/50088

40 μ L. After a 30 minute incubation at 22°C, the sample is chilled at 4°C pending MS analysis. As a comparison test, β -galactosidase is similarly prepared in TBS-AGD at 20 μ M and incubated with the mass-coded library.

- 5 The m2 mACHR protein-compound mixtures are prepared for analysis by MS analysis with the following procedure. The purified protein-library mixtures, either the m2 mACHR protein or β -galactosidase protein trials, are each split into two 20 μ L volumes. For the m2 mACHR-library mixture,
- 10 one volume is combined with the anti-flag beads (anti-flag/protein A agarose) for IP and the other volume is subjected to a mock IP by combination with the control agarose beads (buffer/protein A agarose beads). Similarly, for the β -galactosidase mixture, one 20 μ L volume is
- 15 combined with the anti-flag beads for a control IP and the other 20 μ L volume is subjected to a mock IP by combination with the control agarose beads. These IPs proceed, mixed by tumbling, for 60 minutes at 4°C. Afterwards, each IP is washed with three room temperature cycles of: (1) combining
- 20 the beads with 1 mL TBS-AG, (2) mixing by tumbling for 2 minutes, and (3) centrifugation at 10,000 g, followed by a careful removal of the supernatant that leaves the pelleted agarose beads in the bottom of the tube. Finally, each 50 μ L bed volume bead preparation is then resuspended in an
- 25 additional 50 μ L of TBS (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl) and kept at 4°C. At the completion of this process, four heterogeneous bead preparations are made: (1) m2 mACHR/anti-flag/protein A agarose (m2 beads), (2) m2 mACHR/buffer/protein A agarose beads (m2 control beads), (3)
- 30 β -galactosidase/anti-flag/protein A agarose beads (β -lac beads), and (4) β -galactosidase/buffer/protein A agarose beads (β -galactosidase control beads).

WO 02/057792

PCT/US01/50088

These bead-based preparations constitute heterogeneous solution phase systems useful for screening in the following manner. Each 100 μ L bead preparation is combined with 50 μ L of 30% acetonitrile in water heated to 60°C for 5 minutes to dissociate bound ligands from the protein. Then the mixture is centrifuged at 10,000 x g to pellet the beads, and the dissociated protein in the supernatant is transferred to a new tube.

The IP procedure allows both an affinity selection of a ligand and the physical separation of the m2mAChR-ligand complex from unbound library members. These supernatants contain 50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 80 mM dodecyl β -D-maltoside, and 10% acetonitrile. Approximately 60 μ L of these supernatant samples are injected individually into a low-flow (100 μ L/minutes) reverse-phase chromatography (RPC) system. The RPC column (Higgins C-18; 1 mm x 50 mm x 5 μ m) is maintained at 60°C. From this RPC column, the ligand is eluted into a high-resolution mass spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 5 minutes.

m2 mAChR-ligands are identified by observing a mass corresponding to one compounds from the 2500-member mass-coded library in the supernatant of the m2mAChR protein beads and not from the supernatant of the m2mAChR protein control, β -lac library, or β -lac control beads. The structure of the mass-coded compounds selected in the procedure are easily identified (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.). Using MS-MS analysis (see U.S. Patent No. 6,147,344 by Annis et al.), the exact structure of the core plus building block combination can also be pinpointed.

EXAMPLE 9: HETEROGENEOUS SOLUTION PHASE SCREENING FOR LIGANDS THAT BIND m2 mAChR: IDENTIFICATION

WO 02/057792

PCT/US01/50088

USING A DISPLACEMENT ASSAY COMBINED WITH
AFFINITY SELECTION AND MS ANALYSIS

Flag-tagged m2 mAChR protein is purified as outlined herein above and resuspended at a concentration of 20 μ M in a buffer of TBS-AGD. The protein is incubated with a 2500-member library of mass-coded compounds, each member at a concentration of 1 μ M and with 1 μ M pirenzepine, a known ligand for m2 mAChR protein, in a volume of 40 μ L. After a 30 minute incubation at 22°C, the sample was chilled at 4°C pending MS analysis. As a comparison test, β -galactosidase is similarly prepared in TBS-AGD at 20 μ M and incubated with the mass-coded library and pirenzepine.

The purified protein-library-pirenzepine mixtures, from either the m2 mAChR protein or β -galactosidase trials, are each split into two 20 μ L volumes. For the m2 mAChR-library-pirenzepine mixture, one volume is combined with the anti-flag beads (anti-flag/protein A agarose) for IP and the other volume is subjected to a mock IP by combination with the control agarose beads (buffer/protein A agarose beads). Protein A agarose beads are prepared as previously described herein. Similarly, for the β -galactosidase mixture, one 20 μ L volume is combined with the anti-flag beads for a control IP and the other 20 μ L volume is subjected to a mock IP by combination with the control agarose beads. These IPs proceed, mixed by tumbling, for 60 minutes at 4°C. Then each IP is washed with three room temperature cycles of: (1) combining the beads with 1 mL TBS-AG; (2) mixing by tumbling for 2 minutes; and (3) centrifugation at 10,000 x g, followed by a careful removal of the supernatant that leaves the pelleted agarose beads in the bottom of the tube. Finally, each 50 μ L bed volume bead preparation is then resuspended in an additional 50 μ L of TBS (50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl) and kept at 4°C. At the completion of

WO 02/057792

PCT/US01/50088

this process, four heterogeneous bead preparations are made:
(1) m2 mAChR/anti-flag/protein A agarose (m2 beads); (2) m2
mAChR/buffer/protein A agarose beads (m2 control beads); (3)
5 β -galactosidase/anti-flag/protein A agarose beads (β -
galactosidase beads), and (4) β -galactosidase/buffer/protein
A agarose beads (β -galactosidase control beads).

These bead-based preparations constitute heterogeneous
solution phase systems useful for screening in the following
manner. Each 100 μ L bead preparation is combined with 50 mL
10 of 30% acetonitrile in water heated to 60°C for 5 minutes to
dissociate any bound pirenzepine from the protein. Then the
mixture is centrifuged at 10,000 $\times$ g to pellet the beads,
and dissociated protein in the supernatant is transferred to
a new tube. The IP procedure allows both an affinity
15 selection of the ligand and the physical separation of the
m2 mAChR-ligand complex from unbound library members. These
supernatants contain 50 mM tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 80 mM
dodecyl β -D-maltoside, 10% acetonitrile, and <50 pmol of
pirenzepine. Approximately 60 μ L of these supernatants are
20 injected into low-flow (100 μ L/minute) reverse-phase
chromatography (RPC) system. The RPC column (Higgins C-18;
1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 5 μ m) is maintained at 60°C. From this RPC
column, the ligand is eluted into a high-resolution mass
spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95%
25 acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1%
formic acid) over 5 minutes.

The mass corresponding to pirenzepine from the
supernatant of the m2 mAChR protein control, β -
galactosidase library test, or β -galactosidase control beads
30 should be higher than the pirenzepine mass response in the
MS analysis of the m2 mAChR protein beads. It is then
inferred that the 2500-member mass-coded library contains a
ligand that binds to the m2 mAChR protein with an affinity

WO 02/057792

PCT/US01/50088

greater than that of pirenzepine. Libraries that contain hits can thus be detected and selected from among other libraries that do not contain hits.

5 **EXAMPLE 10: ENHANCING THE HYDROPHOBIC PROTEIN
SCREENING SUCCESS BY MULTIPLEXING**

To maintain the amphiphile-solubilized HP in a three-dimensional conformation that enhances the success of screening, HPs are multiplexed in the preparation of
10 screening samples. Multiplexing is defined to mean any method of preparation wherein the target protein is combined with some known molar equivalent of one or more accessory proteins (APs). Five independent criteria are identified to guide the selection of most favorable screening conditions
15 with regard to the use of APs: (1) in the presence of the AP(s), the target HP is observed to bind a known agonist with greater affinity than without the AP(s) present; (2) in the presence of the AP(s), the target HP is observed to bind a known antagonist with greater affinity than without the
20 AP(s) present; (3) in the presence of the AP(s), the HP is shown to have greater functional activity as assayed by enzymatic, *in vitro*, or cell-based assays; (4) in the presence of the AP(s), the HP is shown to alter its state of multimerization; and (5) in the presence of the AP(s), the
25 HP is shown to have greater conformational stability or uniformity.

As a first example, a method for multiplexed screening of m2 mAChR with $G_{\alpha 11\beta 1\gamma 2}$ -Guanosine-diphosphate (GDP) as a heterotrimeric AP is presented. The $G_{\alpha 11\beta 1\gamma 2}$ --GDP complex was
30 identified as an AP for the m2 mAChR because its presence enhanced the affinity of the m2 mAChR for an antagonist, N-methylscopolamine (NMS) by 5-fold as demonstrated by the following method. ³H-NMS binding assays performed by the method of Rinken and Haga (Rinken, A. and Haga, T. (1993)
35 *Arch. Biochem. Biophys.* 301:158-164) showed that the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

apparent K_d of m2 mAChR for 3H-NMS was 0.17 nM while K_d of the m2 mAChR- $G_{\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2}$ -GDP complex was 432 nM. To screen this HP/AP complex, m2 mAChR/ $G_{\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2}$ -PLs were prepared as described in Example 11 and screened for ligand binding according to any of the methods utilizing affinity selection and ALIS or modified ALIS presented herein with the addition of 50 μ M GDP to the binding buffer at the stage of incubation with the ligand compounds.

As a second example, multiplexed screening of heterodimerized κ and δ subtypes of the human opioid receptor is presented. The human κ opioid receptor was identified as an AP for the human δ opioid receptor because its presence caused the multimerization state of the human δ opioid receptor to change from monomer to heterodimer as demonstrated by the method of Jordan and Devi (Jordan, B.A. and Devi, L.A., (1999) *Nature* 399:697-708).

To prepare the δ/κ opioid receptor heterodimer complex for screening, the following method is used. Human κ -opioid receptor is purified and dialyzed into TBS-AG at a concentration of 50 μ M. Human δ -opioid receptor is purified and dialyzed into TBS-AG at a concentration of 50 μ M. Equal volumes of these two preparations were combined to allow them to dimerize.

The heterodimerized opioid receptor complex is then screened for ligand binding according to any of the methods utilizing affinity selection and ALIS or modified ALIS presented herein.

EXAMPLE 11: METHODS FOR THE PREPARATION OF DEFINED GPCR PROTEOLIPOSOMES (GPCR-PL)

To add conformational stability to detergent-solubilized GPCRs, the detergent micelle solubilization is exchanged for solubilization in defined proteoliposomes meeting the following criteria: (1) the lipid composition of

WO 02/057792

PCT/US01/50088

the PL is defined and characterized as having no more than six discrete lipid entities making up 90% of the lipid content of the PL; (2) 90% of the HP-PL preparation has a defined, unimodal size distribution of particles spanning no
5 more than three orders of magnitude and wherein mean particle size is in the range of 5-10000 nm; (c) the PL preparation yields >50 nM HP.

To prepare HP-PL bearing m2 mAChR protein, the following procedure is used. Synthetic lipids (Avanti Polar
10 Lipids, Alabaster, AL) D-ribo-phytospingosine-1-phosphate and ceramide-C18:0 each in chloroform are combined in a volume of 1 mL each at 5 mM in a glass test tube, and the chloroform is evaporated at room temperature under a stream of argon for 24 hrs. The lipid residue is then wetted with
15 0.40 mL of TBS, sonicated for 30 minutes at 28°C, and the mixture is transferred to a 1.5 mL polypropylene tube. To this lipid mixture is added 0.2 mL 50 µM m2 mAChR prepared as described in Peterson, G.L. et al. (Peterson, G.L. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808). This yields a crude
20 mixture of lipid and protein.

The crude protein-lipid mixture is then incubated for 3 hours at 8°C with 5 minute, 22°C bath sonication at 30 minute intervals (6 times). This mixture is then subjected to 11 passages through a 100 nm polycarbonate membranes in a small
25 volume extruder according to the manufacturer's protocol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at 20°C. This yields a crude PL preparation of 0.6 mL volume, 16 µM m2 mAChR, and excess amphiphile (DbM and lipid). To remove excess lipid and detergent, the crude PL preparation is passed through a
30 10.0 mL desalting (G-50 sephadex column) previously equilibrated with TBS at 4°C. After application of the crude PL preparation to the desalting column, TBS at 4°C is used to elute the material from the column. This desalting procedure is conducted with a flow rate of 0.5 mL/minute.
35 The protein concentration is estimated by combining a 10 µL

WO 02/057792

PCT/US01/50088

sample with 10 μ L of 0.2% Triton X-100 and using that mixture in a Bio-Rad colorimetric protein assay (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). The concentration is then adjusted by dilution with TBS to 10 μ M.

5 The size distribution is defined using a Coulter N4 submicron particle analyzer following the manufacturer's protocols. An independent assessment of size distribution and mean particle size is accomplished by analytical SEC by injecting 20 μ L onto an analytical SEC column with a running
10 buffer TBS at a flow rate of 1.0 mL/minute (G2000_{SMXL}, 5 x 300 mm, 5 μ m; ToSo-Haas), fitted with a UV detector monitoring at 280 nm, and chilled to 12°C. A single peak eluting at 8.23 minutes identified the retention time of the GPCR-PL's which was compared to standard curve of molecular size
15 marker elution times and indicated that the mean apparent size was comparable to that of a 940,000 dalton protein.

 Proteoliposomes may also be prepared with HPs complexed with APs. In this procedure, detergent micelle solubilization is exchanged with solubilization in defined
20 proteoliposomes meeting the following criteria: (1) the lipid composition of the PL was defined and characterized as having no more than six discrete lipid entities making up 90% of the lipid content of the PL; (2) 90% of the HP-PL preparation has a defined, unimodal size distribution of
25 particles spanning no more than three orders of magnitude and wherein mean particle size is in the range of 5-10000 nm; (3) the PL preparation yields >50 nM HP; (4) the PL preparation included at least one other protein designated the accessory protein (AP), the presence of which supports
30 the maintenance of a favorable conformation for the target HP.

 To prepare HP-PL bearing m2 mACHR, the following procedure was used. Synthetic lipids (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) D-ribo-phytospingosine-1-phosphate and
35 ceramide-C18:0 each in chloroform are combined in a volume

WO 02/057792

PCT/US01/50088

of 1 mL each at 5 mM in a glass test tube and the chloroform is evaporated at room temperature under a stream of argon for 24 hrs. The lipid residue is then wetted with 0.40 mL of TBS plus 2 mM MgCl_2 (TBSM), sonicated for 30 minutes at 28°C, and mixture transferred to a 1.5 mL polypropylene tube. Separately, 50 μM $\text{G}_{\alpha_{11}\beta_1\gamma_2}$ was prepared by combining equal volumes of 100 μM $\text{G}_{\alpha_{11}}$ with 100 μM $\text{G}_{\beta_1\gamma_2}$ purified as described (ref) and dialyzed into TBSM plus 800 mM DbM (TBSM-AG). To the lipid mixture is added 0.2 mL 50 μM m2 mACHR prepared as described in Peterson, G.L. et al. (Peterson, G.L. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808) and 0.2 mL 50 μM $\text{G}_{\alpha_{11}\beta_1\gamma_2}$. To this mixture is added 10 μL of 50 mM GDP. This yields a crude mixture of lipid, HP, and AP.

The crude HP/AP-lipid mixture is then incubated for 3 hours at 8°C with 5 minute, 22°C bath sonication at 30 minute intervals (6 times). This mixture is then subjected to 11 passages through a 100 nm polycarbonate membranes in a small volume extruder according to the manufacturer's protocol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at 20°C. This yields a crude PL preparation of 0.8 mL volume, 12 μM mACHR, 12 μM $\text{G}_{\alpha_{11}\beta_1\gamma_2}$, and excess amphiphile (DbM and lipid). To remove excess lipid and detergent, the crude PL preparation is passed through a 10.0 mL desalting (G-50 sephadex column) previously equilibrated with TBS at 4°C. After application of the crude PL preparation to the desalting column, TBS at 4°C is used to elute the material from the column. This desalting procedure is conducted with a flow rate of 0.5 mL/minute. The protein concentration is estimated by combining a 10 μL sample with 10 μL of 0.2% Triton X-100 and using that mixture in a Bio-Rad colorimetric protein assay following the manufacture's instructions. The concentration is then adjusted by dilution with TBS to 20 μM .

To define size distribution, a Coulter N4 submicron particle analyzer is used according to the manufacturers

WO 02/057792

PCT/US01/50088

protocol. An independent assessment of size distribution and mean particle size is accomplished by analytical SEC by injecting 20 μ L onto an analytical SEC column with a running buffer TBS at a flow rate of 1.0 mL/minute (G2000_{small}, 5 x 300 mm, 5 μ m; ToSo-Haas), fitted with a UV detector monitoring at 280 nm, and chilled to 12°C. A single peak eluting at 8.23 minutes post-injection identified the retention time of the HP/AP-PL's which is compared to standard curve of molecular size marker elution times. The resultant mean apparent size is comparable to that of a 940,000 dalton protein.

Control AP-PLs for use as screening controls are made to meet the following criteria: (1) the lipid composition of the PL was defined and characterized as having no more than six discrete lipid entities making up 90% of the lipid content of the PL; (2) 90% of the HP-PL preparation has a defined, unimodal size distribution of particles spanning no more than three orders of magnitude and wherein mean particle size is in the range of 5-10000 nm; (3) the PL preparation is designed to exactly mimic the analogous HP/AP-PL except no target HP is present.

To prepare AP-PL bearing m2 mACHR, the following procedure is used. Synthetic lipids (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) D-ribo-phytospingosine-1-phosphate and ceramide-C18:0 each in chloroform are combined in a volume of 1 mL each at 5 mM in a glass test tube and the chloroform is evaporated at room temperature under a stream of argon for 24 hours. The lipid residue is then wetted with 0.40 mL of TBS plus 2 mM MgCl₂ (TBSM), sonicated for 30 minutes at 28°C, and mixture transferred to a 1.5 mL polypropylene tube. Separately, 50 μ M G _{α 1 β 1 γ 2} was prepared by combining equal volumes of 100 μ M G _{α 11} with 100 μ M G _{β 1 γ 2} purified as described Hou, Y. et al., *J. Biol. Chem.* (2000) 275:38961-6 and dialyzed into TBSM plus 800 mM DbM (TBSM-AG). To the lipid mixture is added 0.2 mL TBS-AG and 0.2 mL 50 μ M G _{α 11 β 1 γ 2}.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

To this mixture is added 10 μ L of 50 mM GDP. This yields a crude mixture of lipid and AP. The protein concentration is estimated by combining a 10 μ L sample with 10 μ L of 0.2% Triton X-100 and using that mixture in a Bio-Rad
5 colorimetric protein assay following the instructions of the manufacturer. The concentration is then adjusted by dilution with TBS to 10 μ M.

This crude AP-lipid mixture is then incubated for 3 hours at 8°C with 5 minute, 22°C bath sonication at 30 minute
10 intervals (6 times). This mixture is then subjected to 11 passages through a 100 nm polycarbonate membranes in a small volume extruder according to the manufacturer's protocol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at 20°C. This yields a crude PL preparation of 0.8 mL volume, 12 μ M mACHR, 12 μ M
15 $G_{\alpha 14}P_1Y_2$, and excess amphiphile (DbM and lipid). To remove excess lipid and detergent, the crude PL preparation is passed through a 10.0 mL desalting (G-50 sephadex column) previously equilibrated with TBS at 4°C. After application of the crude PL preparation to the desalting column, TBS at
20 4°C is used to elute the material from the column. This desalting procedure is conducted with a flow rate of 0.5 mL/minute.

To define size distribution, a Coulter N4 submicron particle analyzer is used according to the manufacturers
25 protocol. An independent assessment of size distribution and mean particle size is accomplished by analytical SEC by injecting 20 μ L onto an analytical SEC column with a running buffer TBS at a flow rate of 1.0 mL/minute (G2000_{secl}, 5 x 300 mm, 5 μ m; ToSo-Haas), fitted with a UV detector monitoring
30 at 280 nm, and chilled to 12°C. A single peak eluting at 8.23 minutes identified the retention time of the AP-PL's which is compared to standard curve of molecular size marker elution times. The resultant mean apparent size is comparable to that of a 940,000 dalton protein.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

The proteoliposomes described herein are then screened for ligand binding according to any of the methods utilizing affinity selection and ALIS or modified ALIS presented herein.

5

EXAMPLE 12: DUAL EPITOPE AFFINITY PURIFICATION OF HPs

The construction of nucleic acid sequences encoding the tagged HP proteins of the invention is well within the skill of those in the art, utilizing routine procedures common in the art of nucleic acid cloning.

10

Tagged-HPs, e.g., Mellitin-Flag Tag-Human m1 mAChR-EE-tag protein or Mellitin-Flag Tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE-tag protein, are produced from a recombinant baculovirus following the methodology provided by the manufacturer of the viral expression system (Pharmingen, San Diego, CA).

15

Briefly, recombinant virus is selected based on its ability to direct the expression of the recombinant protein(s). Protein expression is confirmed by western blot analysis of detergent-solubilized cell lysates of the infected insect cells. Using primary antibodies that recognize either the Flag epitope, the EE epitope, or the HP protein itself, the western blot reveals whether or not, and to what degree, the HP proteins are expressed. If possible, a functional assay is performed to determine that the expressed protein is functional. For example, for the Mellitin-Flag Tag-Human m1 mAChR-EE-tag protein, a cell-based ³H-N-methylscopolamine binding analyses is performed by the method of Rinken and Haga (Rinken, A. and Haga, T. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 301:158-164) confirmed that the virus-directed protein expression was functional, indicating a *B*_{max} of 0.5x10⁶ receptors per cell and a *K*_d of 0.10 nM. This baculovirus was then amplified by to a high titer of 2.0x10⁹ pfu/mL by conventional methods (Pharmingen, San Diego, CA).

20

25

30

35

WO 02/057792

PCT/US01/50088

Next, large-scale insect cell cultures are obtained for the isolation of the proteins. Briefly, once high titer virus stocks are generated the constructs of interest, ten 10 liter production runs were executed, growing Sf21 insect cells to a density of 2×10^6 cells/mL in a bioreactor with wave agitation (Wave Biotechnology, Bedminster, NJ). For each protein produced, these cells were inoculated with high titer virus stock at an multiplicity of infection (MOI) of 5 and two days post-infection the cells were harvested.

The HP proteins are then solubilized. For example, mAChR protein expressing cells are collected by centrifugation for 30 minutes at $10,000 \times g$. The cell pellets from all ten bioreactor production runs are combined, and the cell pellets are suspended in 500 mL of ice cold TBS buffer plus 1 mM EDTA, 10 μ g/mL pepstatin and 1 μ g/mL pmethylsulfonylfluoride, and 20 mM dodecyl- β -D-maltoside (DbM). This cell slurry is subjected to 50 strokes in a pestle A dounce homogenizer at 4°C to break open the cells and solubilize the membrane proteins. To clarify this suspension, the material is centrifuged for 60 minutes at $40000 \times g$ at 4°C to remove insoluble material. The supernatant is then collected and used as a source of soluble Mellitin-Flag Tag-Human m1 mAChR-EE protein. (Note: The honey bee mellitin signal sequence is cleaved off by cellular proteases in the process of expression and trafficking to the plasma membrane of the insect cell. From this point on the solubilized protein is referred to as Flag Tag-Human m1 mAChR-EE.)

Each solubilized recombinant HP is then purified with two rounds of affinity purification over an antibody affinity column. Both the anti-EE-tag and anti-Flag-tag columns are prepared similarly. Briefly, 35 mg of purified anti-epitope antibody is dialyzed into coupling buffer and coupled to 10 mL CNBr-activated sepharose beads according to the manufacturers protocol (Amersham Pharmacia, Piscataway,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

NJ). The resin is then transferred to a 1.2 x 15 cm polypropylene column, and the epitope affinity columns are then equilibrated with TBS-AG at 4°C.

Next, 50 mL of solubilized HP protein, e.g., FlagTag-Human m1 mAChR-EE, is applied to the anti-EE affinity column at a flow rate of 0.2 mL per minute. The column was then washed with 5 column volumes of TBS-AG at the same flow rate. The specifically-bound HP is then eluted from the column with a bolus of excess EE peptide (NH₂-EEEEYMPME-COOH; Sigma-Genosys, St. Louis, MO) solubilized in a volume of 15 mL in TBS-AG at 10 mM. The eluant is then applied similarly to the anti-Flag-tag affinity column, similarly washed, and eluted from the column with excess anti-FLAG peptide (NH₂-DYKDDDDK-COOH; Sigma-Genosys, St. Louis, MO). This material is then dialyzed with two exchanges into a 100 fold volume of TBS-AG overnight at 4°C.

Sucrose gradient ultracentrifugation is then used to remove misfolded polypeptide. Briefly, the material is applied to a discontinuous step gradient of 5%-25% sucrose in TBS-AG and centrifuged in a Beckman SW Ti.50 rotor at 100000xg for 4 hours at 4°C. The properly conformed HP, e.g., FlagTag-Human m1 mAChR-EE, material is collected at the 5%-25% interface. This material is then subjected to a final dialysis with two exchanges into a 100 fold volume of TBS-AG overnight at 4°C.

The protein concentration of the HP solution is determined by colorimetric protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) and adjusted as necessary, by dilution or concentration in a stirred ultrafiltration cell (Millipore, Bedford, MA), to 50 µM. The detergent concentration is also determined by RPC-UV using a Higgins C-18 column whereupon 50 µL of the mixture the ligand is eluted into a high-resolution mass spectrometer for analysis using a gradient of 5%-95% acetonitrile (0.1% formic acid counterion) in water (w/ 0.1% formic acid) over 20 minutes.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

The Rt of the DbM is determined by a separate control experiments under identical conditions. To quantitate the amount of detergent, the area under the DbM peak from the protein sample is compared to a standard curve generated from multiple RPC runs with identical conditions assaying the DbM peak height for DbM samples of known concentration. If the detergent concentration is estimated to be below 0.48 mM (4x cmc), it is adjusted with the addition of a small amount of concentrated DbM in TBS.

10

**EXAMPLE 13: EPITOPE AFFINITY AND METAL CHELATE AFFINITY
 CHROMATOGRAPHY (MCAC) OF HPs**

HPs are also constructed with an epitope affinity tag and a metal chelate affinity tag, as represented, for example, by Hemagglutinin SS-Rat m3 mACHR-HSV-OctaHis. Briefly, an isolated nucleic acid molecule encoding Hemagglutinin SS-Rat m3 mACHR-HSV-OctaHis is used in the production of a recombinant baculovirus following methods provided by the manufacturer (Pharmingen, San Diego, CA). Virus production, the large-scale insect cell culture and expression of protein, the preparation of epitope affinity columns, the preparation of solubilized HP, and epitope affinity purification were all performed as previously described herein except that anti-HSV antibody replaces the anti-FLAG antibody in the preparation of the HSV epitope affinity column and the HSV peptide (NH₂-QP₂ELAP₂EDPED-COOH; Sigma-Genosys) is used to elute the Hemagglutinin SS-Rat m3 mACHR-HSV-OctaHis protein from the column instead of the FLAG peptide. Also, since there is no EE epitope on the Hemagglutinin SS-Rat m3 mACHR-HSV-OctaHis protein, no epitope affinity purification using the EE epitope is used. (Note: The Hemagglutinin SS signal sequence may be cleaved off in some cell lines by cellular proteases in the process of expression and trafficking to the plasma membrane of the

WO 02/057792

PCT/US01/50088

insect cell. From this point on the solubilized protein is referred to as Rat m3 mAChR-HSV-OctaHis.

For the final affinity purification step, Rat m3 mAChR-HSV-OctaHis is applied, at a flow rate of 0.2 mL/minutes, to a MCAC column prepared by loading 10 mL of Ni-NTA resin (Qiagen) into a 1.2 x 15 cm polypropylene column and equilibrating the column with 100 mL of TBS-AG at 4°C at a flow rate of 0.2 mL/minutes. Once the Rat m3 mAChR-HSV-OctaHis is bound to the column, the column is washed with 100 mL of TBS-AG containing 5 mM imidazole. Then, the column is developed with a 50 mL linear gradient of 5 mM-350 mM imidazole in TBS-AG at the same flow rate, collecting 0.5 mL fractions. Fractions containing active mAChR, as assessed by a known radioligand binding assay, elute at imidazole concentrations of 190-240 mM in a volume of 11 mL. This material is then dialyzed with three exchanges into a 100 fold volume of TBS-AG overnight at 4°C to remove excess imidazole. The material is then subjected to sucrose gradient ultracentrifugation and the concentrations of protein and detergent are estimated and adjusted as previously described herein.

EXAMPLE 14: CHARACTERIZATION OF PURIFIED HPs

To confirm the purity of the final preparation of the HP(s) produced herein, each sample is subjected to SDS-PAGE analysis on 5-12% Novex (Invitrogen, San Diego, CA) gels according to the manufacturer's instructions. Ten µg of sample are loaded per gel lane, and the protein samples are visualized by silver staining (Peterson, G.L. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808). The specific activities of the mAChR proteins prepared according to these methods are determined according the method of Peterson, G.L. *et al.* (Peterson, G.L. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17808). For the methods described herein, typically the specific

WO 02/057792

PCT/US01/50088

activity of the proteins is determined to be in the range of 11-16 nmol of specific ligand binding per mg mAChR protein.

Ligand affinity chromatography is another measure by which the HPs of the invention may be evaluated for specific
5 activity. For example, the mAChR purified by the methods described herein may be subjected to known ligand affinity chromatography over a column of immobilized mAChR ligand 3-(2'-aminobenzhydryloxy)-tropane (ABT).

WO 02/057792

PCT/US01/50088

EQUIVALENTS

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain, using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

5

WO 02/057792

PCT/US01/50088

What is claimed is:

1. A method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising
 - 5 (a) selecting a ligand molecule by affinity selection by exposing a hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the
 - 10 (b) ligand molecule, separating the complex from the unbound molecules, and
 - (c) identifying the ligand molecule.
- 15 2. The method of claim 1, wherein exposure of the hydrophobic target protein to a multiplicity of molecules occurs under homogeneous solution phase conditions.
- 20 3. The method of claim 1, wherein exposure of the hydrophobic target protein to a multiplicity of molecules occurs under heterogeneous solution phase conditions.
- 25 4. The method of claim 1, wherein selection of the ligand molecule is done using multi-dimensional chromatography.
5. The method of claim 1, wherein the hydrophobic target
 - 30 protein is selected from the group consisting of:
 - (a) of a membrane protein,
 - (b) an integral membrane protein,
 - (c) a transmembrane protein,
 - (d) a monotopic membrane protein,
 - 35 (e) a polytopic membrane protein,
 - (f) a pump protein,
 - (g) a channel protein,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (h) a receptor kinase protein,
(i) a G protein-coupled receptor protein,
(j) a membrane-associated enzyme, and
(k) a transporter protein.
- 5 6. The method of claim 1, wherein the multiplicity of molecules is a mass-coded library of molecules.
7. The method of claim 1, wherein the multiplicity of molecules is a library of molecules that is not mass-coded.
- 10 8. The method of claim 1, wherein the amphiphile is selected from the group consisting of:
- 15 (a) a polar lipid,
(b) an amphiphilic macromolecular polymer,
(c) a surfactant or detergent, and
(d) an amphiphilic polypeptide.
- 20 9. The method of claim 1, wherein ligand molecule identification is done by mass spectral analysis.
10. The method of claim 1, wherein the ligand molecule is deconvoluted by mass spectral analysis.
- 25 11. The method of claim 1, wherein separation of the complex from the unbound molecules is accomplished with solid phase chromatography media.
- 30 12. The method according to claim 1, wherein the hydrophobic target protein comprises
(a) at least one transmembrane domain sequence,
(b) at least two tag sequences useful for affinity selection, and
35 (c) a hydrophobic protein (HP) sequence.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

13. The method according to claim 12, wherein the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of
- (a) of a membrane protein,
 - 5 (b) an integral membrane protein,
 - (c) a transmembrane protein,
 - (d) a monotopic membrane protein,
 - (e) a polytopic membrane protein,
 - (f) a pump protein,
 - 10 (g) a channel protein,
 - (h) a receptor kinase protein,
 - (i) a G protein-coupled receptor protein,
 - (j) a membrane-associated enzyme, and
 - (k) a transporter protein.
- 15
14. The method according to claim 12, wherein the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of
- (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29),
 - 20 (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:30),
 - (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:31),
 - (d) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32),
 - and
 - 25 (e) an HSV tag (NH₂-QPRLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33).
15. The method according to claim 12, wherein the hydrophobic target protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of
- 30 (a) Tag1-Tag2-HP,
 - (b) Tag1-HP-Tag2, and
 - (c) HP-Tag1-Tag2.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

16. The method according to claim 15, wherein the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of
- (a) Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:7),
 - 5 (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:8),
 - (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9),
 - (d) Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and
 - 10 (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11).
17. The method according to claim 15, wherein the hydrophobic target protein further comprises a heterologous signal sequence (SS) at the amino terminus.
18. The method according to claim 17, wherein the heterologous signal sequence is selected from the group consisting of
- 20 (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-KFLVNVALVFMVVYISYIYA-COOH (SEQ ID NO:12),
 - (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEP-COOH (SEQ ID NO:13),
 - (c) the Hemagglutinin signal sequence of NH₂-25 KTIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14),
 - (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLABP-COOH (SEQ ID NO:15), and
 - 30 (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-GKNPLGVRKTETSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16).
19. The method according to claim 18, wherein the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18).
- 35

WO 02/057792

PCT/US01/50088

20. The method according to claim 19, wherein the hydrophobic target protein is selected from the group consisting of
- 5 (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19),
 - (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20),
 - (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:21),
 - 10 (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and
 - (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:23).
- 15 21. A method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising
- (a) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation,
 - 20 (b) purifying the hydrophobic protein by antibody affinity purification, and
 - (c) purifying the hydrophobic protein by immobilized metal affinity chromatography.
22. The method of claim 21, wherein the hydrophobic protein comprises
- 25 (a) at least one transmembrane domain sequence,
 - (b) at least two tag sequences useful for affinity selection, and
 - (c) a hydrophobic protein (HP) sequence.
- 30 23. The method according to claim 22, wherein the hydrophobic protein sequence is selected from the group consisting of
- (a) a membrane protein,
 - 35 (b) an integral membrane protein,
 - (c) a transmembrane protein,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (d) a monotopic membrane protein,
 - (e) a polytopic membrane protein,
 - (f) a pump protein,
 - (g) a channel protein,
 - 5 (h) a receptor kinase protein,
 - (i) a G protein-coupled receptor protein,
 - (j) a membrane-associated enzyme, and
 - (k) a transporter protein.
- 10 24. The method according to claim 22, wherein the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of
- (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29),
 - (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:30),
 - 15 (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:31),
 - (d) a myc tag (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32), and
 - (e) an HSV tag (NH₂-QPQLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33).
- 20 25. The method according to claim 22, wherein the hydrophobic protein comprises a sequence with an amino terminus to carboxy terminus order selected from the group consisting of
- 25 (a) Tag1-Tag2-HP,
 - (b) Tag1-HP-Tag2, and
 - (c) HP-Tag1-Tag2.
26. The method according to claim 22, wherein the
- 30 hydrophobic protein is selected from the group consisting of
- (a) Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:7),
 - (b) Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic Receptor-EE tag (SEQ ID NO:8),
 - 35 (c) Human Neurokinin 3 Receptor-HSV tag-Myc tag (SEQ ID NO:9),

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (d) Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:10), and
 (e) Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:11).
27. The method according to claim 22, wherein the
 5 hydrophobic protein further comprises a heterologous
 signal sequence (SS) at the amino terminus.
28. The method according to claim 27, wherein the
 heterologous signal sequence is selected from the group
 10 consisting of
 (a) the Mellitin signal sequence of NH₂-
 KFLVNVALVPMVVYISYIYA-COOH (SEQ ID NO:12),
 (b) the GP signal sequence of NH₂-VRTAVLILLVRFSEP-
 COOH (SEQ ID NO:13),
 15 (c) the Hemagglutinin signal sequence of NH₂-
 KTIIALSYIFCLVFA-COOH (SEQ ID NO:14),
 (d) the rhodopsin tag 1 signal sequence of NH₂-
 MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFAPQYLAEP-COOH (SEQ ID
 NO:15), and
 20 (e) the rhodopsin tag ID4 signal sequence of NH₂-
 GKNPLGVKRTTTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:16).
29. The method according to claim 14, wherein the tag
 sequences further comprise a hexahistidine sequence
 25 (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID
 NO:18).
30. The method according to claim 29, wherein the
 hydrophobic target protein is selected from the group
 30 consisting of
 (a) GP67 SS-Myc tag-EE tag-Human m2 mAChR (SEQ ID
 NO:19),
 (b) Mellitin SS-Flag tag-Human Beta 2 Adrenergic
 Receptor-EE tag (SEQ ID NO:20),
 35 (c) Hemagglutinin SS-Human Neurokinin 3 Receptor-HSV
 tag-Myc tag (SEQ ID NO:21),

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (d) Mellitin SS-Flag tag-Human m1 mAChR-EE tag (SEQ ID NO:22), and
- (e) Hemagglutinin SS-Rat m3 mAChR-HSV tag-OctaHis tag (SEQ ID NO:23).
- 5
31. An isolated nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising
- (a) a vector polynucleotide sequence for protein expression in a eukaryotic cell, and
- 10 (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements
- (i) an N-terminal methionine residue,
- (ii) a heterologous signal sequence (SS),
- 15 (iii) at least one transmembrane domain sequence,
- (iv) at least two tag sequences useful for affinity selection, and
- (v) a hydrophobic protein (HP) sequence.
- 20 32. The isolated nucleic acid molecule of claim 32, wherein the N-terminal methionine sequence and the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of
- (a) MKFLVMVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:24),
- 25 (b) MVRTAVLILLVRFSEEP (SEQ ID NO:25),
- (c) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26)
- (d) MMNGTEGPNFVVPFSNKTGVVRSPFEAPQYVLAEAP-COOH (SEQ ID NO:27) and
- (e) MGKNPLGVKRTETSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:28).
- 30 33. The isolated nucleic acid molecule of claim 33, wherein the tag sequences comprise epitope tag sequences selected from the group consisting of
- (a) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1),
- 35 (b) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2),

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (c) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVDPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3),
- (d) a myc tag (NH₂-KHKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4),
- and
- 5 (e) an HSV tag (NH₂-QPFLAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5).
34. The isolated nucleic acid molecule of claim 33, wherein the elements of the engineered hydrophobic protein are arrayed from an amino to carboxy terminus order
- 10 selected from the group consisting of
- (a) SS-Tag1-Tag2-HP,
- (b) SS-Tag1-HP-Tag2, and
- (c) SS-HP-Tag1-Tag2.
- 15 35. The isolated nucleic acid molecule of claim 34, wherein the tag sequences further comprise a hexahistidine sequence (SEQ ID NO:17) and a decahistidine sequence (SEQ ID NO:18).
- 20 36. The isolated nucleic acid molecule of claim 35, wherein the engineered hydrophobic protein is selected from the group consisting of
- (a) GP67-Myc-EE-Human m2 mAChR (SEQ ID NO:19),
- (b) Mellitin-Flag Tag-Human m1 mAChR-EE (SEQ ID
- 25 NO:20), and
37. A method for identifying a ligand for a hydrophobic protein, the method comprising
- (a) selecting a hydrophobic target protein from the
- 30 group consisting of
- (i) of a membrane protein,
- (ii) an integral membrane protein,
- (iii) a transmembrane protein,
- (iv) a monotopic membrane protein,
- 35 (v) a polytopic membrane protein,
- (vi) a pump protein,
- (vii) a channel protein,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (viii) a receptor kinase protein,
(ix) a G protein-coupled receptor protein,
(x) a membrane-associated enzyme, and
(xi) a transporter protein,
5 (xii) wherein the hydrophobic protein is bound
by amphiphile;
(b) selecting an amphiphile to bind the hydrophobic
protein from the group consisting of:
(i) a polar lipid,
10 (ii) an amphiphilic macromolecular polymer,
(iii) a surfactant or detergent, and
(iv) an amphiphilic polypeptide;
(c) selecting a ligand molecule using multi-
dimensional chromatography by affinity selection
15 by exposing under homogenous solution phase
conditions the hydrophobic target protein bound by
an amphiphile to a multiplicity of molecules from
a mass-coded library to promote the formation of
at least one complex between the hydrophobic
20 target protein and the ligand molecule;
(d) separating the complex from the unbound molecules;
and
(e) identifying the ligand molecule by mass spectral
analysis.
25
38. A method for identifying a ligand for a hydrophobic
protein, the method comprising
(a) selecting a hydrophobic target protein from the
group consisting of
30 (i) of a membrane protein,
(ii) an integral membrane protein,
(iii) a transmembrane protein,
(iv) a monotopic membrane protein,
(v) a polytopic membrane protein,
35 (vi) a pump protein,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (vii) a channel protein,
 - (viii) a receptor kinase protein,
 - (ix) a G protein-coupled receptor protein,
 - (x) a membrane-associated enzyme, and
 - 5 (xi) a transporter protein,
 - (xii) wherein the hydrophobic protein is bound by amphiphile;
 - (b) selecting an amphiphile to bind the hydrophobic protein from the group consisting of:
 - 10 (i) a polar lipid,
 - (ii) an amphiphilic macromolecular polymer,
 - (iii) a surfactant or detergent, and
 - (iv) an amphiphilic polypeptide;
 - (c) selecting a ligand molecule using multi-dimensional chromatography by affinity selection by exposing under heterogeneous solution phase conditions a hydrophobic target protein bound by an amphiphile to a multiplicity of molecules from a library that is not mass-coded to promote the formation of at least one complex between the hydrophobic target protein and the ligand molecule;
 - 20 (d) separating the complex from the unbound molecules; and
 - 25 (e) identifying the ligand molecule by mass spectral analysis.
39. A method of isolating a hydrophobic protein, the method comprising
- 30 (a) selecting a hydrophobic protein comprising
 - (i) at least one transmembrane domain sequence,
 - (ii) at least two tag sequences useful for affinity selection, selected from the group consisting of:
 - 35

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (1) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:29),
- (2) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:30),
- 5 (3) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:31),
- (4) a myc tag (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:32), and
- (5) an HSV tag (NH₂-QPELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:33);
- 10 (iii) a hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of:
 - (1) a membrane protein,
 - (2) an integral membrane protein,
 - 15 (3) a transmembrane protein,
 - (4) a monotopic membrane protein,
 - (5) a polytopic membrane protein,
 - (6) a pump protein,
 - (7) a channel protein,
 - 20 (8) a receptor kinase protein,
 - (9) a G protein-coupled receptor protein,
 - (10) a membrane-associated enzyme, and
 - (11) a transporter protein;
- 25 (b) purifying the hydrophobic protein by sucrose gradient ultracentrifugation;
- (c) purifying the hydrophobic protein by antibody affinity purification; and
- (d) purifying the hydrophobic protein by immobilized
- 30 metal affinity chromatography.
40. An isolated nucleic acid molecule suitable for hydrophobic protein expression, comprising
 - (a) a vector polynucleotide sequence for protein
 - 35 expression in a eukaryotic cell; and

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- (b) a polynucleotide sequence encoding an engineered hydrophobic protein comprising the following elements
- (i) an N-terminal methionine residue,
 - 5 (ii) a heterologous signal sequence (SS), wherein the N-terminal methionine sequence and the heterologous signal sequence are selected from the group consisting of
 - (1) MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:24),
 - 10 (2) MVRTAVLILLVRFSEP (SEQ ID NO:25),
 - (3) MKTIIALSYIFCLVFA (SEQ ID NO:26)
 - (4) MMNGTEGPNFYVFPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEP-COOH (SEQ ID NO:27) and
 - 15 (5) MGKNPLGVRKTETTSQVAPA-COOH (SEQ ID NO:28),
 - (iii) at least one transmembrane domain sequence;
 - 20 (iv) at least two tag sequences useful for affinity selection selected from the group consisting of
 - (1) a FLAG tag (NH₂-DYKDDDDK-COOH) (SEQ ID NO:1),
 - 25 (2) an EE tag (NH₂-EEEEYMPME-COOH) (SEQ ID NO:2),
 - (3) a hemagglutinin tag (NH₂-YPYDVPDYA-COOH) (SEQ ID NO:3),
 - (4) a myc tag (NH₂-KKKLEQLRNSGA-COOH) (SEQ ID NO:4), and
 - 30 (5) an HSV tag (NH₂-QP₂ELAPEDPED-COOH) (SEQ ID NO:5), and
 - (v) a hydrophobic protein (HP) sequence selected from the group consisting of:
 - 35 (1) a membrane protein,
 - (2) an integral membrane protein,

WO 02/057792

PCT/US01/50088

- 5
- (3) a transmembrane protein,
(4) a monotopic membrane protein,
(5) a polytopic membrane protein,
(6) a pump protein,
(7) a channel protein,
(8) a receptor kinase protein,
(9) a G protein-coupled receptor
protein,
10 (10) a membrane-associated enzyme, and
(11) a transporter protein.

WO 02/057792

PCT/US01/50088

1/10

MVRTAVLIILLVRFSEPKHLEQLRNSGAAAAEEEEYMPMEMNNTSSNNSLALTSPYKT
FEVVFIVLAGSLSVTIIGNILVMVSIKVNRLQTVNNYFLFLACADLIIGVFSMNLYTLYTV
IGYWPLGPVVCDLWLALDYVVSNAVMNLLIIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVL
SFILWAPAILFWQFIVGVRTVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAIAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKS
RIKKDKKEPVANQDPVSPSLVQGRIVKPNNNMPSSDDGLEHNKIRDPTENCVCQGEKESSNDS
TSVASASNMRRDDEITQDENTVSTSLGHSKDENSQKTCIRIGTKTPKSDSCTPTNTTVEVVGSSG
QNGDEKQNIIVARKIVKMTKQPAKKKPPPSREKKVTRTILAILLAFIITWAPYNVMVLINTFCAPC
IPNTVWTIGYWLVCYINSTINPACYALCNATFKTFKLLMCHYKNIGATR (SEQ ID NO:19)

FIG. 1

WO 02/057792

PCT/US01/50088

2/10

MKFLVNVALVFMVVYISYIYADYKDDDDKMGQPGNGSAFLLAENRSHAPDHDVTQQRDEV
WVVGMIVMSLIVLAIVFGNVLIVITAIKFERLQVTNFTSLACADLVNGLAVVPFGAAHILM
KMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIEITLCVIAVDRYFAITSPFKYQSLITKNKARVILMVWIVS
GLTSFLPIQMHWYRATHQEA INCYANETCCDFFTNQAYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYSRVFQEA
KRQLQKIDKSEGREHVNLSQVEQDGRGTGHLRRSSKFCCLKHKALKTLGIIIMGTFTLCWLPPFI
VNIHVIQDNLIRKEVYIILNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSS
NGNTGEQSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDIDSQGRNCSTNDSLLEEEYMPM
E (SEQ ID NO:20)

FIG. 2

WO 02/057792

PCT/US01/50088

3/10

MKTIIALSYPCLVFAMAILPAAETWIDGGGVGADAVNLTASLAAGATGAVETGWLQL
LDQAGNLSSPSALGLPVRSPAPSPQWANLTNQFVQPSWRIALWSLAYGVVVAVALGNLIVWI
ILAHKRMRTVTNYFLVNLAFSDASMAAFNTLVNFIYALHSEWYFGANYCRFQNFPPITAVFASIY
SMTAIAVDRYMAIIDPLKPRLSATATKIVIGSIWILAFLLAPPQCLYSKTKVMPGRTLCCFVQWPE
GPKQHFTYHIIIVIIILVYCFPLIMGITYTIVGITLWGGEIPGDTCDKYHEQLKAKRKVVKMMIIV
VMTFAICWLPYHIYFILTAYQQLNRWKYIQVYLASFWLAMSSTMYNPIIYCCLNKRFRAGFKR
AFRCPFIKVSSXDELELKTTRFHPNRQSSMYTVTRMESMTVVFDPNADTTSSRKKRATPRDP
SFNGCRRNSKSASATSSFISSPYTSVDEYSQPELAPEDPEDAAKHKLEQLRNSG (SEQ ID

NO:21)

FIG. 3

WO 02/057792

PCT/US01/50088

4/10

MKFLVNVALVFMVVYISYIYADYKDDDDKMNTSAPPAVSPNITVLA PGKGPWQVAFIGIT
TGLLSIATVTGNLLVLISFKVNTTELKTVNNYFLLSLACADLIIGTFSMNLYTTYLLMGHWALGTL
ACDLWLALDYVASNASVMNLLISFDRYFSVTRPLSYRAKRTPRRAALMIGLAWLVSFVLWAPAI
LFWQYLVGERTVLAGQCYIQFLSQPIITFGTAMAAFYLPVTVMCTLYWRIYRETENRARELAALQ
GSETPGKGGGSSSSSERSQPGAEGSPETPPGRCRCRAPRLLQAYSWKKEEEDEGSMESLTSS
EGEPPGSEVVIKMPMVDPEAQPTKQPPRSSPNTVKRPTKKGRDRAGKGQKPRGKEQLAKRKTFS
LVKEKKAARTLSAILLAFILTWTPYNIMVLVSTFCCKDCVPETLMELGYWLCYVNSTINPMCYALC
NKAFRDTRLLLLCRWDKRRWRKIPKRPGSVHRTPSRQCEEEYMPME (SEQ ID NO:22)

FIG. 4

WO 02/057792

PCT/US01/50088

5/10

MKTIIIALSYIFCLVFAMTLHSNSTSP LFPNISSWVHSPSEAGLPLGTVTQLGSYNISQ
ETCNFSSNDTSSDPLGGHTIWQVVFIAFLTGFLALVTIIIGNILVIVAFKVNKQLKTVNNYFLLSL
ACADLIIGVISMNLETTYIIMNRWALGNLACDLWLSDIYVNASVMNLLVISFDRYFSITRPLT
YRAKRTTKRRGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAEAEAFVHPTGSSRSCSSYELQQQGVKRSSR
RKYGRCHFWF TTKSWKPSAEQMDQDHSSSDSWNNNDAAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIVLK
LPGHSSILLNSTKL PSSDNLQVSNEDLGTVDVERNAHKLQAKSMG DGNQCQKDFTKLP IQLES AV
DTGKTSDTNSSADKTTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRRMSLIKEKAAQTL SAILLAF
IITWTPYNIMVLVNTFCDCSCIPKTYWNLYWLCYINSTVNPVCYALCNKTFRTFKTL LLLCQCDK
RKRKQYQQRQSVIFHKRVPEQALQPELAPEDPEDAAHHHHHHH (SEQ ID NO:23)

FIG. 5

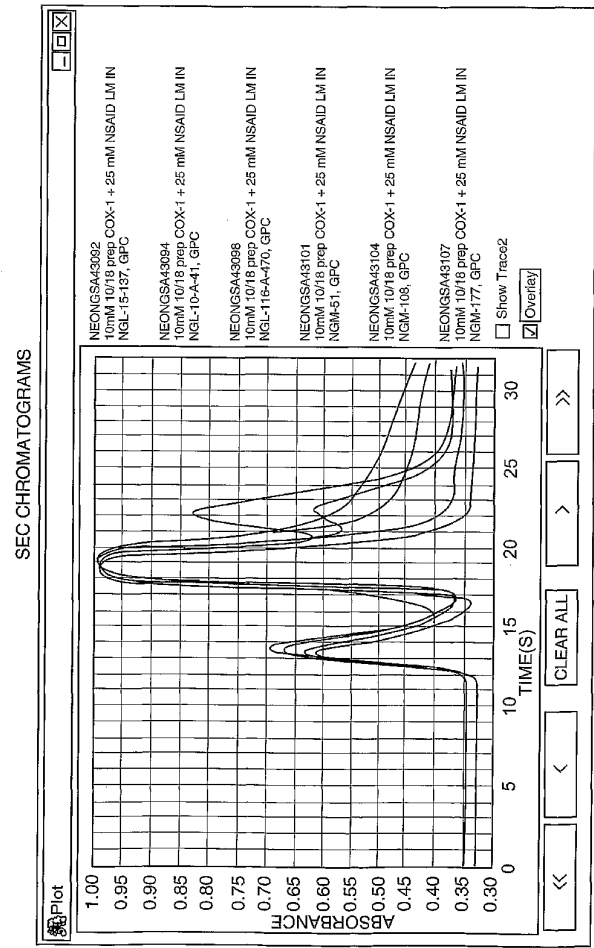
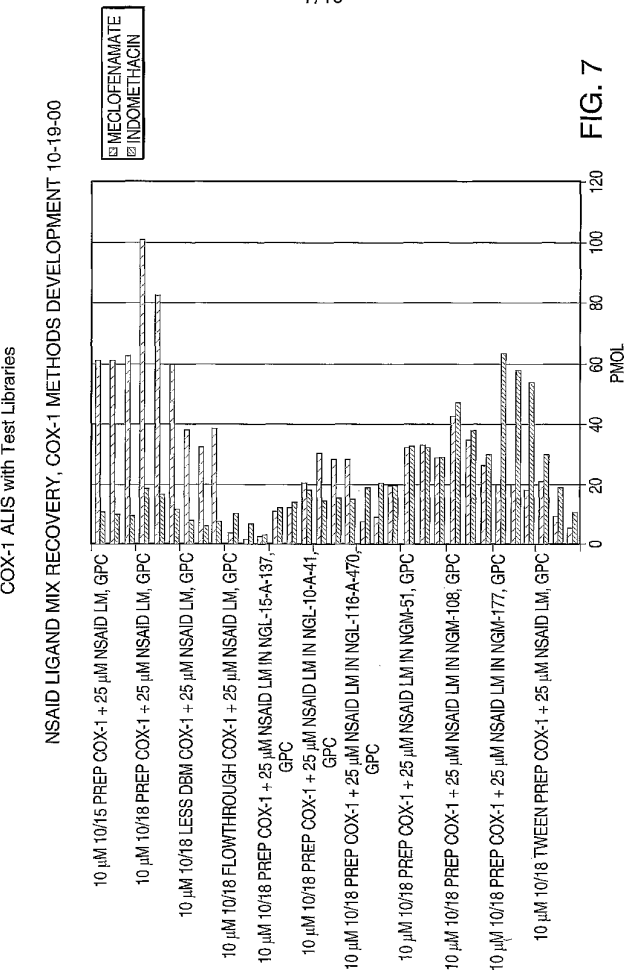


FIG. 6

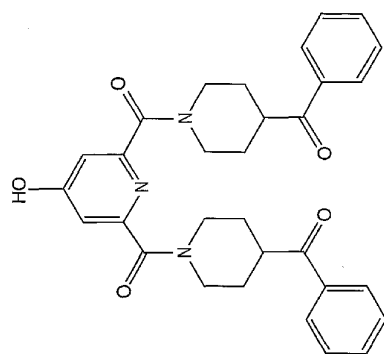


WO 02/057792

PCT/US01/50088

8/10

Example COX-1 Ligand Identified by ALIS

NGL-177-A-1128-A-2 $C_{31}H_{31}N_3O_5$

MW = 525.6

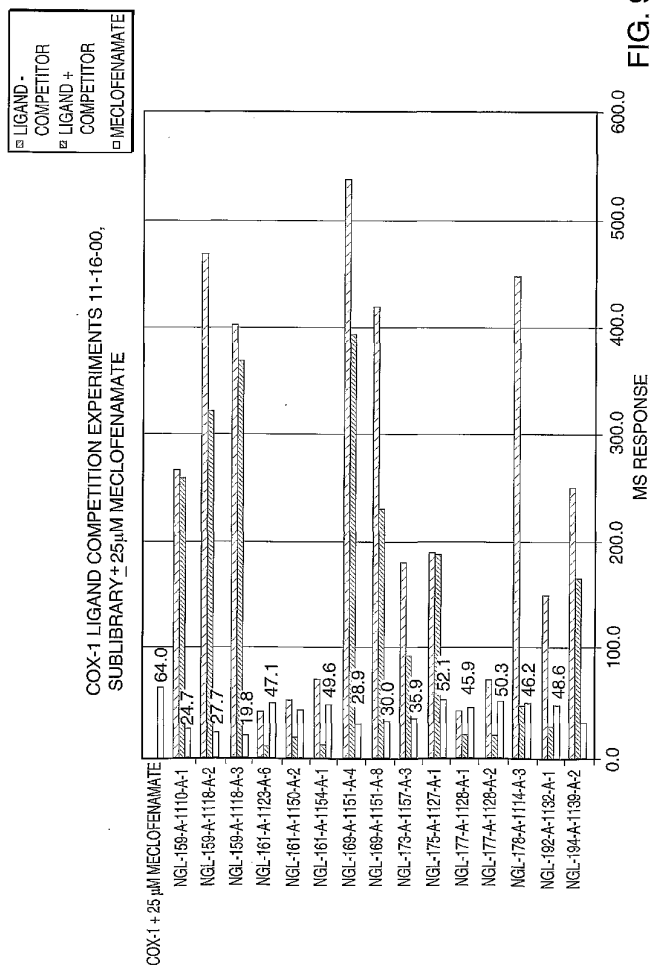
MASS = 525.23

FIG. 8

WO 02/057792

PCT/US01/50088

9/10



WO 02/057792

PCT/US01/50088

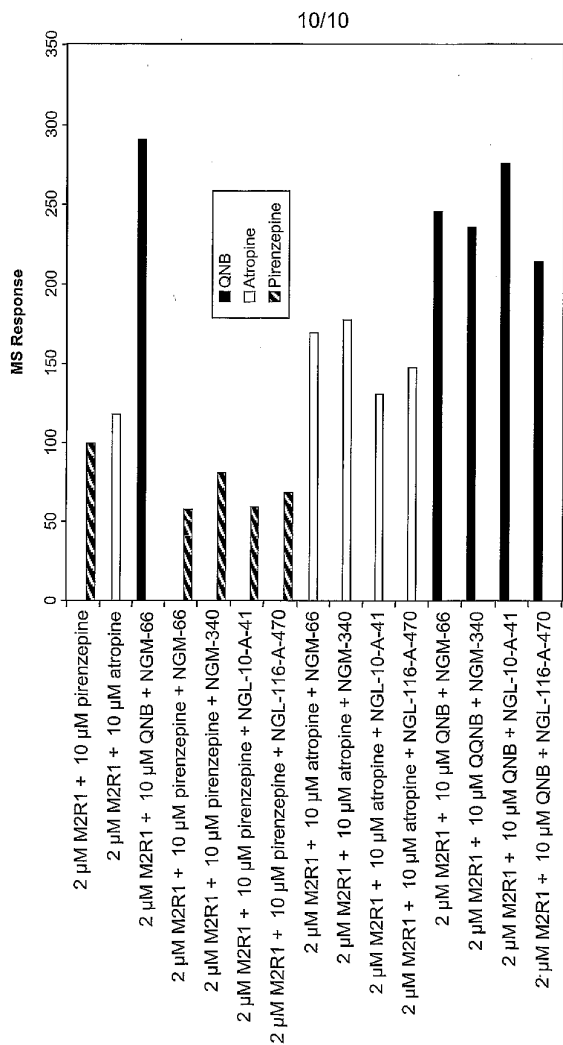


FIG. 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

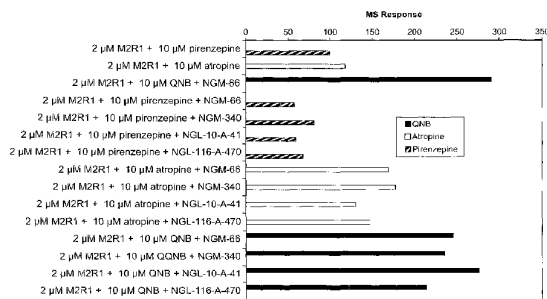
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057792 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, 33/53, C12N 15/00, G01N 33/566, C07K 1/22
- (21) International Application Number: PCT/US01/50088
- (22) International Filing Date: 19 December 2001 (19.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/258,970 29 December 2000 (29.12.2000) US
- (71) Applicant: NEOGENESIS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 840 Memorial Drive, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventors: FELSCH, Jason, S.; 11 Chase Road, Waltham, MA 02452-6401 (US). ANNIS, David, Allen, Jr.; 14 Remington Street, Cambridge, MA 02138 (US). KALGHATGI, Krishna; 25 Jacob Amsden Road, Westboro, MA 01581 (US). NASH, Huw, M.; 109 River Street 3-B, Cambridge, MA 02139 (US).
- (74) Agent: HSI, Jeffrey, D.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 6 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AFFINITY SELECTION-BASED SCREENING OF HYDROPHOBIC PROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to methods based on affinity selection for the identification of ligands for hydrophobic proteins bound by amphiphile. The invention also provides hydrophobic proteins and methods of isolation of hydrophobic proteins that are suitable for ligand screening.

WO 02/057792 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/50088
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/53 C12N15/00 G01N33/566 C07K1/22		
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 7 G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 35109 A (NEOGENESIS INC) 15 July 1999 (1999-07-15) cited in the application page 31 - page 33; example 4	1-6,9, 11,37
Y	----- page 31 - page 33; example 4	1-20,29, 30,37
X	KAUR S ET AL: "Affinity selection and mass spectrometry-based strategies to identify lead compounds in combinatorial libraries" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, XX, XX, vol. 16, no. 5, July 1997 (1997-07), pages 505-511, XP002117171 ISSN: 0277-8033	1-4,7,9, 11,38
Y	the whole document ----- -/-	1-20,29, 30,38
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 practice 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 June 2003		Date of mailing of the international search report - 8. 09. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Pasteelaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tlx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schalich, J.

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/50088

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 21665 A (AMYLIN PHARMACEUTICALS INC) 29 September 1994 (1994-09-29) page 20 - page 24 -----	1,5,8
X	WO 95 02611 A (SCHERING CORP) 26 January 1995 (1995-01-26) page 30 - page 32 -----	1,5
X	WO 99 64050 A (ADVANCED MEDICINE INC ;EASTMAN DONNA (US); GRIFFIN JOHN H (US); JA) 16 December 1999 (1999-12-16) page 79 - page 81 -----	1,5
X	WO 99 36537 A (TARTAGLIA LOUIS A ;WHITEHEAD BIOMEDICAL INST (US); GIMENO RUTH E () 22 July 1999 (1999-07-22) page 22 - page 24 page 42 -----	1,3,5,7, 9,12-20, 29,30,38
Y	BRUCE J E ET AL: "BIO-AFFINITY CHARACTERIZATION MASS SPECTROMETRY" RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, HEYDEN, LONDON, GB, vol. 9, no. 8, 1995, pages 644-650, XP008013910 ISSN: 0951-4198 the whole document -----	1-11
Y	WOODBURY C P ET AL: "METHODS OF SCREENING COMBINATORIAL LIBRARIES USING IMMOBILIZED OR RESTRAINED RECEPTORS" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 725, no. 1, 2 April 1999 (1999-04-02), pages 113-137, XP000955377 ISSN: 1570-0232 the whole document -----	1-11
Y	YONG-ZHONG ZHAO ET AL: "Screening solution-phase combinatorial libraries using pulsed ultrafiltration electrospray mass spectrometry" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 40, no. 25, pages 4006-4012, XP002144610 ISSN: 0022-2623 the whole document ----- -/--	1,10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/50088
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LE MAIRE MARC ET AL: "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1508, no. 1-2, 2000, pages 86-111, XP002243218 ISSN: 0006-3002 paragraph [4.2.]	1,8,37, 38
A	WHITELEGGE J P ET AL: "Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 19, pages 10695-10698, XP002243219 Sept. 14, 1999 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,8,37, 38
A	HAUSER HELMUT: "Short-chain phospholipids as detergents." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1508, no. 1-2, 2000, pages 164-181, XP002243220 ISSN: 0006-3002 the whole document	1,8,37, 38
A	SCHAFMEISTER C E ET AL: "Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins" SCIENCE, AAAS, LANCASTER, PA, US, vol. 262, 29 October 1993 (1993-10-29), pages 734-738, XP002155522 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1,8,37, 38
A	TRIBET C ET AL: "Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, UNITED STATES 24 DEC 1996, vol. 93, no. 26, 24 December 1996 (1996-12-24), pages 15047-15050, XP002243221 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,8,37, 38

4

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/59088
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210		
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.		
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort, utilizing an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.		
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.: 1-20, 29, 30, 37 and 38		
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998) page 1 of 2

International Application No. PCT/US 01/50088

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: -

Present claims 1-20, 29, 30, 37 and 38 relate to an extremely large number of possible methods. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the following methods: affinity selection of ligands of membrane proteins by screening libraries, separation of solution-phase complex by chromatography and identification of ligand by mass-spectroscopy as described in the examples

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/US 01/50088

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-20, 29, 30, 37 and 38

Method for identifying a ligand for a hydrophobic protein comprising the use of an amphiphile

2. claims: 21-28 and 39

Method for isolating a hydrophobic protein comprising sucrose gradient ultracentrifugation, antibody affinity purification and immobilized metal affinity chromatography

3. claims: 31-36 and 40

Nucleic acids suitable for hydrophobic protein expression

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/50088

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9935109	A	15-07-1999	CA	2313957 A1	14-01-2002
			US	6207861 B1	27-03-2001
			EP	1045819 A1	25-10-2000
			JP	2002500205 T	08-01-2002
			WO	9935109 A1	15-07-1999
			US	2002172970 A1	21-11-2002
			US	2002182714 A1	05-12-2002
			US	2003138788 A1	24-07-2003
WO 9421665	A	29-09-1994	AU	6524794 A	11-10-1994
			WO	9421665 A1	29-09-1994
WO 9502611	A	26-01-1995	AU	7324094 A	13-02-1995
			WO	9502611 A1	26-01-1995
			US	5965401 A	12-10-1999
WO 9964050	A	16-12-1999	AU	4426499 A	30-12-1999
			AU	4543799 A	30-12-1999
			AU	4549399 A	30-12-1999
			AU	4550699 A	30-12-1999
			AU	4551199 A	30-12-1999
			AU	4672699 A	30-12-1999
			CA	2318547 A1	16-12-1999
			CA	2318745 A1	16-12-1999
			CA	2318806 A1	16-12-1999
			CA	2318901 A1	16-12-1999
			CA	2319142 A1	16-12-1999
			CA	2319153 A1	16-12-1999
			EP	1086063 A1	28-03-2001
			EP	1086065 A1	28-03-2001
			EP	1085863 A1	28-03-2001
			EP	1085879 A2	28-03-2001
			EP	1089749 A1	11-04-2001
			EP	1085890 A1	28-03-2001
			JP	2002517437 T	18-06-2002
			JP	2002517449 T	18-06-2002
			JP	2002517458 T	18-06-2002
			JP	2002517466 T	18-06-2002
			SG	80037 A1	17-04-2001
			SG	80038 A1	17-04-2001
			US	2003044845 A1	06-03-2003
			WO	9964032 A1	16-12-1999
			WO	9963984 A1	16-12-1999
			WO	9963992 A1	16-12-1999
			WO	9963932 A2	16-12-1999
			WO	9964045 A1	16-12-1999
			WO	9964050 A1	16-12-1999
			US	2003073127 A1	17-04-2003
			US	6420354 B1	16-07-2002
			ZA	200004562 A	30-11-2001
			ZA	200004563 A	30-11-2001
			ZA	200004564 A	30-11-2001
WO 9936537	A	22-07-1999	US	6300096 B1	09-10-2001
			US	6288213 B1	11-09-2001
			US	6348321 B1	19-02-2002
			AU	2310899 A	02-08-1999
			CA	2318363 A1	22-07-1999

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			International Application No PCT/US 01/50088
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9936537	A	EP 1045904 A1	25-10-2000
		JP 2003521224 T	15-07-2003
		WO 9936537 A2	22-07-1999
		US 6284487 B1	04-09-2001
		US 2002106733 A1	08-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
// C 0 7 K 14/00	G 0 1 N 33/53	M
C 0 7 K 19/00	G 0 1 N 33/566	
	C 0 7 K 14/00	
	C 0 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 フェルシュ、ジェイソン エス.

アメリカ合衆国 0 2 4 5 2-6 4 0 1 マサチューセッツ州 ウォルサム チェイス ロード
1 1

(72)発明者 アニス、ディビッド アレン ジュニア

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ レミントン ストリート 1
4

(72)発明者 カルガートギ、クリシュナ

アメリカ合衆国 0 1 5 8 1 マサチューセッツ州 ウェストボロ ジェイコブ アムスデン ロード 2 5

(72)発明者 ナッシュ、ヒュー エム.

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ リバー ストリート 1 0 9
3-B

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 FB02

4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02

EA03 EA04 FA02 GA11 HA01 HA03 HA11

4H045 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA20 EA50 FA72 FA74 GA26