

(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2007-525170

(P2007-525170A)

(43) 公表日 平成19年9月6日(2007.9.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00 ZNA	2G045
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15 ZTD	4B024
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19 ZCC	4B063
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 A	4B065
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-509913 (P2006-509913)	(71) 出願人	505379489 キュー・バイオテック・インコーポレーテッド アメリカ合衆国イリノイ州60611, シカゴ, イースト・シカゴ・アベニュー 303, ワード・ビルディング 17-171
(86) (22) 出願日	平成16年4月12日 (2004. 4. 12)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月9日 (2005. 12. 9)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/011167	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02004/092199	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成16年10月28日 (2004. 10. 28)		
(31) 優先権主張番号	10/411, 336		
(32) 優先日	平成15年4月11日 (2003. 4. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達の調節剤を同定する方法

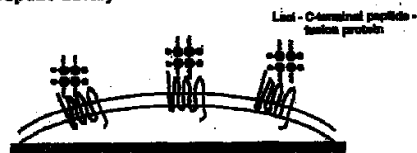
(57) 【要約】

本発明は、高親和性および特異性で、Gタンパク質共役型受容体が仲介するシグナル伝達を遮断するかまたは増進し、そして/またはGタンパク質共役型受容体の特定の配座異性体を安定化する、ペプチドおよび他の化合物を同定する方法に関する。これらの方法と組み合わせで発展したアッセイ、治療法、および他の方法もまた、開示する。

Bind GPCR to well



Add peptide library



Use parent peptide to compete



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチドを同定する方法であって：

(a)天然Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し；

(b)前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、前記ペプチドライブラリーをスクリーニングし；そして

(c)天然ペプチドより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する、前記ペプチドライブラリーのメンバーを選択する

ことを含む、前記方法。

10

## 【請求項 2】

工程(b)の前記スクリーニングが、損なわれていない(*intact*)Gタンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項1の方法。

## 【請求項 3】

工程(b)の前記スクリーニングが、Gタンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項1の方法。

## 【請求項 4】

工程(a)の前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドが、Gタンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項1の方法。

## 【請求項 5】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約70アミノ酸である、請求項4の方法。

20

## 【請求項 6】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約55アミノ酸である、請求項4の方法。

## 【請求項 7】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約8～約50アミノ酸である、請求項4の方法。

## 【請求項 8】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約9～約23アミノ酸である、請求項4の方法。

30

## 【請求項 9】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約11アミノ酸である、請求項4の方法。

## 【請求項 10】

前記Gタンパク質サブユニット断片がGサブユニットである、請求項4の方法。

## 【請求項 11】

前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドがGサブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項4の方法。

## 【請求項 12】

前記Gタンパク質サブユニットがG二量体である、請求項4の方法。

40

## 【請求項 13】

工程(b)の前記スクリーニングが競合結合アッセイを含む、請求項1の方法。

## 【請求項 14】

前記競合結合アッセイが、前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドと、前記ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられる、請求項13の方法。

## 【請求項 15】

前記ペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能である、請求項1の方法。

## 【請求項 16】

50

前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求項 1 の方法。

【請求項 17】

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 1 の方法。

【請求項 18】

前記ペプチドライブラリーがコンビナトリアル・ペプチドライブラリーである、請求項 1 の方法。

【請求項 19】

前記コンビナトリアル・ペプチドライブラリーがタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 18 の方法。 10

【請求項 20】

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

前記ペプチドライブラリーがペプチドディスプレイライブラリーである、請求項 1 の方法。

【請求項 22】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって：

( a ) 前記 G タンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し； 20

( b ) 高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドを提供し；

( c ) 前記高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと競合する、前記 G タンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の前記ライブラリーをスクリーニングし；そして

( d ) 工程 ( b ) のペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で前記 G タンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が工程 ( b ) のペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定する

ことを含む、前記方法。 30

【請求項 23】

工程 ( c ) の前記スクリーニングが、損なわれていない G タンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

工程 ( c ) の前記スクリーニングが、G タンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項 22 の方法。

【請求項 25】

工程 ( b ) の前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが、G タンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項 22 の方法。

【請求項 26】 40

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 70 アミノ酸である、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 55 アミノ酸である、請求項 25 の方法。

【請求項 28】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 8 ~ 約 50 アミノ酸である、請求項 25 の方法。

【請求項 29】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 9 ~ 約 23 アミノ酸である、請求項 25 の 50

方法。

【請求項 30】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 11 アミノ酸である、請求項 25 の方法。

【請求項 31】

前記 G タンパク質サブユニットが G サブユニットである、請求項 25 の方法。

【請求項 32】

前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが G サブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項 25 の方法。

【請求項 33】

前記 G タンパク質サブユニットが G 二量体である、請求項 25 の方法。

10

【請求項 34】

工程 (c) の前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求 22 の方法

。

【請求項 35】

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 22 の方法。

【請求項 36】

工程 (a) の候補化合物の前記ライブラリーが、工程 (b) のペプチドの構造に基づく、候補化合物の集中的 (f o c u s e d) ライブラリーである、請求項 22 の方法。

20

【請求項 37】

工程 (a) の候補化合物の前記ライブラリーがコンビナトリアル・ライブラリーである、請求項 22 の方法。

【請求項 38】

前記コンビナトリアル・ライブラリーが薬剤様分子を含む、請求項 37 の方法。

【請求項 39】

前記コンビナトリアル・ライブラリーが集中的小分子ライブラリーである、請求項 37 の方法。

【請求項 40】

前記集中的小分子ライブラリーのメンバーが、工程 (b) のペプチドの化学的構造に基づく、請求項 39 の方法。

30

【請求項 41】

請求項 1 の方法にしたがって同定される、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチド。

【請求項 42】

請求項 22 の方法にしたがって同定される、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物。

【請求項 43】

G タンパク質共役型受容体を有する細胞において、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達を修飾する方法であって、請求項 1 の方法にしたがって同定された化合物を前記細胞に投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 44】

G タンパク質共役型受容体を有する細胞において、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達を修飾する方法であって、請求項 22 の方法にしたがって同定された化合物を前記細胞に投与することを含む、前記方法。

【請求項 45】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達を阻害する方法であって、前記 G タンパク質共役型受容体が同族 (c o g n a t e) G タンパク質に結合するのに干渉する化合物と、前記 G タンパク質共役型受容体を接触させることを含む、前記方法。

【請求項 46】

50

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって：

(a) 請求項1の方法にしたがって同定されたペプチドを提供し、ここで前記ペプチドは検出可能なペプチドシグナルを提供するように標識されている；

(b) 候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物のライブラリーを提供し；

(c) 前記ペプチドと前記Gタンパク質共役型受容体を、前記ペプチドが前記Gタンパク質共役型受容体に結合する条件下で接触させ；

(d) 未結合ペプチドを前記Gタンパク質共役型受容体から取り除き；

(e) ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性を測定し、そして前記検出可能ペプチドシグナルを測定し；

(f) 候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物の前記ライブラリーのメンバーと、ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体を接触させ；

(g) ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性を測定し、そして前記検出可能ペプチドシグナルを測定し；

(h) 前記Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達活性が、前記候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているか、そしてGタンパク質共役型受容体ペプチド結合が、前記候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているかを決定し；そして

(i) ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体との接触が、前記Gタンパク質共役型受容体へのペプチド結合増加、およびGタンパク質共役型受容体シグナル伝達増加の両方を生じる化合物を同定し、ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体との接触が、前記Gタンパク質共役型受容体へのペプチド結合減少、およびGタンパク質共役型受容体シグナル伝達減少の両方を生じる化合物を同定し、そしてペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体との接触が、工程(a)のペプチドの結合親和性増加を生じる化合物を同定する

ことを含む、前記方法。

【請求項47】

ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体の前記シグナル伝達活性を測定する方法が：

(a) イノシトールリン酸集積測定；

(b) 細胞内Ca<sup>2+</sup>レベル測定；

(c) アデニルシクラーゼ活性測定；

(d) 経内皮電気抵抗測定；

(e) ストレスファイバー形成測定；

(f) リガンド結合測定；

(g) 受容体発現測定；

(h) 受容体脱感作測定；

(i) キナーゼ活性測定；

(j) ホスファターゼ活性測定；

(k) 核転写因子測定；

(l) 遊走(走化性)すべての測定；

(m) スーパーオキシド形成測定；

(n) 一酸化窒素形成測定；

(o) 細胞脱顆粒測定；

(p) GIRK活性測定；

(q) アクチン重合測定；

(r) 血管狭窄測定；

(s) 細胞浸透性測定；

(t) アポトーシス測定；

(u) 細胞分化測定；

(v) プロテインキナーゼCなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の

10

20

30

40

50

膜会合の測定；

(w) プロテインキナーゼCなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の細胞質ゾル集積の測定；および

(x) Ranなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の核会合の測定からなる群より選択される、請求項46の方法。

【請求項48】

配列番号2、4、6、8、10、12、13、15、17、21、23、25～27、30、32、34、36、38、40、45～85、94～111、125～150、160～164、175～178および183～264からなる群より選択される化合物。

【請求項49】

療法Gタンパク質共役型シグナル伝達修飾ペプチドを哺乳動物に提供する方法であって、前記哺乳動物に、請求項48の化合物を発現する発現構築物を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項50】

過剰なGタンパク質共役型受容体シグナル伝達が原因因子である疾患状態を治療する方法であって、請求項48記載の化合物を投与することを含む、前記方法。

【請求項51】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達増進剤を同定する方法であって：

(a) 天然Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し；

20

(b) 前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、前記ペプチドライブラリーをスクリーニングし；

(c) 天然ペプチドより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する前記ペプチドライブラリーメンバーを選択し；

(d) 前記Gタンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し；

(e) 工程(c)で選択した前記ペプチドライブラリーのメンバーと競合する、前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の前記ライブラリーをスクリーニングし；そして

(f) 工程(c)で選択したペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が工程(c)のペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定することを含む、前記方法。

30

【請求項52】

工程(b)または工程(e)の前記スクリーニングが、損なわれていないGタンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項51の方法。

【請求項53】

工程(b)または工程(e)の前記スクリーニングが、Gタンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項51の方法。

40

【請求項54】

工程(a)の前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドが、Gタンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項51の方法。

【請求項55】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約70アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項56】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約55アミノ酸である、請求項54の方法。

50

## 【請求項 57】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 8 ~ 約 50 アミノ酸である、請求項 54 の方法。

## 【請求項 58】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 9 ~ 約 23 アミノ酸である、請求項 54 の方法。

## 【請求項 59】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 11 アミノ酸である、請求項 54 の方法。

## 【請求項 60】

前記 G タンパク質サブユニットが G サブユニットである、請求項 54 の方法。

10

## 【請求項 61】

前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが G サブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項 54 の方法。

## 【請求項 62】

前記 G タンパク質サブユニットが G 二量体である、請求項 54 の方法。

## 【請求項 63】

工程 (b) の前記スクリーニングが競合結合アッセイを含む、請求項 51 の方法。

## 【請求項 64】

前記競合結合アッセイが、前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと、前記ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられる、請求項 63 の方法。

20

## 【請求項 65】

前記ペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能である、請求項 51 の方法。

## 【請求項 66】

前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求項 51 の方法。

## 【請求項 67】

請求項 66 の方法であって、前記酵素連結免疫吸着アッセイが：

(a) 前記 G タンパク質共役型受容体を固体支持体上に固定し；

(b) タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーを提供し；

30

(c) 前記 G タンパク質共役型受容体に対して、少なくとも前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと同程度に高い結合親和性を有するタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーが、前記の固定された G タンパク質共役型受容体に結合する条件下で、前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーと、前記の固定された G タンパク質共役型受容体を、前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドの存在下でインキュベーションし；

(d) 前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーの未結合メンバーを取り除き；

(e) 前記の結合したタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーと、前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーのタンパク質部分を特異的に認識する抗体を、前記抗体が前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーに特異的に結合する条件下で、インキュベーションし；

40

(f) 未結合抗体を取り除き；そして

(g) 前記の結合した抗体を検出する

工程を含む、前記方法。

## 【請求項 68】

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーであり、そして前記抗体が抗マルトース結合タンパク質抗体である、請求項 67 の方法。

50

## 【請求項 69】

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と前記シグナル伝達増進剤の相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 51 の方法。

## 【請求項 70】

前記ペプチドライブラリーがコンビナトリアル・ペプチドライブラリーである、請求項 51 の方法。

## 【請求項 71】

前記コンビナトリアル・ペプチドライブラリーがタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 70 の方法。

10

## 【請求項 72】

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 71 の方法。

## 【請求項 73】

前記ペプチドライブラリーがペプチドディスプレイライブラリーである、請求項 51 の方法。

## 【請求項 74】

工程 (d) の候補化合物の前記ライブラリーが、工程 (c) で選択された化合物の構造に基づく、候補化合物の集中的ライブラリーである、請求項 51 の方法。

## 【請求項 75】

候補化合物の前記ライブラリーがペプチドライブラリーである、請求項 51 の方法。

20

## 【請求項 76】

候補化合物の前記ライブラリーが小分子ライブラリーである、請求項 51 の方法。

## 【請求項 77】

請求項 51 記載の方法によって同定される化合物。

## 【請求項 78】

請求項 67 記載の方法によって同定される化合物。

## 【請求項 79】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療する方法であって、請求項 48 記載の化合物を投与することを含む、前記方法。

30

## 【請求項 80】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療する方法であって、請求項 78 記載の化合物を投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 81】

G タンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって：

(a) 前記 G タンパク質共役型受容体と、請求項 78 の化合物を、結合が生じ、そして前記 G タンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；

(b) G タンパク質共役型受容体 - 化合物結合対を共結晶させ；

(c) 前記共結晶結合対を X 線結晶学に供し；そして

(d) 前記共結晶結合対の三次元構造を決定する、ここで前記 G タンパク質共役型受容体の原子座標が得られることを含む、前記方法。

40

## 【請求項 82】

G タンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって：

(a) 前記 G タンパク質共役型受容体と、請求項 78 の化合物を、結合が生じ、そして前記 G タンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；

(b) 前記結合対を核磁気共鳴研究に供し；そして

(c) 前記結合対の三次元構造を決定する、ここで前記 G タンパク質共役型受容体の原子座標が得られることを含む、前記方法。

50

## 【請求項 8 3】

Gタンパク質共役型受容体結合パートナーを単離する方法であって：

- (a) 請求項 7 8 の結合化合物を含む固体支持体を提供し；
- (b) 候補 Gタンパク質共役型受容体結合パートナー化合物のライブラリーを提供し；
- (c) 候補化合物の前記ライブラリーと、前記固体支持体を、前記化合物への前記候補化合物の結合が生じる条件下で接触させ；
- (d) 未結合候補化合物および非特異的に結合した候補化合物を前記固体支持体から溶出し；そして
- (e) 前記固体支持体から、結合した候補化合物を回収することを、前記方法。

10

## 【請求項 8 4】

Gタンパク質共役型受容体の活性化を修飾する小分子を設計する方法であって：

- (a) 請求項 8 1 の方法にしたがって、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定し；そして
- (b) 前記原子座標に基づくコンピュータモデリングによって候補構造を設計する、ここで前記候補構造は、前記 Gタンパク質共役型受容体に結合すると予測されることを含む、前記方法。

## 【請求項 8 5】

Gタンパク質共役型受容体の活性化を修飾する小分子を設計する方法であって：

- (a) 請求項 8 2 の方法にしたがって、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定し；そして
- (b) 前記原子座標に基づくコンピュータモデリングによって候補構造を設計する、ここで前記候補構造は、前記 Gタンパク質共役型受容体に結合すると予測されることを含む、前記方法。

20

## 【請求項 8 6】

請求項 7 7 のペプチドをコードする DNA を含む核酸であって、前記 DNA が異種転写制御配列に機能可能であるように連結されている、前記核酸。

## 【請求項 8 7】

請求項 8 6 の核酸を含む発現ベクター。

## 【請求項 8 8】

請求項 8 7 の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

30

## 【請求項 8 9】

請求項 4 8 のペプチドを特異的に認識する抗体。

## 【請求項 9 0】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される、請求項 8 9 の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

[0001] 本出願は、先の同時係属仮出願第 60 / 275, 472 号、2001 年 3 月 14 日出願に優先権を請求する、先の同時係属出願第 09 / 852, 910 号、2001 年 5 月 11 日出願の一部係属出願である。

40

## 【0002】

## 発明の背景

## 1. 技術分野

[0002] 本発明は、一般的に、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の活性を調節する分野、並びに直接アゴニスト、間接的アゴニスト、完全アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストおよびアロステリック・アゴニストを含む、Gタンパク質共役型受容体アンタゴニストおよびアゴニスト化合物を同定し、そして調製する分野に関する。本発明はまた、GPCR に結合して、GPCR の特定のコンホメーションを安定化する化合物も

50

含む。これらの化合物は、薬剤を発見する目的でリード化合物として、あるいはX線結晶学またはNMRなどの方法によって、特定のコンホメーションのGPCR三次元構造を研究するために、役立つことも可能である。本発明はまた、GPCRに結合し、そしてGPCRが同族(cognate)タンパク質(単数または複数)に接触する方式に影響を及ぼすことによって、GPCRの機能を調節することも可能な小分子を、ハイスループット・スクリーニングを用いて同定するアプローチにも関する。GPCR調節剤を同定する第一の工程として、GPCRタンパク質を模倣するかまたはGPCRタンパク質に拮抗し、そして研究中の特定の受容体に高親和性で結合する、ペプチド類似体(analog)を同定する。次いで、これらのペプチドを特異性に関して試験する。最も特異的なペプチドを競合アッセイで用いて、例えば、(1)高親和性ペプチドの結合を増加させる(「スーパー・アゴニスト」)ことが可能であるか、または(2)おそらくGPCRでの結合に関して競合することによって、高親和性ペプチドの結合を減少させる(「アンタゴニスト」)ことが可能である、小分子または他のペプチドに関してスクリーニングする。

10

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### 2. 背景技術の説明

[0003] 多数の化学的メッセンジャーが、GPCR共役型受容体(GPCR)に結合することによって、細胞に対して効果を発揮する。GPCRには、広い範囲の生物学的活性受容体、例えばホルモン受容体、ウイルス受容体、増殖因子受容体、ケモカイン受容体、センサー受容体および神経受容体が含まれる。これらの受容体は、GPCR上の細胞外結合部位にリガンドが結合することによって活性化され、そして多様なGPCRタンパク質を通じて作用を仲介する。受容体およびGPCRタンパク質間に生じる分子相互作用は、特定の細胞性反応への環境シグナルの伝達の基礎である。

20

#### 【0004】

[0004] GPCR共役型受容体は、膜の細胞内側に、GPCR結合ドメインを形成する、7つの膜貫通らせんを有する。リガンド結合によって受容体が活性化され、これによって受容体のコンホメーションが変化して、受容体の細胞内側のGPCR結合部位が暴露されることが、実験によって示唆されている。細胞外環境から細胞内環境へのシグナルの伝達には、ヘテロ三量体GPCRタンパク質の作用が必要である。受容体およびGPCRタンパク質間に生じる分子相互作用は、環境シグナルを特定の細胞性反応へと伝達する基礎である。ヘテロ三量体GPCRタンパク質は、多部位様式でGPCRと相互作用し、接触の主要部位はGサブユニットのカルボキシル末端であると考えられている。Hammar, Science 241: 832-835, 1998; OsawaおよびWeiss, J. Biol. Chem. 270: 31052-31058, 1995; Garciaら, EMBO J. 14: 4460-4469, 1995; Sullivanら, J. Biol. Chem. 269: 21519-21525, 1994; Westら, J. Biol. Chem. 260: 14428-14430, 1985。

30

#### 【0005】

[0005] 不活性状態では、GPCRタンパク質は、1つのサブユニット、1つのサブユニットおよび1つのサブユニット、並びに結合したデオキシグアノシン二リン酸(GDP)からなるヘテロ三量体である。リガンドが結合すると、GPCRは活性化される。活性化された受容体のコンホメーションが変化することで、GPCRタンパク質の活性化が導かれ、続いてGDPに対するGの親和性が減少し、GDPが解離して、そしてGTPに置換される。GTPが結合すると、Gは活性コンホメーションを採り、受容体から解離し、そして下流エフェクターを活性化する。GPCRタンパク質自体に触媒されてGTPがGDPに加水分解されると、GPCRタンパク質は基底不活性型に戻る。したがって、GPCRタンパク質は、受容体からエフェクターにシグナルを中継する中間体として、そしてまたシグナルの期間を調節する時計として、両方の二重の役割を果たす。多様な研究によって、受容体-GPCRタンパク質相互作用および選択性を仲介する際に、GPCRタンパク質サブユニットのカルボキシル末端が関連すると見なされてきている。

40

50

## 【0006】

[0006]カルボキシル末端の11アミノ酸が、受容体相互作用に、そしてこの相互作用の特異性に、最も重要である。Martinら, *J. Biol. Chem.* 271: 361-366, 1996; Kostenisら, *Biochemistry* 36: 1487-1495, 1997。しかし、G<sub>t</sub>上の他の領域もまた受容体接触に關与する。G<sub>t</sub>二量体の部分もまた、GPCR結合に關連すると見なされてきている。Onrustら, *Science* 275: 381-384, 1997; Lichtargeら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7507-7611, 1996; MazzoniおよびHamm, *J. Biol. Chem.* 271: 30034-30040, 1996; Baeら, *J. Biol. Chem.* 272: 32071-32077, 1997を参照されたい。Gタンパク質のカルボキシル末端アミノ酸領域(およびヘテロ三量体Gタンパク質の他のGPCR結合領域)は、受容体が仲介するGタンパク質活性化の分子的基礎を提供するだけでなく、受容体活性化の忠実度を決定する際にも重要な役割を果たす。Conklinら, *Nature* 363: 274-276, 1993; Conklinら, *Mol. Pharmacol.* 50: 885-890, 1996。

## 【0007】

[0007]活性化GPCR(R<sup>\*</sup>)との相互作用において、G<sub>t</sub>のカルボキシル末端11アミノ酸(アミノ酸340~350)が關与していることが多くの研究から示唆されており、これには、(a)百日咳毒素がCys0347のADP-リボシル化を触媒し、これがR<sup>\*</sup>からG<sub>t</sub>を脱共役するという発見; (b)G<sub>t</sub>のアミノ酸340~350に対応するペプチドが、G<sub>t</sub>からR<sup>\*</sup>を脱共役することも可能であり、そしてそれ自体、R<sup>\*</sup>に結合し、そしてG<sub>t</sub>の効果を模倣することも可能であるという発見; (c)部位特異的突然変異誘発; および(d)R<sup>\*</sup>との相互作用の際、特定の受容体への共役の特異性が、そのカルボキシル末端にあることの、關連Gタンパク質における立証が含まれる。

## 【0008】

[0008]Gタンパク質は、リガンド結合シグナルに対する細胞性反応の特異性および時間的特性を決定する際に、重要で、そして複雑な役割を果たす。HammおよびGilchrist, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 189-196, 1996。多数の受容体が、単一のGタンパク質サブタイプを活性化させることも可能であり、そしていくつかの場合、単一の受容体が1より多いGタンパク質を活性化させ、それによって多数の細胞内シグナルを仲介することも可能である。しかし、他の場合では、Gタンパク質と受容体の相互作用は、非常に選択的な方式で制御され、特定のヘテロ三量体のみが結合する。

## 【0009】

[0009]認識部位は、活性化分子が結合する、受容体上の正確な分子領域である。アゴニストは、受容体と相互作用し、そして生理学的反応を開始することも可能な内因性物質または薬剤である。薬剤は、内因性アゴニスト(すなわちホルモンまたは神経伝達物質)と同じ部位で、また異なる部位で相互作用することも可能である。隣接部位または異なる部位に結合するアゴニストは、アロステリック・アゴニストと称される。アロステリック結合部位に結合した結果、正常リガンドとの相互作用は、増進するかまたは減少することも可能である。アロステリック調節剤が受容体に誘導するコンホメーション変化は、古典的リガンドの結合ドメインだけでなく、受容体およびGタンパク質間の相互作用に關与するドメインにも影響する。

## 【0010】

[00010]視覚的系は、Gタンパク質シグナルが重要である系の一例である。網膜の桿体細胞は、光受容体の95%を占め、そして光に非常に感受性である。桿体は、夜間または非常に薄暗い照明下での視覚を可能にする。桿体の視覚タンパク質ロドプシンは、桿体外節(ROS)の円盤膜に存在する。ロドプシンは原型的なGPCRである。HelmerichおよびHofmann, *Biochim. Biophys. Acta* 1286: 285-322, 1996; Menonら, *Physiol. Rev.* 81: 16

59, 2001; Tellerら, *Biochemistry* 40:7761, 2001。ロドプシンは、リガンドに活性化されないため、GPCRの中ではユニークである。

【0011】

[00011] 夜間の視覚は、生物が、薄暗い光の強度のわずかな相違を区別し、そして暗順応した際は、光のわずかな変化を検出する能力に関連する。ある人々は、目が完全に暗順応した際でも、夜間に見ることが、一貫して困難であると訴えている。こうした人々は、他の人々には容易に見える物体を検出できず、そして比較的明るい光源に短時間曝露されると、混乱し、そしてまた回復の遅れも示す。薄暗い照明空間での操縦および夜間の運転または飛行は、これらの個体に深刻な問題を提示する。さらに、ある個体は、夜盲症または真の夜盲を有し、これは、網膜感度測定に基づいて診断される。

10

【0012】

[00012] 全人口中の夜盲症発生率に関する明確なデータは入手可能でなく、これは、全人口の代表的サンプルに対して、測定が行われたことがないためである。選択群（例えば学童、軍人）の研究によって、正常集団には、ある割合で、視覚感度が低く、疾患または変性過程に関連する夜盲症を患う多くの個体と同程度に能力が劣るか、またはそうした個体より劣る個体が含まれることが示されている。例えば海軍軍人の約2パーセントは、これに基づく「夜盲」として、夜の職務に不適格とされていた。これはまた、加齢の疾患でもある。一般集団が高齢化するにつれ、夜盲の発生率が増加する。夜盲はまた：

(1) 網膜色素変性症（疾患の初期段階では、暗順応が起こるものの、その速度が遅延する。疾患が進行するにつれて、桿体機能が次第に失われ、そして絶対刺激頂 (absolute terminal threshold) が上昇する。100,000を超えるアメリカ人が網膜色素変性症を有し、そして網膜色素変性症の人々は大部分、40歳までに盲目になる。Farrarら, *EMBO J.* 21(5):857-864, 2002)；

20

(2) 緑内障（緑内障では、初期には桿体感度が低下し、そして該感度が進行性に損なわれることが観察される。Cursiefenら, *Doc. Ophthalmol.* 103(1):1-12, 2001。緑内障は、米国における盲目の主要原因の1つであり、そして米国において最も迅速に増加しつつある群の1つである60歳を超える個体においては、盲目の最も一般的な原因の1つである)；

(3) LASIK（最近の研究によって、LASIK手術を受けた患者のかなりの数 (30~60%) が、夜間視覚試験に落第することが示されている。Millerら, *CLAO J.* 27:84-88, 2001; Brunetteら, *Ophthalmology* 107:1790-1796, 2000)；

30

(4) 薬剤の副作用（メチルテストステロン、キニジネシス、パラメタジオンおよびトリメタジオン（抗痙攣剤）、クエストラン（コレステロール低下剤）、アキュタン（抗にきび剤）、ヒドロキシクロロキン（抗マラリア剤）、ビデックス（HIV）、およびネファゾドン（抗うつ剤）を含む、いくつかの薬物が夜盲を引き起こしうる）

を含むいくつかの疾患でも観察されている。したがって、夜盲に対する薬剤アプローチの有用性は明らかである。集団が高齢化するにつれて、影響を受ける個体の数は増加するであろう。

40

【0013】

[00013] ヒト食餌ビタミンA欠損は、夜盲を引き起こす可能性もあり、そしてこれをビタミンA補充によって逆転させることも可能である。しかし、網膜色素変性症 (RP)、白内障、糖尿病網膜症、および緑内障などの視覚疾患に関連する夜盲は、ビタミンA補充によって幾分押さえられる程度であり、こうした補充は疾患の経過を変化させない。網膜変性および視覚損失を引き起こす突然変異の多くは、光受容体カスケードタンパク質をコードする遺伝子中にあり；他の突然変異は、光受容体構造タンパク質をコードする遺伝子中にある。PangおよびLam, *Hum. Mutat.* 19:189, 2002。ロドプシン、PDE、またはGt中の突然変異が、異なる型の先天性定常夜盲で同定されてきている。Pepe, *Prog. Retin. Eye Res.* 20:733-

50

759, 2001。定常夜盲は、網膜変性には関連せず、そして暗所中では見る能力がないことに明示され；日中の視覚は、ほとんど影響を受けない。先天性定常夜盲(CSNB)は、桿体系の異常な機能に主に特徴付けられる、非進行性網膜障害の群を指す。同一突然変異を持つファミリーメンバー間であっても、臨床的不均一性があることから、遺伝的または環境的いずれかの修飾因子が、疾患の重症度に影響を及ぼす可能性が提起される。Gottlob, Curr. Opin. Ophthalmol. 12: 378-383, 2001。

#### 【0014】

[00014] ロドプシン、G<sub>t</sub>、またはPDEの欠損から生じる夜盲において、桿体光受容体は、正常よりはるかに明るい光強度にのみ反応し、そして光に対する桿体の感度は、暗順応していない正常個体のものと同様である。白色点状眼底および小口病では、桿体光受容体は、薄暗い光に対して正常感度を達成することが可能であるが、正常個体において、ほぼ0.5時間で達成されるのに比較して、2時間以上の暗順応を必要とする。Dryja, Am. J. Ophthalmol. 130: 547, 2000。これらの定常夜盲の型各々で、劣った桿体感度および暗順応の時間経過は、同定される遺伝子欠損に引き起こされることが知られるか、または引き起こされると仮定される生理学的異常と相関する。ロドプシンが光伝達カスケードを活性化する効力を増加させることは、夜盲に対する新規の薬理的アプローチになりうる。活性化されたロドプシンは、桿体視覚Gタンパク質、G<sub>t</sub>を活性化し、G<sub>t</sub>は視覚伝達カスケードを活性化する。ロドプシンの有効なシグナル伝達を薬理的に増加させると、人々が微光中で見て、そして機能する能力に有意に影響を与えうる。したがって、Gタンパク質共役型受容体がシグナル伝達する能力を増進させる小分子化合物を同定することが可能であれば、大きな利益になりうる。

#### 【0015】

[00015] Gタンパク質およびその受容体は、多数の異なる化学的リガンドに仲介される多数の細胞内シグナルに影響を及ぼすため、疾患病理を調節するかなりの潜在能力が存在する。多くの医学的に重要な生物学的プロセスは、Gタンパク質シグナル伝達経路およびその下流エフェクター分子に影響を受ける。Holler, Cell. Mol. Life Sci. 340: 1012-1020, 1999を参照されたい。Gタンパク質共役型受容体およびそのリガンドは、多くの薬剤製品のターゲットであり、そして熱心な薬剤発見努力の的である。過去15年間に渡って、GPCRをターゲットとするほぼ350の療法剤が市場に成功裡に導入されてきている。Gタンパク質が仲介するシグナル伝達系は偏在性の性質があり、そして非常に多数の病的状態に影響を及ぼすため、アゴニストおよびアンタゴニスト効果両方を含む、これらの系を調節する新規方法を見出すことが非常に望ましい。異なる効果を持つ、異なる個々のリガンドに反応した、GPCRの三次元コンホメーションの研究は、GPCRに対する特定の調節効果を与える特定の構造を持つ薬剤の検索および開発を補助するため、こうした研究を行う能力があることもまた、非常に望ましい。

#### 【0016】

[00016] 薬剤受容体理論は、質量作用の法則に基づき、そして親和性(既定のいずれかの時点で、薬剤が受容体を占有する見込み)、薬剤またはリガンド濃度が関与する複合体会合を表す、固有効力(intrinsic efficacy)(固有活性)、および受容体の活性化状態を含む。アゴニストとして分類される薬剤は、受容体と相互作用して、活性化された受容体の比率を改変し、こうして細胞活性を修飾する。慣用的なアゴニストは、活性化された受容体の比率を増加させ；逆アゴニストは比率を減少させる。直接アゴニストは受容体に作用し、一方、間接的アゴニストは、内因性アゴニスト(神経伝達物質自体)の作用を促進する。受容体活性化のアロステリック調節は、耐性の発展を回避する、新規アプローチである。

#### 【0017】

[00017] GPCRに影響を及ぼす、現在利用可能な薬剤の大部分は、Gタンパク質共役型受容体およびその細胞外リガンド(単数または複数)間の結合に拮抗することに

よって作用する。一方、受容体サブタイプ選択的薬剤は、得ることが困難であった。リガンド結合に干渉する薬剤を設計する、古典的アプローチへのさらなる障害は、プロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR) などのいくつかのGPCRに特有の、受容体を酵素的に切断し、そして束縛されたリガンドを生成する機構のため、こうしたGPCRには、慣用的なアンタゴニストが無効であることであった。他の場合では、受容体の固有活性または恒常的活性が、直接、病理を導き、したがって、リガンド結合の拮抗が非現実的である。これらの理由から、GPCR活性化およびシグナル伝達の結果を遮断する、別のターゲットが非常に望ましい。異なるアゴニスト、アンタゴニストまたは他のリガンドの影響下でのGPCRの構造的コンホメーションの理解が進むこともまた、GPCRに非常に特異的な効果を持つ化合物の設計を可能にする。

10

## 【0018】

[00018] 新規薬剤による阻害の別の潜在的なターゲットの1つは、形質膜内部の受容体-Gタンパク質界面であった。Konigら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6878-6882, 1989; Acharyaら, J. Biol. Chem. 272:6519-6524, 1997; Verrallら, J. Biol. Chem. 272:6898-6902, 1997。G<sub>s</sub>のカルボキシル末端およびGタンパク質ヘテロ三量体の他の領域は、受容体の細胞質表面の結合部位とぴったり合わさる。Sondekら, Nature 379:311-319, 1996; Sondekら, Nature 379:369-374, 1996; Wallら, Science 269:1405-1412, 1996; Mixonら, Science 270:954-960, 1995; Lambrightら, Nature 369:621-628, 1994; Lambrightら, Nature 379:311-319, 1996; Sondekら, Nature 379:369-374, 1996; Wallら, Science 269:1405-1412, 1996; Mixonら, Science 270:954-960, 1995。これらの結合領域に対応するか、またはこれらの領域を模倣するペプチドは、受容体シグナル伝達を遮断するか、または受容体の活性アゴニスト結合コンホメーションを安定化させることも可能である。Hammら, Science 241:832-835, 1988; Gilchristら, J. Biol. Chem. 273:14912-14919, 1998。

20

## 【0019】

[00019] 例えば、桿体光受容体であるロドプシンの場合、G<sub>s</sub> C末端ペプチド、G<sub>s</sub> 340~350は、受容体を活性メタロドプシンIIコンホメーションに安定化させる。Hammら, Science 241:832-835, 1988; OsawaおよびWeiss, J. Biol. Chem. 270:31052-31058, 1995。G<sub>s</sub>由来の2つのカルボキシル末端ペプチド(354~372および384~394)は、 $\alpha_2$ -アドレナリン作用性受容体への高親和性アゴニスト結合を誘発し、そしてこれらがG<sub>s</sub>およびアデニルシクラーゼを活性化させる能力を阻害するが、G<sub>i2</sub>由来の対応するペプチドにはこうした作用はない。Rasnickら, J. Biol. Chem. 269:21519-21525, 1994。したがって、G<sub>s</sub>のカルボキシル末端は、Gタンパク質反応の特異性を仲介するのに重要である。しかし、この現象をうまく利用する薬剤発見アプローチは、利用可能でない。Jonesら, Expert Opin. Ther. Patents 9(12):1641, 1999。

30

40

## 【0020】

[00020] 一般的に、GPCRは、活性化のため、アゴニスト結合を必要とする。しかし、いくつかの受容体では、アゴニストの非存在下であっても、基本的なシグナル伝達活性が生じる(恒常的活性)。さらに、受容体アミノ酸配列を修飾すると、リガンドを必要とせずに、活性状態コンホメーションを安定化することも可能である。恒常的(アゴニスト独立)シグナル伝達活性が、突然変異体および野生型(または天然)受容体両方に関して立証されてきている(TiberiおよびCaron, J. Biol. Chem. 269:27925-27931, 1994; Hasegawaraら, J. Biol.

50

. Chem. 271: 1857 - 1860, 1996)。ヒトにおいて疾患を引き起こす、いくつかのGPCR、例えば甲状腺刺激ホルモン受容体 (Vassartら, Ann N.Y. Acad. Sci. 766: 23 - 30, 1995) は、アゴニスト独立活性を示すことが見出されてきている。逆アゴニストは、受容体に結合し、そしてこの活性を抑制する剤である。

#### 【0021】

[00021] 実験的に、いくつかの単一アミノ酸突然変異がアゴニスト独立活性を生じてきている。例えば、第三細胞質ループ中の単一の部位で突然変異された、 $\alpha$ 2および $\beta$ 2アドレナリン作用性受容体は、恒常的活性を示す。Renら, J. Biol. Chem. 268: 16483 - 16487, 1993; Samamaら, Mol. Pharmacol. 45: 390 - 394, 1994。いくつかの場合、GPCRのカルボキシル・テールまたは細胞内ループが大きく欠失した突然変異が生じると、恒常的活性が導かれている。例えば、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体におけるカルボキシル末端の一部切除 (truncation) 欠失、またはトロンピン受容体の第二細胞外ループにおける、より小さい欠失は、受容体を恒常的に活性にする。Nussenzveigら, J. Biol. Chem. 268: 2389 - 2392, 1993; Matus-Leibovitchら, J. Biol. Chem. 270: 1041 - 1047, 1995; Nanevyczら, J. Biol. Chem. 270: 21619 - 21625, 1995。

10

#### 【0022】

[00022] これらの発見は、伝統的な受容体理論の修飾を導いた。Samamaら, J. Biol. Chem. 268: 4625 - 4636, 1993。現在、受容体は少なくとも2つのコンホメーション、不活性コンホメーション (R) および活性化されたコンホメーション ( $R^*$ ) で存在することが可能であり、そしてこれらの2つの状態間で平衡が存在し、大部分の受容体では $R^*$  よりRが顕著に好まれると考えられている。いくつかの受容体 (天然および突然変異体) では、アゴニストの非存在下で、シグナル伝達を開始するのに十分な数の受容体が活性 $R^*$  状態にあることを可能にする、平衡シフトが存在することが提唱されてきている。したがって、化学的または物理的外部刺激に反応して、GPCRはコンホメーション変化を経て、ヘテロ三量体Gタンパク質の活性化を導き、該Gタンパク質が細胞内シグナル伝達事象を開始する。

20

30

#### 【0023】

[00023] いくつかの研究によって、多くのGPCRが、多数のコンホメーション状態で存在することと一致する特性を示すことが示唆されている。ロドプシンでは、多数の配座異性体が存在することが、吸光度変化から明らかである。Sakmar, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59: 1 - 34, 1998。中間体コンホメーションを通じた遷移によって、活性化が生じ、これらの型の間の平衡によって、特徴的なpH感受性が示される。ArmisおよびHoffman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7849 - 7853, 1993; VogelおよびSiebert, Biochemistry 41: 3529 - 3535, 2002を参照されたい。薬理学的研究によって、別個の受容体配座異性体が存在することが、機能的な重要性を有していることが示唆されている。ベータ・アドレナリン作用性受容体およびGタンパク質の融合タンパク質の研究によって、部分アゴニストは、完全アゴニストによって安定化されるものとは別個のコンホメーション状態を安定化することが示唆されている。Seifertら, J. Pharmacol. Exp. Ther. 297: 1218 - 1226, 2001。

40

#### 【0024】

[00024] いくつかの受容体において、同一受容体に作用する異なるアゴニストが、「シグナル輸送」と呼ばれる現象である、下流経路の相対的活性化を導きうるという観察によってもまた、多数の活性受容体配座異性体集団が存在することが示唆される。Kenakin, Trends Pharmacol. Sci. 16: 232 - 238, 1995

50

95; Bergら, Mol. Pharmacol. 54: 94-104, 1998; Cordeauxら, J. Biol. Chem. 276: 28667-28675, 2001; Marieら, J. Biol. Chem. 276: 41100-41111, 2001。蛍光研究によってもまた、機能的に別個のアゴニストと複合体形成した際、異なる受容体コンホメーション集団が存在することが示唆されている。Ghanouniら, J. Biol. Chem. 276: 24433-24436, 2001。いくつかのGPCRにおいて、別個で、機能的に関連する配座異性体が存在することに関して、この裏づけが増えてきていることから、これらの受容体では、分子活性化機構が多数のコンホメーション間のスイッチングの手段を提供しているに違いないことが示唆される。結晶法およびNMRなどの方法によって、これらの配座異性体を研究する方法は、特定の配座異性体を調節するかまたは安定化させることも可能な化合物を発見するプロセスにおいて、非常に有用であろう。

10

## 【0025】

[00025] 制御現象に關与するタンパク質-タンパク質相互作用は、可逆性であり、そしてタンパク質表面のわずかな部分のみが關与する傾向にある。一般的に、目的のタンパク質-タンパク質相互作用を遮断するペプチドを同定するため、天然相互作用タンパク質の1つのセクションを模倣することを試みて、特定のペプチドを合成するか、またはスクリーニング後にランダムペプチドライブラリーから活性配列を選択する。ペプチドは、アミノ酸配列で構成されるが、配列中に直鎖でコードされるDNAの認識とは異なり、ペプチド結合は三次元構造に依存する。

20

## 【0026】

[00026] 視覚色素、ロドプシンは、Gタンパク質受容体ファミリーの最も広範に研究されているメンバーである。最近、結晶ウシ・ロドプシンのX線構造が解像度2.8で決定された。これによって、原型的なGPCRの構造-機能関係を分子レベルで理解する新たな道が開けた。ロドプシンは、円盤膜タンパク質の90%以上を構成するため、円盤膜タンパク質に行う測定は、大部分は、天然環境下のロドプシンの特性を反映する。ロドプシンは、アポタンパク質オプシンおよび発色団11-シス・レチナールからなる。オプシンは348アミノ酸からなり、約40kDaの分子量を有し、そして多様な長さの7つの膜貫通らせんおよび1つの短い細胞質らせんに折りたたまれる。レチニリデン発色団(ビタミンA1のアルデヒド)は、プロトン化シッフ塩基を介してらせん7のLys-296に共有結合され、そして受容体を不活性コンホメーションに維持する。

30

## 【0027】

[00027] 光を吸収すると、発色団が迅速に11-シスから全トランスに異性化し、これがオプシン部分の一連のコンホメーション変化を誘導する。この反応は、高い効率(量子収率0.67)で起こり、そして主な光産物、フォトロドプシンが非常に短時間で(200fs)形成される。続いて、フォトロドプシンは、数ピコ秒以内に熱的に弛緩して、歪んだ全トランス立体配置、バソロドプシンになる。ナノ秒の時間スケールで、バソロドプシンは青色シフト中間体と平衡を確立し、その後、混合物は崩壊してルミロドプシンを形成する。次いで、ルミロドプシンはメタロドプシンIに変換され、そして続いて、Gタンパク質共役のための活性コンホメーションであるメタロドプシンIIに変換される。したがって、ロドプシンには、タンパク質の特定のアミノ酸のプロトン化によって調節される、2つのコンホメーション・スイッチがある: 不活性メタI状態から活性メタII状態への遷移、および結合したレチナールの非存在下での、オプシンの不活性状態から活性状態への遷移である。現在のモデルによれば、受容体は、タンパク質の荷電基間の静電相互作用によって不活性コンホメーションに維持され、これは活性状態コンホメーションへの遷移に伴うプロトン取り込みによって無効にされる。

40

## 【0028】

[00028] 活性受容体種メタIIは、シッフ塩基の加水分解および受容体の解離によって、数分以内にアポタンパク質オプシンおよびレチナールへとゆっくりと崩壊する。研究者らは、オプシンが活性状態および不活性状態のpH依存性コンホメーション平衡に

50

あることを示した。中性 pH でのメタ I I の崩壊中、メタ I I 形成の構造変化の大部分は逆転し、そして崩壊産物オプシンは、最終的に、メタ I I のものと類似の活性コンホメーションを採る。

#### 【0029】

[00029] GPCR 活性化プロセスでは4つの別個の工程が観察可能である：(1)光子またはリガンド結合によるシグナルの生成；(2)膜を通じたシグナル伝達；(3)Gタンパク質との相互作用；および(4)二次メッセンジャーの活性化。各期で起こるプロセスの種類は明らかに異なるが、これらは別個で、そして独立しているというわけではない。例えば、リガンド結合およびGタンパク質結合間のアロステリック効果が、いくつかのGPCRに関して観察されるとともに、アゴニストおよびアンタゴニスト結合の陽イオン依存性アロステリック制御が観察されている。Wessling-Resnick および Johnson, J. Biol. Chem. 262: 12444 - 12447, 1987; Hepler および Gilman, Trends Biol. Sci. 17: 383 - 387, 1992; Nunnariら, J. Biol. Chem. 262: 12387 - 12392, 1987; Neve, Mol. Pharmacol., 39: 570 - 578, 1991; Neveら, Mol. Pharmacol. 39: 733 - 739, 1991。

10

#### 【0030】

[00030]いくつかの細胞質タンパク質は、もっぱら光活性化型ロドプシン ( $R^*$ ) と相互作用する。結晶構造によって、不活性型のロドプシンは細胞質タンパク質とは有意に相互作用しないことが示されているため、この構造は、 $R^*$  状態に関する間接的な情報のみを提供することが可能である。さらに、不活性ロドプシン構造の細胞質表面ドメインの2つの領域(アミノ酸残基236~239および328~333)は、結晶構造解析によって、完全には解明されていない。したがって、特定の配座異性体を安定化させうるツールは、ロドプシンなどのGPCRの構造を研究するのに有用であろう。

20

#### 【0031】

[00031]薬剤が、恒常的活性を示す受容体に結合し、そしてその活性を減少させると、負の拮抗作用が立証される。負のアンタゴニストは、受容体を不活性状態に束縛することによって作用するようである。Samamaら, Mol. Pharmacol. 45: 390 - 394, 1994。他の受容体系で最初に記載されたが、負の拮抗作用は、オピオイド、 $\alpha_2$ -アドレナリン作用性、セロトニン2C型、ブラジキニン、およびD1Bドーパミン受容体などのGPCRでも起こることが示されている。Schutz および Freissmuth, J. Biol. Chem. 267: 8200 - 8206, 1992; Costa および Herz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7321 - 7325, 1989; Costaら, Mol. Pharmacol. 41: 549 - 560, 1992; Samamaら, Mol. Pharmacol. 45: 390 - 394, 1994; Peiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2699 - 2702, 1994; Chidiacら, Mol. Pharmacol. 45: 490 - 499, 1994; Barkerら, J. Biol. Chem. 269: 11687 - 11690, 1994; Leeb-Lundbergら, J. Biol. Chem. 269: 25970 - 25973, 1994; Tiberi および Caron, J. Biol. Chem. 269: 27925 - 27931, 1994。

30

40

#### 【0032】

[00032]言及されているように、恒常的活性型受容体の概念は、病理生理学的状態を説明する洞察を提供する。例えば、高血圧などの疾患プロセスにおいて、恒常的活性型受容体は、交感神経系の影響下にはもはやない可能性もある。高血圧では、恒常的活性型GPCRが、脳、腎臓または末梢血管を含む、多数の領域で発現されている可能性もある。新規に認識された種類の薬剤(負のアンタゴニストまたは逆アンタゴニスト)は、望ましくない恒常的活性を減少させ、重要な新規療法剤として作用することも可能である。したがって、天然および突然変異GPCR両方の負のアンタゴニストを同定する(または

50

負のアンタゴニスト化合物の結合が引き起こす、GPCRにおけるコンホメーション変化を理解し、そして安定化させる)技術は、重要で、予測可能であるとともに、いまだに実現されていない薬剤適用を有する。さらに、少なくともいくつかの恒常的に活性であるGPCRは腫瘍原性であるため、これらのGPCRの負のアンタゴニストを同定すると、抗腫瘍薬剤および/または抗細胞増殖薬剤の開発につながりうる。

#### 【0033】

[00033] G<sub>t</sub>のカルボキシル末端領域の突然変異誘発研究によって、この結合領域において、ロドプシンによるG<sub>t</sub>活性化に必須の、いくつかの特定のアミノ酸残基が同定されてきている。Martinら, *J. Biol. Chem.* 271: 361-6, 1996。G<sub>q</sub>由来の3~5のカルボキシル末端アミノ酸を、G<sub>i</sub>由来の対応する残基で置換すると、もっぱらG<sub>i</sub>サブユニットを通じてシグナルを伝達して、キメラサブユニットを活性化し、そしてG<sub>q</sub>エフェクターであるホスホリパーゼCを刺激する受容体となった。Conklinら, *Nature* 363: 274-276, 1993; Conklinら, *Mol. Pharmacol.* 50: 885-890, 1996。これらの研究はすべて、G<sub>t</sub>カルボキシルペプチド配列が、個々のGタンパク質のシグナル伝達反応の特異性に関与することを示唆する。16のユニークなG<sub>t</sub>サブユニット(G<sub>i1</sub>、G<sub>i2</sub>、G<sub>i3</sub>、G<sub>O1</sub>、G<sub>O2</sub>、G<sub>Z</sub>、G<sub>t</sub>、G<sub>q</sub>、G<sub>11</sub>、G<sub>14</sub>、G<sub>s</sub>、G<sub>12</sub>、G<sub>13</sub>、G<sub>15/16</sub>、G<sub>OLF</sub>およびG<sub>gust</sub>)が存在し、これらサブユニットが、数百がクローニングされている、異なるGPCRとの特異的相互作用を仲介すると考えられている。したがって、GPCRに結合するGタンパク質領域に対応するペプチドを、受容体-Gタンパク質相互作用の競合阻害剤として使用することも可能である。Hammら, *Science* 241: 832-835, 1988; Gilchristら, *J. Biol. Chem.* 273: 14912-14919, 1998。しかし、この機会を利用する薬剤発見アプローチは、利用可能ではない。Jonesら, *Expert Opin. Ther. Patents* 9(12): 1641-1654, 1999。

10

20

#### 【0034】

[00034]例えば、最新のハイスループット・スクリーニングアッセイで使用するための潜在的なリード化合物の同定、および受容体分子の望ましい三次元コンホメーションに関する情報を用いた新規化合物のコンピュータによる設計は、最新の薬剤発見プロセスの重要な側面である。この種の方法を用いた際に直面される主な困難の1つは、潜在的な候補分子の非常に巨大なコンビナトリアル・ライブラリーから、有用な結合化合物を同定するのが困難であることである。文字通り、数十万の化合物をスクリーニングする際、結合、調節活性またはコンホメーション安定化に関して陽性である(偽陽性を含む)化合物を性質決定するのは、高価であり、そして時間がかかるプロセスである。したがって、ハイスループット・スクリーニングのための強力なそして有用なリード化合物、および三次元コンホメーション研究に有用な結合パートナーを同定することが可能であり、そしてスクリーニングプロセスにおける偽陽性の数を減少させる方法が、非常に望ましいであろう。

30

#### 【発明の開示】

40

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0035】

##### 発明の概要

[00035]したがって、本発明は、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチドを同定する方法であって、天然Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し;該Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、該ペプチドライブラリーをスクリーニングし;そして天然ペプチドより高い親和性で該Gタンパク質共役型受容体に結合する、該ペプチドライブラリーのメンバーを選択することを含む、前記方法を提供する。スクリーニングは、損なわれていない(intact)Gタンパク質共役型受容体への結合に関して、またはGタンパク質共役型受容体の少なくと

50

も細胞内断片への結合に関して試験することによって行われることも可能である。

【0036】

【0036】Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドは、Gタンパク質サブユニット、あるいは、例えば長さ約7～約70アミノ酸、または長さ約7～約55アミノ酸、または長さ約8～約50アミノ酸、または長さ約9～約23アミノ酸、そして最も好ましくは長さ約11アミノ酸である、その断片であることも可能である。Gタンパク質サブユニット断片は、好ましくはGサブユニットまたはGサブユニット・カルボキシル末端ペプチドであるが、別にG二量体であることも可能である。

【0037】

【0037】スクリーニングは競合結合アッセイを含むことも可能であり、これは好ましくは、Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドと、ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられ、例えばペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能であり、そして/またはGタンパク質共役型受容体への結合が、Gタンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、酵素連結免疫吸着アッセイにおけるものがある。

10

【0038】

【0038】ペプチドライブラリーは、好ましくはコンビナトリアル・ペプチドライブラリーまたはタンパク質-ペプチド融合タンパク質ライブラリーであり、例えばペプチドディスプレイライブラリーまたはマルトース結合タンパク質-ペプチド融合タンパク質ライブラリーである。

20

【0039】

【0039】別の態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって、該Gタンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し；高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドを提供し；該高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドと競合する、該Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の該ライブラリーをスクリーニングし；そして該高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で該Gタンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の該ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が該高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の該ライブラリーのメンバーを同定することを含む、前記方法もまた、提供する。スクリーニングは、損なわれていないGタンパク質共役型受容体への結合に関して、またはGタンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われることも可能である。

30

【0040】

【0040】Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドは、Gタンパク質サブユニット、あるいは、例えば長さ約7～約70アミノ酸、または長さ約7～約55アミノ酸、または長さ約8～約50アミノ酸、または長さ約9～約23アミノ酸、そして最も好ましくは長さ約11アミノ酸である、その断片であることも可能である。Gタンパク質サブユニット断片は、好ましくはGサブユニットまたはGサブユニット・カルボキシル末端ペプチドであるが、別にG二量体であることも可能である。

40

【0041】

【0041】スクリーニングは競合結合アッセイを含むことも可能であり、これは好ましくは、Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドと、ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられ、例えばペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能であり、そして/またはGタンパク質共役型受容体への結合が、Gタンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、酵素連結免疫吸着アッセイにおけるものがある。

【0042】

【0042】候補化合物のライブラリーは、好ましくは、高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドの構造に基づく、候補化合物の集中的(focused)ライブラ

50

リーである。候補化合物のライブラリーは、コンビナトリアル・ライブラリー、例えば薬剤様分子のコンビナトリアル・ライブラリー、またはそのメンバーが、例えば高親和性Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドの化学的構造に基づくことも可能な、集中的小分子ライブラリーであることも可能である。

【0043】

[00043]本発明は、上述の方法にしたがって同定される、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチドおよび化合物とともに、Gタンパク質共役型受容体を有する細胞において、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達を修飾する方法であって、こうした化合物を該細胞に投与することを含む、前記方法もまた提供する。やはり提供するの  
10  
は、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達を阻害する方法であって、該Gタンパク質共役型受容体が同族(cognate)Gタンパク質に結合するのに干渉する化合物と、該Gタンパク質共役型受容体を接触させることを含む、前記方法である。

【0044】

[00044]さらなる態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって、上述の方法の少なくとも1つにしたがって同定されたペプチドを提供し、ここで該ペプチドは検出可能なペプチドシグナルを提供するように標識されている；候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物のライブラリーを提供し；該ペプチドと該Gタンパク質共役型受容体を、該ペプチドが該Gタンパク質共役型受容体に結合する条件下で接触させ；未結合ペプチドを該Gタンパク質共役型受容体から取り除き；ペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性  
20  
を測定し、そして該検出可能ペプチドシグナルを測定し；候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物の該ライブラリーのメンバーと、ペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体を接触させ；ペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性を測定し、そして該検出可能ペプチドシグナルを測定し；該Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達活性が、該候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているか、そしてGタンパク質共役型受容体ペプチド結合が、該候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているかを決定し；そしてペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体との接触が、該Gタンパク質共役型受容体へのペプチド結合増加、およびGタンパク質共役型受容体シグナル伝達増加の両方を生じる化合物を同定し、ペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体との接触が、該Gタンパク質共役型受容体へのペプチド結合減少、およびGタンパク質共役型受容体シグナル伝達減少の両方を生じる化合物を同定し、そしてペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体との接触が、上述の方法  
30  
にしたがって同定されたペプチドの結合親和性増加を生じる化合物を同定することを含む、前記方法を提供する。ペプチドが結合した該Gタンパク質共役型受容体の該シグナル伝達活性を測定する方法は、イノシトールリン酸集積測定；細胞内Ca<sup>2+</sup>レベル測定；アデニルシクラーゼ活性測定；経内皮電気抵抗測定；ストレスファイバー形成測定；リガンド結合測定；受容体発現測定；受容体脱感作測定；キナーゼ活性測定；ホスファターゼ活性測定；核転写因子測定；遊走(走化性)すべての測定；スーパーオキシド形成測定；一酸化窒素形成測定；細胞脱顆粒測定；GIRK活性測定；アクチン重合測定；血管狭窄測定；細胞浸透性測定；アポトーシス測定；細胞分化測定；プロテインキナーゼCなどの、  
40  
GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の膜会合の測定；プロテインキナーゼCなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の細胞質ゾル集積の測定；およびRanなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の核会合の測定からなる群より選択されることも可能である。

【0045】

[00045]さらなる態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、13、15、17、21、23、25~27、30、32、34、36、38、40、45~85、94~111、125~150、160~164、175~178および183~264からなる群より選択される化合物を提供する。

【0046】

10

20

30

40

50

[ 0 0 0 4 6 ]さらなる態様において、本発明は、療法 G タンパク質共役型シグナル伝達修飾ペプチドを哺乳動物に提供する方法であって、該哺乳動物に、配列番号 2、4、6、8、10、12、13、15、17、21、23、25～27、30、32、34、36、38、40、45～85、94～111、125～150、160～164、175～178 および 183～264 からなる群より選択される化合物を発現する発現構築物を投与することを含む、前記方法を提供する。さらに、本発明は、過剰な G タンパク質共役型受容体シグナル伝達が原因因子である疾患状態を治療する方法であって、配列番号 2、4、6、8、10、12、13、15、17、21、23、25～27、30、32、34、36、38、40、45～85、94～111、125～150、160～164、175～178 および 183～264 からなる群より選択される化合物を投与することを含む、前記方法を提供する。 10

【 0 0 4 7 】

[ 0 0 0 4 7 ]さらなる態様において、本発明は、G タンパク質共役型受容体シグナル伝達増進剤を同定する方法であって、天然 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し；該 G タンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、該ペプチドライブラリーをスクリーニングし；天然ペプチドより高い親和性で該 G タンパク質共役型受容体に結合する該ペプチドライブラリーメンバーを選択し；該 G タンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し；上で選択された該ペプチドライブラリーのメンバーと競合する、該 G タンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の該ライブラリーをスクリーニングし； 20  
そして上で選択されたペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で該 G タンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の該ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が、上で選択されたペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の該ライブラリーのメンバーを同定することを含む、前記方法を提供する。この態様で使用するスクリーニング法は、損なわれていない G タンパク質共役型受容体への結合に関して、または G タンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することを含むことも可能である。G タンパク質共役型受容体結合ペプチドは、G タンパク質サブユニットまたはその断片であることも可能であり、例えば長さ約 7～約 70 アミノ酸、長さ約 7～約 55 アミノ酸、長さ約 8～約 50 アミノ酸、長さ約 9～約 23 アミノ酸、または最も好ましくは長さ約 11 アミノ酸の G タンパク質サブユニット断片である。G タンパク質サブ 30  
ユニット断片は、好ましくは G サブユニットまたは G サブユニット・カルボキシル末端ペプチドであるが、別に G 二量体であることも可能である。

【 0 0 4 8 】

[ 0 0 0 4 8 ]スクリーニングは競合結合アッセイを含むことも可能であり、これは好ましくは、G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと、ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられ、例えばペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能であり、そして/または G タンパク質共役型受容体への結合が、G タンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、酵素連結免疫吸着アッセイにおけるものがある。

【 0 0 4 9 】

[ 0 0 0 4 9 ]候補化合物のライブラリーは、好ましくは、高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドの構造に基づく、候補化合物の集中的ライブラリーである。候補化合物のライブラリーは、コンビナトリアル・ライブラリー、例えば薬剤様分子のコンビナトリアル・ライブラリー、またはそのメンバーが、例えば高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドの化学的構造に基づくことも可能な、集中的小分子ライブラリーであることも可能である。

【 0 0 5 0 】

[ 0 0 0 5 0 ]本発明の方法で使用する酵素連結免疫吸着アッセイは、該 G タンパク質共役型受容体を固体支持体上に固定し；タンパク質-ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーを提供し；該 G タンパク質共役型受容体に対して、少なくとも該 G タンパ 50

ク質共役型受容体結合ペプチドと同程度に高い結合親和性を有するタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーが、固定されたGタンパク質共役型受容体に結合する条件下で、該タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーと、固定されたGタンパク質共役型受容体を、該Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドの存在下でインキュベーションし；該タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーの未結合メンバーを取り除き；結合したタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーと、該タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーのタンパク質部分を特異的に認識する抗体を、該抗体が該タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーに特異的に結合する条件下で、インキュベーションし；未結合抗体を取り除き；そして結合した抗体を検出する工程を含むことも可能である。該タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーは、好ましくはマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーであり、そして該抗体は、好ましくは抗マルトース結合タンパク質抗体である。該Gタンパク質共役型受容体への結合は、好ましくは、該Gタンパク質共役型受容体とシグナル伝達増進剤の相互作用から生じるシグナルを測定することによって、決定される。

10

## 【0051】

[00051] 該ペプチドライブラリーは、好ましくはコンビナトリアル・ペプチドライブラリー、例えばタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリー、例えばマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーまたは適切なペプチドディスプレイライブラリーいずれかである。候補化合物のライブラリーは、好ましくは、天然ペプチドより高い親和性でGタンパク質共役型受容体に結合するとして上で選択された化合物の構造に基づく、候補化合物の集中的ライブラリーである。ライブラリーは、ペプチドライブラリーまたは小分子ライブラリーであることも可能である。

20

## 【0052】

[00052] さらに態様において、本発明は、上述の方法によって同定される化合物を提供する。さらに態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療する方法、およびGタンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療する方法であって、どちらもこれらの化合物を投与することを含む、前記方法を提供する。さらに態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって、該Gタンパク質共役型受容体と、上述の方法の少なくとも1つによって同定された化合物を、結合が生じ、そして該Gタンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；Gタンパク質共役型受容体 - 化合物結合対を共結晶させ；該共結晶結合対をX線結晶学に供し；そして該共結晶結合対の三次元構造を決定する、ここで該Gタンパク質共役型受容体の原子座標が得られることを含む、前記方法を提供する。さらに態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって、該Gタンパク質共役型受容体と、上述の方法の少なくとも1つによって同定された化合物を、結合が生じ、そして該Gタンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；該結合対を核磁気共鳴研究に供し；そして該結合対の三次元構造を決定する、ここで該Gタンパク質共役型受容体の原子座標が得られることを含む、前記方法を提供する。

30

40

## 【0053】

[00053] さらに態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体結合パートナーを単離する方法であって、上述の方法の少なくとも1つによって同定された結合化合物を含む固体支持体を提供し；候補Gタンパク質共役型受容体結合パートナー化合物のライブラリーを提供し；該候補化合物のライブラリーと、該固体支持体を、該化合物への該候補化合物の結合が生じる条件下で接触させ；未結合候補化合物および非特異的に結合した候補化合物を該固体支持体から溶出し；そして該固体支持体から、結合した候補化合物を回収することを含む、前記方法を提供する。

## 【0054】

50

【00054】さらなる態様において、本発明は、Gタンパク質共役型受容体の活性化を修飾する小分子を設計する方法であって、上述の方法の少なくとも1つによって、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定し；そして該原子座標に基づくコンピュータモデリングによって候補構造を設計する、ここで該候補構造は、該Gタンパク質共役型受容体に結合すると予測されることを含む、前記方法を提供する。

【0055】

【00055】さらなる態様において、本発明は、上述の方法の少なくとも1つによって同定されたペプチドをコードするDNAを含む核酸であって、該DNAが異種転写制御配列に機能可能であるように連結されている、前記核酸、この核酸を含む発現ベクター、および該発現ベクターでトランスフェクションされた細胞を提供する。本発明はまた、上述の方法いずれかによって同定されたペプチドを特異的に認識する抗体、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体または一本鎖抗体を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0056】

好ましい態様の詳細な説明

【00088】本発明は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)およびその同族Gタンパク質(単数または複数)間の結合に干渉するか、またはその結合を増加させることが可能な化合物、並びにコンホメーション研究のため、GPCRの特定のコンホメーションを安定化させる化合物を同定する方法を含む。これらの化合物は、Gタンパク質が仲介するシグナル伝達を調節し、そしてしたがって、薬剤として、潜在的に有用な薬剤を同定するリード化合物として、薬剤候補を同定するアッセイの構成要素として、あるいは例えばX線結晶学または核磁気共鳴などの既知の方法によるコンホメーション研究における結合パートナーとして、使用することも可能である。

20

【0057】

【00089】スクリーニングおよび薬剤同定のための方法は、Gタンパク質のGPCR結合領域の構造を模倣し、そしてしたがって、受容体-Gタンパク質相互作用を特異的に調節することが可能であるか、または高親和性で既定の受容体に特異的に結合するペプチドを用いる。これらの高親和性ペプチドは、発現構築物の背景で、細胞内に搬送されて、*in vitro*および*in vivo*で受容体が仲介する特定の細胞性反応のブロッカーまたはアゴニストとして作用することも可能であるし、あるいは患者に直接投与されることも可能である。該ペプチドはまた、伝統的な薬剤化合物を提供するか、または結合における構造-機能関係を研究するための、スクリーニング、同定および選択プロセスの基礎を形成する。特に、本発明は、特定のGタンパク質の受容体-Gタンパク質界面で、化合物を遮断するかまたは模倣する高親和性類似体ペプチドを同定し、そしてこれらの高親和性類似体をハイスループット・スクリーニングで用いて、あるGタンパク質またはGタンパク質種のGPCRシグナル伝達と、同様に特異的に拮抗するか、またはこうしたシグナル伝達を特異的にアゴナイズする他のペプチドまたは小分子を同定することを可能にする。

30

【0058】

【00090】小分子を類似のハイスループット・スクリーニングプロセスで使用して、さらなる化合物を同定することも可能である。「小分子」は、GPCRの界面領域に結合するか、またはこうした結合に干渉するか、あるいはこうした作用の候補である、非ペプチド有機化合物いずれかを示す。GPCRの特定の配座異性体に結合し、そして該異性体を安定化する、こうした分子もまた、本明細書において、「小分子」の定義に含まれる。本発明の方法を用いて、GPCRを通じたシグナル伝達を使用して、生物学的プロセスを阻害するかまたは増進し、あるいは特定のGPCR配座異性体に結合し、そして該異性体を安定化させる、受容体-Gタンパク質界面に向けられるペプチドまたは小分子を設計することも可能である。GPCR-Gタンパク質界面の配座異性体に結合するか、その結合に干渉するか、または該異性体を安定化させる、こうした化合物(限定されるわけではないが、アゴニスト、逆アゴニスト、アロステリック・アゴニスト、ブロッカー、アンタ

40

50

ゴニスト、阻害剤、負のアンタゴニスト、部分アゴニスト、および増進剤とともに、特定の配座異性体に結合しそして該異性体を安定化させる化合物を含む)は、「修飾剤」または「修飾」化合物と称され、そしてペプチドおよび小分子両方を含むことも可能である。薬剤設計に向けたこのアプローチは、入手可能なリガンドがないGPCR相互作用、リガンドが知られていないオーファン受容体、突然変異体恒常的活性化型受容体、グレース病におけるTSH受容体のように、抗体に架橋された不可逆的活性化型受容体、およびプロテイナーゼ活性化型受容体(PAR)をターゲティングするのに有用である。しかし、このアプローチは、いかなるGPCR-Gタンパク質相互作用にも、そしてより広く、受容体-タンパク質相互作用一般で、同等によく働く。

#### 【0059】

[00091] 該方法は、実質的にいかなるGPCRに結合し、そして増進するかまたは阻害することが可能な高親和性化合物を同定するのに有用であるため、このアプローチは、特定の種のGタンパク質が関連する機能障害または疾患を防止し、改善し、または修正することも可能な化合物を同定するのに有用である。GPCR増進剤および阻害剤が有用である状態および疾患状態には、限定されるわけではないが：脳卒中；心筋梗塞；再狭窄；アテローム性動脈硬化症；低血圧；高血圧；狭心症；急性心不全；心筋アポトーシス；癌；細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染などの感染、並びに特にHIV-1またはHIV-2に引き起こされる感染；敗血症ショック；疼痛；慢性アレルギー性障害；喘息；炎症性腸疾患；骨粗鬆症；関節リウマチ；グレース病；術後腸閉塞；尿閉；精巢中毒症；潰瘍；肥満；良性前立腺肥大；並びに不安症、癲癇、統合失調症、躁うつ病、パーキンソン病、アルツハイマー病、せん妄、痴呆症、薬物嗜癖、食欲不振、過食、気分障害および睡眠障害を含む、精神病および神経学的障害；禁煙、並びにGタンパク質共役型受容体阻害によって治療可能な他の疾患または状態いずれか、並びにGタンパク質共役型受容体活性化によって治療可能な他の疾患または状態いずれかが含まれる。多様なGタンパク質が結合する受容体は、非常に異なっているため、異なるGPCR、あるいは異なるGPCR種またはGPCR群に特異的に干渉することが可能な類似体ペプチド集団を生成することが可能になることから、この広範囲な組の障害の治療が可能である。上に列挙したような、多様な疾患および状態に対する、Gタンパク質およびGタンパク質シグナル伝達の関係が、当該技術分野に知られる。

#### 【0060】

[00092] 本発明のスクリーニング法を用いて、特定のスクリーニングで同定される配列は、すべての受容体に結合するのではなく、目的の特定の受容体にのみ結合する。Gタンパク質およびGPCRの間の相互作用は、非常に特異的である。例えば、G<sub>i1/2</sub>ペプチドがA1アデノシンGタンパク質共役型受容体-Gタンパク質界面に結合する能力を、1つのアミノ酸を相違させて、実質的に減少させるか、または除去することも可能である。Gilchristら, J. Biol. Chem. 273: 14912-14919, 1998。Gタンパク質上のGTP/GDP交換の上流制御、およびGタンパク質が仲介するエフェクター活性化はどちらも、界面結合化合物で阻害可能である。したがって、1つのGPCRの特定の作用に特異的に干渉するか、またはこうした作用を安定化させるように、高親和性類似体ペプチドを設計することも可能である。同様に、アゴナイズペプチドまたは増進ペプチドもまた、1つのGPCRに特異的に影響を及ぼすことも可能である。これらの特異的に作用するペプチド類似体は、薬剤化合物自体としても、そしてまた同じ特異的GPCR相互作用を有する他のペプチドおよび小分子結合剤に関する最新のハイスループット・スクリーニングにおける強力なリード化合物としても、有用である。

#### 【0061】

[00093] 本発明は、1つの態様において、第一の工程として、受容体がヘテロ三量体Gタンパク質と相互作用する能力を増進するかまたは阻害する小分子に関するスクリーニングに頼る。ロドプシンおよびトランスデューシンを用いたスクリーニングによって、ロドプシンが、ロドプシンの活性化型であるMIIを形成する能力を、有意に増進させ

10

20

30

40

50

る小分子が発見されてきた。こうした小分子は、夜盲に有効な、潜在的な療法剤へと向けられる、薬剤発見努力において、リード化合物として働くことも可能である。スクリーニングを用いて小分子を同定し、そして次いで、*in vitro*および*in vivo*解析を用いて同定される化合物を試験すると、強力な高親和性化合物が発見されるであろう。

#### 【0062】

[00094]したがって、本発明を用いて、ロドプシンがシグナル伝達する能力を増進する小分子を同定することも可能である。本発明の方法は、1つの態様において、化合物ライブラリーをスクリーニングして、活性化されたロドプシンへのGタンパク質ペプチドの結合を増加させる、より多くの分子を発見することを含む。該方法はまた、いくつか

10

#### 【0063】

[00095]さらに、該方法は、やはりGtに共役することが示されている、別のGPCR、例えばヒト・トロンピン受容体(PAR1)を用いて、小分子の影響を測定することによって、特異性に関して小分子を試験することを含む。Seibertら, Vision Res. 42: 517, 1999。野生型マウスおよび突然変異体マウスの網膜電図写真(ERG)を用い、本発明の方法にしたがって、*in vivo*での視覚の感受性の増進を試験することも可能である。Changら, Vision Res. 42: 517-525, 2002。本発明の方法はまた、場合によって、増進剤またはアンタゴニストの化学構造を最適化し、発見した化学実体の薬物動態学的研究、毒性学的研究および代謝研究、並びに広い動物有効性研究、および夜盲の薬理学的治療に関する臨床試験を行うことも含む。したがって、本発明の方法を用いて、例えば、光活性化型ロドプシンに対する高親和性Gtペプチドの結合を増進する小分子を同定し、該小分子が*in vitro*でロドプシン・シグナル伝達を増進するかどうかを決定し、該小分子がロドプシンに特異的であるかどうか、または該小分子が他のGPCR-Gタンパク質シグナル伝達事象を増進可能であるかどうかを決定し、そして該小分子を、定常夜盲のマウスモデルにおいて、ERGで測定した際の、視覚の感度増進に関して試験することも可能である。

20

30

#### 【0064】

[00096]第一の工程は、光活性化または暗順応ロドプシンいずれかに高親和性で結合するGtのC末端に基づく配列を持つペプチドを同定することであった。次いで、これらのペプチド類似体を、他のGPCRに対比して、ロドプシンに結合する特異性に関して、それとともに該受容体のMIIコンホメーションを安定化する能力に関して試験した。本発明の方法はまた、光活性化型ロドプシンに結合し、そしてそうすることによって、高親和性ペプチド類似体の結合を増進する小分子も同定する。化合物の結合親和性( $EC_{50}$ )は、成功する薬剤候補の最初の判断基準である。同定された小分子を、MII安定化およびMII崩壊、GTP-S結合、およびPDE活性化などのアッセイを用いて、ロドプシン・シグナル伝達を増進する能力に関して、*in vitro*で試験する。

40

#### 【0065】

[00097]活性化に際して、ロドプシンはコンホメーション変化を経て、これによって、Gtとの相互作用およびGtの活性化が可能になり、最終的にPDEの刺激につながる。光活性化型ロドプシンへのGtの結合は、高親和性受容体状態を誘導し、これは、受容体の活性シグナル伝達メタロドプシンII状態の安定化によって、分光光度的に測定可能である。スプリット・ビームSLM Aminco DW2000分光光度計を用いて、例えば、受容体が、光活性化後に、適切なコンホメーション変化を経るかどうかを決定することも可能である。このアッセイは、受容体のコンホメーションに作用する小分子を示す。ロドプシンの活性中間体、メタロドプシンII(MII)が、小分子の存在によって安定化される場合、受容体の活性化エネルギーが低下する。本発明のアッセイ系を用

50

いて、通常は必要とされるヘテロ三量体 G タンパク質なしに、受容体が活性 M I I コンホメーションを採ることを可能にする化合物が同定された。「増進剤」は、受容体の活性（シグナル伝達）コンホメーションを安定化させる。「阻害剤」は、トランスデュースのロドプシンへの結合を遮断し、そしてこうして、アゴニスト（光）および G タンパク質の存在下であっても、受容体が適切なコンホメーションを採るのを阻害する。

【 0 0 6 6 】

[ 0 0 0 9 8 ] メタロドプシン I I 崩壊を用いて、M I I 崩壊の変化によって、化合物有効性の相違を調べることも可能である。相違は、化合物が M I I のレチナル・シッフ塩基連結に非特異的に付着する影響による可能性があることと仮定することも可能である。したがって、個々の化合物の存在下で、時間に依存する M I I 崩壊を比較することも可能である。受容体活性化の過程で、G t サブユニットは G T P 分子に結合する。G T P S 結合アッセイは、受容体がシグナル伝達する能力を決定することも可能であり、G T P S 結合の増加は、受容体が仲介する、サブユニットからの G D P の遊離およびそれに続く G T P の結合の指標となる。不活性トランスデュース ( G t · G D P ) から活性状態 ( G t · G D P ) への変換には、G からの G の解離が付随する。次いで、遊離 G t · G T P が c G M P ホスホジエステラーゼ ( P D E ) に結合し、そして2つの阻害性サブユニットを解離させることによって、該酵素を活性化する。その結果、活性化された P D E ( P D E \* ) の遊離した触媒性サブユニットおよびサブユニットが c G M P を G M P に変換することが可能である。したがって、ロドプシン・シグナル伝達に影響を及ぼす化合物を、P D E アッセイに対する影響に関して試験することも可能である。

10

20

【 0 0 6 7 】

[ 0 0 0 9 9 ] 一般的に、高親和性ペプチド融合タンパク質を競合して解離させるのに用いた際に、適切な用量曲線を示して、ロドプシンに対する結合に関して  $E C_{50} < 100 \mu M$  を生じる小分子は、続く研究に適しており、そして M I I を安定化する能力に関して、こうした小分子を試験する。好ましくは、M I I 安定化に関して、 $E C_{50} < 10 \mu M$  のものをさらに解析する。さらなる解析には、小分子の存在下でのロドプシンの熱安定性 ( M I I 崩壊 )、および G T P S 結合 ( 機能に対する小分子の影響に関するアッセイ ) が含まれることも可能である。G T P S 結合速度は、G サブユニットの律速 G D P 遊離によって調節される。天然 G t は、G t の存在下または非存在下で、非常にゆっくりした固有の G D P 遊離速度を示す。したがって、グアノシン 5' - O - ( 3 - [ <sup>3</sup> 5 S ] チオ ) トリリン酸 ( G T P S ) 結合の増加は、受容体が仲介する、サブユニットからの G D P の遊離およびそれに続く G T P の結合を示す。

30

【 0 0 6 8 】

[ 0 0 0 1 0 0 ] G T P S 結合アッセイを以下のように、または当該技術分野に知られる方法いずれかを用いて行うことも可能である。単独の G サブユニット ( 1 m M )、またはアッセイしようとする小分子の存在下の G サブユニットを、2 m M G t または 2 m M G t および尿素洗浄 R O S 膜 ( 5 0 0 n M ロドプシン ) と混合し、そして 2 5 で 3 分間インキュベーションする。5 m M [ <sup>3</sup> 5 S ] G T P S ( 0 . 1 m C i ) の添加によって、結合反応を開始することも可能である。5 0  $\mu$  l のアリコットをいくつかの時点で抜き取り、1 3 0 m M N a C l および 1 0 m M M g S O <sub>4</sub> を含有する 1 m l の氷冷 2 0 m M T r i s · 2 H C l ( p H 8 . 0 ) 緩衝液と混合し、そして W h a t m a n <sup>T M</sup> 硝酸セルロースフィルター ( 0 . 4 5 m m ) を通過させる。同じ緩衝液 ( 3 m l 、氷冷 ) でフィルターを 3 回洗浄し、そして 3 a 7 0 B 混合物中に溶解した後、液体シンチレーションカウンター中でカウントする。本発明とともに使用可能な典型的な方法に関しては、S k i b a ら, J . B i o l . C h e m . 2 7 1 : 4 1 3 - 4 2 4 , 1 9 9 6 を参照されたい。当業者は、アッセイを行うことも可能な変動および調整を認識するであろうし、そしてこうした変動は、本発明の範囲内であると見なされる。結合反応に関する  $k_{app}$  値は、等式、G T P S 結合 ( 結合 % ) = 1 0 0 % ( 1 - e <sup>-k t</sup> ) にデータを当てはめることによって計算可能である。小分子 ( 単数または複数 ) を、P D E 活性化に影響を及ぼす能力に関して試験することもまた可能である。P D E への G t 結合

40

50

は、PDEの触媒性 サブユニットおよび サブユニットに対するガンマ・サブユニットの阻害効果を取り除き、そしてこれらのサブユニットの加水分解活性がほぼ300倍増加することを可能にする。

【0069】

[000101] Cerione, Methods Enzymol. 237: 409-423, 1994によって記載されるように、20での蛍光分光を用いて、ロドプシンによるGtの活性化を、小分子の存在下または非存在下で監視することも可能である。このアッセイは、照明に際して野生型ロドプシンに触媒される、G:GTP S(トランスデューシンのサブユニットおよびGTP S間の複合体)形成速度を測定する。励起波長は295nm(2nmバンド幅)であり、そして蛍光発光を340nm(12nmバンド幅)で監視する。簡潔には、10mM Tris(pH7.2)、2mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、1mM DTT、および0.01% n-ドデシル-マルトシドを含有する反応混合物中、ロドプシン(40nM)をGt(250nM)の溶液に添加する。溶液を300秒間攪拌して平衡にする。GTP S(5μM)を最終濃度5μMになるよう反応混合物に添加して、そして蛍光の増加をさらに2000秒間追跡する。活性化速度を計算するため、最初の60秒間を含むデータポイントを通じて、GTP S添加後の最初の蛍光増加の傾斜を決定した。化合物なしを1.00として、野生型ロドプシンに関して得た値に対して、小分子の存在下での値を規準化することも可能である。これらのアッセイにおいて、ロドプシンに直接作用するようである分子、または当業者に容易に明らかとなるこれらのアッセイ上の変動を、次のレベルの試験に採用する。他のGPCRに仲介されるプロセスに影響を及ぼすことなく、ロドプシン-トランスデューシン・シグナル伝達を特異的に調節する能力に関してまた、小分子をアッセイする。

10

20

【0070】

[000102] 好ましい小分子「増進剤」および「阻害剤」は、受容体に関してだけでなく、受容体-Gタンパク質相互作用に関する、ユニークに特異的である。1000を超えるGPCRが存在し、そしてありとあらゆるGPCRに対する化合物の影響を個々に決定する単純な方法はないため、いくつかの選択されたそして代表的なGPCRシグナル伝達系を試験することも可能である。Gtとヒト・トロニン受容体(PAR1)の機能する共役が立証されてきている。Seibert, Eur. J. Biochem. 266(3): 911-916, 1999。PAR1に対する影響に関する試験には、小分子(単数または複数)が、アデニルシクラーゼ活性、カルシウム流入、およびイノシトールリン酸集積などの、トロニンが仲介するシグナル伝達事象に対する影響を有するかどうかを決定することが含まれることも可能である。PAR1または他のGPCRへの機能的共役に関する他の試験が当該技術分野に知られ、そしてやはり使用可能である。

30

【0071】

[000103] 基質として[<sup>-32</sup>P]ATP(1mM; 120~400cpm/pmol)、そして[2,8-<sup>3</sup>H]cAMP(2mM; 200,000cpm/pmol)を用いて、最終体積50μl中でアデニルシクラーゼ活性を測定し、25mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5中の5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、1mM 2-メルカプトエタノール、100μMパパベリン、1μg/mlウシ血清アルブミン、並びに20mMクレアチンリン酸および120単位クレアチンホスホキナーゼ/mlからなるATP再生系を含有するアッセイ混合物において、回収を監視することも可能である。ATPおよびcAMPの濃度を、それぞれ15.4および14.6mM<sup>1</sup>cm<sup>-1</sup>の値を用いて、259nmで、分光光度法で測定することも可能である。タンパク質の添加によってアッセイを開始することも可能であり、そして37で10分間インキュベーションした後、2体積の停止溶液(2% SDS/45mM ATP/13mM cAMP)で反応を停止する。次いで、試料を加熱し(例えば100に3分間)、そして形成された環状[<sup>-32</sup>P]AMPを回収することも可能である。その開示が本明細書に援用される、Gilchristら, J. Biol. Chem. 276: 25672-25679, 2001を参照されたい。最後に、その開示が本明細書に援用される、Chan

40

50

gら, Vision Res. 42: 517-525, 2002に記載されるように、夜盲の動物モデルにおいて、先の工程を通過した化合物を試験することも可能である。

【0072】

[000104] *in vivo*系において、光反応に対する小分子の影響を評価するため、小分子(単数または複数)に曝露されたマウスの網膜電図写真を用いて、a波およびb波両方の振幅を測定することも可能である。相対光強度の対数に対して振幅をプロットすると、化合物が桿体シグナル伝達にのみ影響を及ぼしているかが示される。正常範囲内で閾値b波を誘発するための感度もまた測定可能である。突然変異体動物もまた、試験して、野生型ロドプシン・シグナル伝達に対する増進剤の影響だけでなく、夜盲の動物に対する影響も観察することも可能である。

10

【0073】

[000105] 試験しようとする小分子を無菌PBSに溶解し、そして点眼剤として投与することも可能である。最初の結果が陰性であった場合、IVまたはIM注射を用いて、実験を反復することも可能である。最も見込みのある候補は、同定された化合物からリード化合物に進めるのに必要な工程を経る。このアプローチは、夜盲に対する薬理学的治療であって、遺伝子治療、レーザー切除および網膜交換などのより侵襲性の処置に対する必要性を回避する、前記治療を同定する。

【0074】

[000106] タンパク質間の相互作用部位をマッピングすることは、界面領域に相当する合成ペプチドを用いて、2つのタンパク質間の界面の一部を同定することを伴う。ペプチドは、相互作用の競合阻害剤として作用することから同定される。trNOESYを用いた、結合コンホメーションにあるペプチド構造のNMR研究を、相互作用のため最低限必要な構造を定義する、置換ペプチド類似体活性の解析と組み合わせ、ロドプシン-トランスデューシン相互作用とともに、Gタンパク質-エフェクター相互作用の構造的基礎を理解するために用いた。GtのC末端に相当するペプチドを用いて、ロドプシンを活性コンホメーション(MII)または不活性コンホメーションに安定化することも可能である。ヘテロ三量体Gタンパク質の三次元構造によって、Gタンパク質サブユニットの最後の7アミノ酸は構造化されていないことが明らかになり、これは、サブユニットのこの領域が、適合が誘導された活性化受容体の細胞質表面への結合に必須であることを示している。単一アミノ酸の相違が、親和性に1000倍の影響を及ぼすことも可能であるため、この相互作用は非常に特異的である。

20

30

【0075】

[000107] ハイスループット・スクリーニングは、薬剤業界内で最初に開発されてきた、最近の技術である。この技術は、新規生物学的ターゲットが多量に生じ、そして変化を伴う商業環境において、薬剤業界が新規薬剤を迅速に生成する必要があることに応じて、出現してきた。この開発は、新規機器の発明によって、新規アッセイ法によって、そして莫大な数のデータポイントを効率的に取り扱うことを可能にするデータベースが利用可能になったことによって、補助されてきた。ハイスループット・スクリーニングを、コンビナトリアル・ケミストリー、合理的設計、および実験法の自動化と組み合わせることによって、一度に1つの化合物を扱う伝統的なアプローチと比較して、有意に加速された薬剤発見プロセスが導かれてきた。スクリーニングは、手動で行われることも可能であるが、時間および労働を節約する手段として、化合物ライブラリーをロボット・スクリーニングすることが好ましい。

40

【0076】

[000108] 薬剤発見プロセスの1つの重要な側面は、強力なリード化合物の同定である。試験のため、化合物を純粋にランダムに選択しても、既定の受容体に対して多くの活性化化合物が得られる可能性は低い。典型的には、製薬会社は、スクリーニングあたり、100,000以上の化合物をスクリーニングして、およそ100の潜在的なリード化合物を同定する。平均して、これらの化合物の1つまたは2つのみが、実際にリード化合物シリーズを生じる。したがって、企業は、有用な化合物の検索において、ますます多数

50

のデータセットをアッセイしてきている。次いで、化合物のアクセス可能性が課題となる：歴史的な化合物コレクションは、サイズおよび入手可能性が限定されている。対照的に、要求に応じて、巨大なコンビナトリアル・ケミストリー・ライブラリーを合成することも可能であるが、かなりの技術的困難があり、そして費用がかかる。ライブラリーサイズが拡大するにつれて、これらの非常に巨大なコンビナトリアル・ライブラリーから望ましい化合物を選択するのが困難になる。文字通り、数十万の化合物をスクリーニングする際、特に多くの「ヒット」が偽陽性であることが判明する場合には、候補リード化合物を性質決定するのは、高価であり、そして時間がかかるプロセスとなる。

#### 【0077】

[000109] 本明細書に記載する薬剤発見プロセスに対する多工程アプローチは、これらの問題の多くに解決策を提供する。本発明の1つの態様は、Gタンパク質サブユニット・カルボキシル末端の特性を利用して、Gタンパク質/GPCR相互作用の高親和性の競合阻害剤またはアゴニストとして作用するペプチドを同定することである。しかし、該方法は、いかなる特異的タンパク質-タンパク質、タンパク質-小分子、タンパク質-核酸相互作用などでも使用可能である。さらに、GPCR結合に關与するGサブユニットの領域いずれか、またはG二量体の領域いずれかに基づくペプチドも、同様に使用可能である。多くのこうしたGPCR結合領域が当該技術分野に知られる。高親和性競合剤の同定は、潜在的に有用な薬剤を試験する、特異的高親和性リード化合物を提供することによって、ハイスループット・スクリーニングの不都合な点の多くを克服するスクリーニング法および選択法の第一の工程を形作る。この方法で選択されたペプチドは、結合パートナーに対して天然タンパク質より1,000倍以上高い親和性を有するため、この工程は、有用な薬剤化合物をスクリーニングし、そして同定するのに成功する、1つの鍵である。

#### 【0078】

[000110] 好ましいプロセスの次の工程は、第一の工程で同定された高親和性リードペプチドに対する、候補ペプチドまたは小分子薬剤化合物のハイスループット・スクリーニングを含む。リードペプチド化合物は、望ましい受容体に対する強力であり、そして特異的な結合剤であるため、スクリーニングアッセイは、該ペプチドの結合を減少させる化合物（「ブロッカー」）または該ペプチドの結合を増加させる化合物（「アゴニスト」）に関して試験する。ペプチドが特異的受容体-Gタンパク質結合に必要な工程すべてを模倣するよう働くため、該アッセイ系によって、結合および機能の両方を同時に測定することが可能になる。この部位を用いることによって、この系は、有用な親和性（nMからμM範囲）で結合する候補化合物の同定だけでなく、その選択法の長所によって、Gタンパク質結合を増加させるかまたは減少させることによって機能に影響を及ぼす候補化合物の同定も容易にする。偽陽性化合物の数、および結合剤と同定されるが低親和性でしか結合しない化合物の数が減少するか、または実質的になくなるため、薬剤発見プロセスのハイスループット・スクリーニング工程は、非常に単純化される。成功の可能性が高い化合物のみがスクリーニングによって同定されるため、有用な化合物を直接同定可能であり、そして特異的で強力な薬剤化合物であることを確認するために性質決定し、そしてさらに研究する必要がある化合物ははるかに少なくなる。さらに、該方法は、目的の正確な部位に直接結合することを通じて化合物を同定するため、新たに同定された薬剤化合物の結合機構および作用機構を発見し、そして別のプロセスによって後で確認する必要がない。

#### 【0079】

[000111] 本発明にしたがって、同定された高親和性ペプチドを用いて、GPCR逆アゴニストを同定することもまた可能である。本発明の方法の第一の工程で同定される高親和性ペプチドは、受容体に結合し、そして受容体を活性コンホメーションまたはR\*コンホメーションに安定化させる。強力なアゴニストを同定するために使用するスクリーニングは、この結合と競合し、そしてまた、GPCRをR\*状態に安定化することが可能な化合物を探し出す。一方、逆アゴニストは、GPCRを不活性状態またはR状態に安定化させる。したがって、高親和性ペプチドの解離またはGPCRに対する親和性の減少

を検出するよう設計されたスクリーニングを用いて、逆アゴニストを同定する。

【0080】

[000112] 本説明は、Gタンパク質共役型受容体およびその同族Gタンパク質間の相互作用に関連する例を提供するが、この方法論を用いて、特にGPCRおよびGまたはGタンパク質サブユニットの領域いずれかとの相互作用いずれかを含む、大部分のタンパク質-タンパク質相互作用のペプチド阻害剤を同定することも可能である。この方法によって選択される高親和性ペプチドをハイスループット・スクリーニングで用いて、多様な特異的生物学的プロセスの調節剤として使用可能な小分子を同定することも可能である。

【0081】

[000113] 非常に高親和性のペプチドGPCRブロッカーを産生するため、例えばtrNOESY(NMR)を用いて、受容体に結合したコンホメーションの野生型Gカルボキシル末端ペプチドまたは他のGPCR結合ペプチドいずれかの三次構造を研究することも可能である。Dratzら, Nature 363:276-280, 1993。これらの種の研究から得られるGタンパク質領域の構造データを、置換ペプチド類似体の活性解析と組み合わせ、ペプチドまたはリガンドいずれかとGPCRの相互作用の最低限の構造上の必要条件を定義する。以下の実験系は、受容体-Gタンパク質相互作用を定義するのに使用可能な系の例である：(i)網膜桿体細胞におけるロドプシン-トランスデューシン(Gt)、(ii)C6神経膠腫細胞における-アドレナリン作用性受容体-Gs、(iii)チャニーズハムスター卵巣細胞におけるアデノシンA1受容体-G1、(iv)ラット海馬CA1錐体ニューロンにおけるGABA<sub>B</sub>受容体-G1、(v)ヒト胚性腎臓細胞におけるムスカリン性M2受容体-G1など。好適であるかまたは望ましいGPCRまたはGPCR群いずれを用いて、相互作用必要条件を定義することも可能であり、そして当業者は、この種の受容体結合における構造-活性関係を理解する多くの方法を知っている。これらの方法はいずれも、これらの方法での使用が意図され、そして例示する態様の特定の方法の代わりに用いることも可能である。

【0082】

[000114] プラスミドディスプレイ法は、タンパク質-タンパク質相互作用の競合阻害剤として働きうる、特異的でそして強力なペプチドを同定する効率的な手段を提供する。構造-活性研究から収集した情報を用いて、GPCR結合領域、例えばGサブユニット・カルボキシル末端に関連する配列をコードする変異体ペプチドライブラリーを、各Gサブタイプ種またはG種に関して調製することも可能である。ライブラリーの元となることも可能な典型的な天然配列には、以下の表IIIに列挙するものが含まれる。ライブラリーは、配列内に、コンピュータが生成したランダム置換を持つペプチドを好適に含有し、そして一度に多数のペプチド配列を試験することが可能である。好ましくは、およそ50%のアミノ酸残基が天然GPCR結合領域と同一であり、そして残りのアミノ酸残基がアミノ酸いずれかからランダムに選択されるように、各ライブラリー中のペプチド配列を構築する。ペプチドは、約7~約55アミノ酸残基、または長さ約8~約50アミノ酸残基、または約7~約70アミノ酸残基以上、好ましくは約9~約23アミノ酸残基、または約9~約15アミノ酸残基のサイズ範囲であることも可能である。11量体ペプチドが最も好ましい。約10%~約90%のアミノ酸残基が天然配列から変化していないライブラリーを構築することも可能であるが；約30%~約70%が変化していないことが好ましく、そして約50%が最も好ましい。

【0083】

[000115] あるいは、合成ペプチドライブラリーは、タンパク質のランダムに生成される重複領域を用いて、GPCRと相互作用することが知られるタンパク質いずれに基づくことも可能である。ペプチドは、長さ約7~70アミノ酸、または長さ約8~50アミノ酸または好ましくは長さ約9~約23アミノ酸、または長さ約9~約15アミノ酸、そして最も好ましくは長さ約11アミノ酸であることも可能である。好適にペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを、ペプチドのN末端にリンカー配列をつけて、LacI

10

20

30

40

50

遺伝子の3'端にクローニングすることも可能である。リンカー配列は、スクリーニング成功に必須ではないが、一般的に好ましい。クローニング目的のため、ペプチドコード配列のどちらかの末端に、制限酵素部位を配置することも可能である。ペプチドライブラリーの配置図および1つのペプチドの例に関して、以下の表Iを参照されたい。やはり使用可能なさらなるペプチドを以下の表IIおよび表IIIに示す。実際のペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチドを、正しい塩基が70%、そして残りの塩基が各々10%であるように合成して、ペプチド配列に沿ったいかなる特定の位でも、正しいアミノ酸を有する可能性がおよそ50%であるバイアスペプチドライブラリーを生じる。塩基を異なる比で用いて、配列中のいかなる特定の位でも、望ましい突然変異誘発率を達成することも可能である。

10

【0084】

表I. 合成ペプチドライブラリーの構築例

【0085】

【表1】

Q R M H L R Q Y E L L ( 配列番号13 )

gaggtggt nnknnknnknnk attcgtgaaaactttaaagattgtggtcgtttc taa ctaagtaaagc

A                      B                                      C                                      D                      E

( 配列番号14 )

【0086】

20

n = ヌクレオチド塩基いずれか ; k = グアニジンまたはチミジン ; A = 制限酵素部位 ;  
B = リンカー配列 ; C = ペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチド ; D = 停止コドン ;  
E = 制限酵素部位。

【0087】

表II. G サブユニットペプチドおよび対応するDNA構築物

【0088】

【表 2】

Gαサブ ユニット	配列											配列 番号:
Gt	I atc	K aag	E gag	N aac	L ctg	K aaa	D gac	C tgc	G ggc	L ctc	F ttc	15 16
Gi1/2	I ata	K aaa	N aat	N aat	L cta	K aaa	D gat	C tgt	G ggt	L ctc	F ttc	17 18
GRi1/2	N aac	G ggc	I atc	K aag	C tgc	L ctc	F ttc	N aac	D gac	K aag	L ctg	19 20
Gi3	I att	K aaa	N aac	N aac	L tta	K aag	E gaa	C tgt	G gga	L ctt	Y tat	21 22
Go2	I atc	A gcc	K aaa	N aac	L ctg	R cgg	G ggc	C tgt	G gga	L ctc	Y tac	23 24
Go1	I att	A gcc	N aac	N aac	L ctc	R cgg	G ggc	C tgc	G ggc	L ttg	Y tac	25 26
Gz	I ata	Q cag	N aac	N aat	L ctc	K aag	Y tac	I att	G ggc	L ctt	C tgc	27 28
Gi1	L ctg	Q cag	L ctg	N aac	L ctc	K aag	E gag	Y tac	N aac	L ctg	V gtc	2 29
Gq	L ctc	Q cag	L ttg	N aac	L ctg	K aag	E gag	Y tac	N aat	A gca	V gtc	30 31
Golf	Q cag	R cgg	M atg	H cac	L ctc	K aag	Q cag	Y tat	E gag	L ctc	L ttg	32 33
Gi4	L cta	Q cag	L cta	N aac	L cta	R agg	E gaa	F ttc	N aac	L ctt	V gtc	34 35
Gi15/16	L ctc	A gcc	R cgc	Y tac	L ctg	D gac	E gag	I atc	N aac	L ctg	L ctg	36 37
Gi2	L ctg	Q cag	E gag	N aac	L ctg	K aag	D gac	I atc	M atg	L ctg	Q cag	38 39
Gi3	L ctg	H cat	D gac	N aac	L ctc	K aag	Q cag	L ctt	M atg	L cta	Q cag	40 41
Gs	Q cag	R cgc	M atg	H cac	L ctt	R cgt	Q cag	Y tac	E gag	L ctg	L ctc	13 42
5' - gatccgcccaccatggga-											-tgaa-3'	

( 配列番号43, 44 )

【 0 0 8 9 】

表 I I I . ライブラリー / ミニ遺伝子構築\* のための典型的な天然 G タンパク質配列

【 0 0 9 0 】

10

20

30

【表3】

名称	配列	配列番号	名称	配列	配列番号
hGt	IKENLKDCGLF	15	CryptoGbal	LQNALRDSGIL	62
hG11/2	IKNNLKDCGLF	17	GA3_UST	LTNALKDSGIL	63
G05_DRO	IKNNLKQIGLF	45	GA1_KLU	IQQNLKKSGL	64
GAF_DRO	LESENVSMMGLF	46	GA3_UST	LTNALKDSGIL	63
Gi-DRO	IKNNLKQIGLF	45	GA1_DIC	NLTIGEAGMIL	64
hG13	IKNNLKECGLY	21	GA2_KIAJ	LENSLKDSGVL	65
hG0-1	IANNLRGCGLY	25	GA2_UST	ILTNNLRDIVL	66
hG0-2	IANKLRGCGLY	47	Mgs-XL	QRMHLQYELL	67
GAK_CAV	IKNNLKECGLY	21	hGs	QRMHLQYELL	13
G0_XEN	IAYNLRGCGLY	48	hGolf	QRMHLQYELL	68
GA3_CAEEL	IQANLQCGLY	49	GA1_COPCO	LQLHLRECGLL	69
GA2_CAEEL	IQSNLHKSGLY	50	GA1-SOL	RRRNLPFAGLL	70
GA1_CAEEL	LSTKLKGCGLY	51	GA2_SB	RRRNLPFAGLL	71
GAK_XEN	IKSNLMECGLY	52	GA1_SB	RRRNLPFAGLL	72
GA1_CAN	VQQNLKKSGLM	53	GA1_UST	IQVNLKDCGLL	73
hG2	IQNNLKYIGLC	27	GA4_UST	RENKLTGLVG	74
hG15	LARYLDEINLL	36	GA1_ORYSA	DESMRRSRBGT	75
GA2_SCHPO	LQHSLEKAGMF	54	GQ1_DROME	MQNALKEFNLG	76
hG12	LQENLKDIMLQ	38	GA2_DIC	TQCVMKAGLYS	77
hG13	LHDNLKQMLQ	40	GS-SCH	LQHSLEKAGMF	54
GAL_DRO	LQRNLNALMLQ	55	GA-SAC	ENTLKDSGVLQ	56
GA2_YST	ENTLKDSGVLQ	56	GA1-CE	IISASLKMVG	78
hG14	LQLNLREFNLV	34	GA2-CE	NENLRSAGLHE	79
hG11	LQLNLKEYNLV	2	GA3-CE	RLIRYANNIPV	80
hGQ	LQLNLKEYNAV	30	GA4-CE	LSTKLKGCGLY	51
GQ_DROME	LQSNLKEYNLV	57	GA5-CE	IANKLKSMLC	81
G11_XEN	LQHNLKEYNLV	58	GA6-CE	IGRNLRGTGME	82
Gq_SPOSC	IQENLRLCGLI	59	GA7-CE	IQHTMQKVGIQ	83
GA1_YST	IQQNLKKGII	60	GA8-CE	IQQNLKKGMM	84
GA1_NEUCR	IIQRNLKQLIL	61	GA5-DIC	LKNIFNTIINY	85

10

20

30

## 【0091】

\* ミニ遺伝子構築物を産生するため、各ヌクレオチド配列は、5' - g a t c c g c c g c c a c c a t g g g a - (配列番号43) および - t g a a - 3' (配列番号44) を用いることによって、ペプチドのN末端にアミノ酸MGをコードするように構築されなければならない。

40

## 【0092】

[000116] 結合反応を行うのに好都合であり、そして効率がよいように、ディスプレイ系において、ペプチドを好適に合成する。例えば、当該技術分野に知られるようなプラスミドまたはファージディスプレイ系を使用することも可能である。ペプチドディスプレイ系が好ましいが、GPCRとペプチドの効率的な接触および結合測定を可能にする、いかなる方法を用いることも可能である。

## 【0093】

[000117] ペプチドディスプレイ(「プラスミド上のペプチド」)ライブラリー

50

は、本発明で使用するのに好適な系であり、LacIおよびlacO間の高親和性結合を利用する。「プラスミド上のペプチド」ディスプレイは、2つの主な理由から、本発明での使用に好ましい。該技術は、実験室で容易にセットアップされる。さらに、提示するタンパク質のカルボキシル末端でペプチドを融合させると、スクリーニング中、カルボキシル末端ペプチドの正常な提示が模倣される。アミノ末端または内部ペプチドを試験する場合、天然提示を模倣するため、ペプチドを適切な位にクローニングすることも可能である。

#### 【0094】

[000118]カルボキシル末端ペプチドを試験するための「プラスミド上のペプチド」法は、一般的に以下のように働く。当業者は、この一般的な説明および以下の実施例を指針として用い、異なる条件に適合するのに必要とされるように、これらの方法を修飾することも可能であろう。目的の天然GPCR結合ペプチドに基づく縮重PCRによって、ペプチドライブラリーを生成し、そしてLacIのカルボキシル末端に融合させる。融合遺伝子を所持するプラスミドベクターを介して、ペプチドライブラリーを発現させる。プラスミドはまた、Lacオペロン(LacO)も含有し、そして大腸菌(E.coli)がLacI融合タンパク質を転写し、そして翻訳すると、該融合タンパク質は、コードプラスミドに四量体として戻って、lacO DNA結合配列を通じて結合し、プラスミド上で目的の挿入配列をディスプレイする。したがって、転写および翻訳後、天然ペプチド配列に関連する異なる配列をコードする変異体ペプチドが、lacI遺伝子のカルボキシル末端伸展として、ディスプレイされる。したがって、受容体への結合に関してスクリーニング可能な、安定なLacI-ペプチド-プラスミド複合体が形成される。その開示が本明細書に援用される、Gatesら, J. Mol. Biol. 255: 373-386, 1996に記載される方法が、適切である。典型的な方法に関しては、実施例7および実施例9を参照されたい。

#### 【0095】

[000119]ペプチドをディスプレイするのに用いた大腸菌株は、ARI814であったが、これは以下の遺伝子型を有する: (sr1-recA) endA1 nupG lon-11 sulA1 hsdR17 (ompT-fepC) 266 clpA319::kan lacI lacZU118。この株は、形質転換または形質導入によって導入された非修飾DNAの制限を防止する、hsdR17アレルを含有する。ompT-fepC欠失は、対形成塩基性残基間でペプチドを消化する、OmpTプロテアーゼをコードする遺伝子を取り除く。lon-11およびclpA突然変異もまた、ATP依存性細胞質プロテアーゼによるタンパク質分解を制限する。lacI遺伝子の欠失は、プラスミドのlacO部位への結合に関して、融合構築物と競合する、野生型lacリプレッサーの発現を防止する。lacZ突然変異は、リプレッサーの非存在下で-ガラクトシダーゼを作成する、細胞の代謝供給源の浪費を防止する。endA1突然変異は、アフィニティー精製に対して有害な影響を有するヌクレアーゼを除去し、そしてrecA欠失は、RecAが触媒する相同組換えを通じたプラスミドの多量体化を防止する。この株は、頑強な増殖特性を有し、そして免疫担当細胞が高収率であることからも選択された。典型的には、mg DNAあたり $2 \times 10^{10}$ コロニーの形質転換効率が達成された。大腸菌のこの株が好ましいが、当業者は、記載する方法で使用するのが好適である、多くの代替法を知っている。したがって、当該技術分野に知られる適切でそして好適な細菌株はいずれも、本発明での使用に意図される。

#### 【0096】

[000120]リゾチームを用いた細胞壁の穏やかな酵素消化によって、LacI-ペプチド融合タンパク質ライブラリーを細菌から遊離させることも可能である。細胞破片をペレットにした後、アフィニティー精製のため、固定された受容体に溶解物を直接添加することも可能であるし、また溶解物を精製なしに用いることも可能である。これらのペプチドのディスプレイライブラリーをスクリーニングして、特定のGPCRに高親和性で結合するペプチドを同定する。この方式で、GPCRに結合し、そしてあらかじめ選択し

10

20

30

40

50

た、特定のGタンパク質の活性化に干渉するか、またはこうした活性化を増進することも可能な、高親和性ペプチドに関してスクリーニングし、そして該ペプチドを同定することが可能である。ライブラリーを、いかなる望ましいGPCRに対してスクリーニングすることも可能である。コンビナトリアル・ライブラリーは、特定のGサブユニットまたはGサブユニットに基づくペプチドを含有するため、このサブユニットまたはサブユニット種に結合するか、またはこれらを通じてシグナル伝達を仲介する、いかなるGPCRを用いることも可能である。異なるGタンパク質のカルボキシル末端配列または他の領域に基づく、多数のライブラリーを、同一GPCRまたは異なるGPCRをスクリーニングするために構築することも可能である。

【0097】

[000121] プラスミドディスプレイライブラリーをスクリーニングするため、ELISAによるスクリーニング用に、マイクロタイタープレート上に、目的のGタンパク質共役型受容体を好適に固定することも可能である。次いでプラスミド調製物(細菌溶解物)をウェルに添加することも可能である。このスクリーニング法は、ライブラリープラスミド上にディスプレイされたペプチドが受容体に結合するのを可能にすることを含み、ときに「パニング」と呼ばれる。受容体に結合する配列はウェルに固着するため、非結合配列を洗浄工程によって除去することも可能である。次いで、付着したプラスミドを増殖させ、そして大腸菌を形質転換するのに用いることも可能である。「パニング」プロセスは一般的に、2~8回反復される。しかし、一般的に、3~4回の連続スクリーニングが十分であり、そして好ましい。後の周期のパニングでは、好ましくは、親ペプチド(野生型配列)が、受容体に結合するプラスミドと同時にインキュベーションされて、そして競合阻害剤として働く。この方式で、ディスプレイライブラリー上の高親和性配列のみが固定受容体に捕捉される。天然ペプチドよりむしろ、既に同定されている高親和性ペプチドまたは小分子を用いて、同じ競合阻害を好適に行うことも可能である。「パニング」法を一般的に記載する模式図に関しては図1を、そして特定の態様に関しては実施例7を参照されたい。この態様の選択プロセスは、好ましくは、低塩緩衝液中で行われ、これは塩濃度が高いと、Lac1-LacO複合体が不安定化され、そしてペプチドが誤ったプラスミドと会合するようになりうるためである。同じ理由から、パニング緩衝液は、好ましくは、Lac1をLacOにより緊密に結合させる、ラクトースを含有する。

【0098】

[000122] 本発明の選択プロセスは、各周期のパニングとともに、ますます高い親和性結合のペプチド配列同定を可能にする。例えば、パニングされないライブラリーの多様性は、以下の表IVに示す配列に似て、すなわち非常にランダム化されている可能性がある。連続周期の選択後、選択された付着ペプチドは、以下の表Vに示すものにより似ているであろう。

【0099】

表IV. パニングされていないGqライブラリーにおける多様性

【0100】

10

20

30

## 【表 4】

天然		2
クローン# 1	LQLNLKEYNLV	86
クローン# 2	LLLQLVEHTLV	87
クローン# 3	HRLNLLEYCLV	88
クローン# 4	EQWNMNTFHMI	89
クローン# 5	LRLLL*EYNLG	90
クローン# 6	RRLKVNEYKLL	91
クローン# 7	LQLRLREHNLV	92
クローン# 8	HVLNSKEYNQV	93

10

## 【 0 1 0 1 】

表 V . パニングされた G 1 1 ライブラリーにおける選択

## 【 0 1 0 2 】

## 【表 5】

		配列 番号
天然	LQLNLKEYNLV	2
ラウンド 1		
1	MKLVNSESNLV	94
2	LQTNQKEYDMD	95
3	LQLNPREDKLW	96
4	RHLDLNACNMG	97
5	LR*NDIEALLV	98
6	LVQDRQESILV	99
ラウンド 2		
1	LQLKHKENNLM	100
2	LQVNLEEYHLV	101
3	LQFNLNDCNLV	102
4	MKLKLEDNLV	103
5	HQLDLLEYNLG	104
6	LRLDFSEKQLV	105
ラウンド 3		
1	LQKNLKEYNMV	106
2	LQYNLMEDYLN	107
3	LQMYLRGYNLV	108
4	LPLNPKEYSLV	109
5	MNLTLKECNLV	110
6	LQQSLIEYNLL	111

20

30

40

## 【 0 1 0 3 】

50

[ 0 0 0 1 2 3 ] L a c I は、通常、四量体であり、そして最小機能 D N A 結合種は二量体である。したがって、融合タンパク質上、ペプチドが多価でディスプレイされ、協同する方式で、固定された受容体への結合が導かれる。この協同結合によって、固有の親和性が非常に低い結合事象の検出が可能になる。アッセイが高感度であることは、低親和性のヒットが最初に同定可能である点で好適であるが、E L I S A におけるシグナルが、結合したペプチドの固有の親和性にならずしも相関しない点が不都合である。

【 0 1 0 4 】

[ 0 0 0 1 2 4 ] シグナル強度が親和性とよりよく相関する 1 つの好ましい E L I S A は、クローン集団由来の目的の配列を、タンパク質、例えば大腸菌マルトース結合タンパク質 ( M B P ) をコードする遺伝子と、インフレイムで融合させることを伴う。配列が単量体融合タンパク質に移されたら、これを大腸菌で過剰発現し、そして受容体に結合したタンパク質を検出する E L I S A によるアッセイのため、または好適なアッセイいずれかのため、未精製溶解物として、または精製融合タンパク質としていずれかで用いることも可能である。望ましい場合、M B P に融合した T G G G リンカーのみを発現するベクターを単独で有するか、あるいは M B P に融合した G t : 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 R ペプチドを有する対照を用いることも可能である。凍結細胞ストックは、好ましくは、25%グリセロール中、-80 で維持される。好ましくは、生じるシグナルが、光活性化型ロドプシンに対するペプチドの親和性と相関する E L I S A によって、M B P に融合した高親和性 G ペプチドを解析する。M B P - ペプチド融合体を発現し、そしてアミロース・アフィニティーカラム上で精製し、そして目的のペプチドの相対的親和性を測定するのに用いる。バックグラウンドより少なくとも 2 標準偏差高い吸光度の試料は、高親和性結合ペプチドを含有すると見なされることも可能である。しかし、アッセイパラメーターおよび操作者の必要性に応じて、望ましい切捨て点いずれを用いることも可能である。

10

20

【 0 1 0 5 】

[ 0 0 1 2 5 ] 以下のように、適切な E L I S A を行うことも可能であるが、当業者はアッセイ中の条件に関して、技術を修飾することが可能であろう。一連の希釈の M B P - ペプチド融合タンパク質を、あらかじめ 0 . 1 % B S A でブロックした、固定された光活性化型ロドプシンを含む 9 6 ウェルプレートに添加する。37 で 1 時間インキュベーションした後、リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) / 0 . 1 % T w e e n 2 0 でウェルを洗浄し、そして抗 M P B 抗体、その後、西洋ワサビ ( h o r s e r a d i s h ) ペルオキシダーゼにコンジュゲート化したヤギ抗ウサギ抗体で探査した ( p r o b e d ) 。アッセイの発色を 2 0 分間進行させ、その後、マイクロタイタープレート読取装置上で、A<sub>450</sub> を測定する。その開示が本明細書に援用される、G i l c h r i s t ら, M e t h o d s E n z y m o l . 3 1 5 : 3 8 8 - 4 0 4 , 2 0 0 0 を参照されたい。

30

【 0 1 0 6 】

[ 0 0 0 1 2 6 ] 天然ペプチド、L a c I - ペプチド融合タンパク質、またはヘテロ三量体 G タンパク質を用いて、受容体上の結合部位に競合する能力を測定することによって、精製した融合タンパク質をさらに試験することも可能である。競合 E L I S A の使用によって、固定された受容体への個々の融合タンパク質の結合に関して、I C<sub>50</sub> 値を計算することが可能になる。

40

【 0 1 0 7 】

[ 0 0 0 1 2 7 ] 融合タンパク質同時インキュベーションを用いて、より低い親和性のペプチド融合タンパク質が G P C R に結合するのを防止する、競合 E L I S A 形式でペプチド融合タンパク質を解析することも可能である。ペプチド結合に干渉しない、好適なタンパク質いずれかが使用可能であり、これらには、例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質またはユビキチンが含まれるが、M B - G t 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 R などのマルトース結合タンパク質融合タンパク質が好ましい。競合 E L I S A は、どのペプチド配列が、光活性化型ロドプシンに最高の親和性を有するかを示す。いくつかの異なるアッセイ形式が適切である。例えば、合成 G t : 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 R ペプチドを用いて、結合に関して、G 高親和性ペプチドを含有する M B P 融合タ

50

ンパク質と競合させることも可能である。さらに、G 高親和性ペプチドを含有するMBP融合タンパク質を用いて、光活性化型ロドプシンへの結合に関して、LacI-Gt:340-350K341Rペプチド融合タンパク質と競合させることも可能である。組換えヘテロ三量体Gtもまた、高親和性ペプチドに対して試験することも可能である。一定濃度のMBP-Gペプチド融合タンパク質を、天然ペプチド、LacI-Gtペプチド融合タンパク質または組換えヘテロ三量体Gtの連続希釈によって競合するELISA形式を用いて、変異体ペプチドの相対的親和性を評価することも可能である。ウェルを好適に抗MBP抗体で探査して、結合したままであるMBP-Gペプチド融合タンパク質の量を測定することも可能である。非線形回帰によって用量-反応曲線を解析して、EC<sub>50</sub>を計算することも可能である。

10

## 【0108】

[000128]ライブラリーをpJS142にクローニングして、ライブラリーのランダムコード領域の始まりの近傍にBspEI制限部位を生成する。好適に、BspEIおよびScaIで消化すると、900塩基対のDNA断片の精製が可能になり、この断片をpELM3にサブクローニングすることも可能であり、このベクターは、MBP融合タンパク質を、還元環境である細胞質に導く。あるいは、pELM15に、この断片をクローニングすることも可能であり、このベクターは、MBP融合タンパク質を、酸化環境である周辺質に導く。pELM3およびpELM15は、それぞれ、pMALc2ベクターおよびpMALp2ベクターの単純な修飾物であり、商業的に入手可能である(New England Biolabs)。pELM3をAgeIおよびScaIで消化すると、pJS142ライブラリーからBspEI-ScaI断片を効率的にクローニングすることが可能になる。望ましい結果を達成するのに好適な、適切な方法いずれを用いることも可能である。これらの方法の修飾は、分子生物学の当業者に周知であり、そして本明細書での使用に意図される。

20

## 【0109】

[000129]ヘテロ三量体Gタンパク質の存在下、競合結合アッセイを用いて、高親和性ペプチドが、GPCRに競合的に結合し、そしてGタンパク質の認識に干渉するか、または該認識を増進するという証明を得ることも可能である。例えば、スクリーニングに用いるGPCRがロドプシンである場合、ヘテロ三量体Gタンパク質、トランスデュシン(Gt)が使用可能である。Gtは、多数のエピトープでロドプシンに結合し、そしてサブユニットのミリストイル化およびサブユニット・カルボキシル末端のファルネシル化を介して膜に結合する。カルボキシル末端天然ペプチドLacI構築物および/またはヘテロ三量体Gtによる結合が劣っていれば、MBP-ペプチド融合タンパク質が高親和性で結合することが示される。Gサブユニットいずれか、例えばGi、GsおよびGqに対するカルボキシル末端ペプチドライブラリーを用いて、GPCRいずれか、例えばトロンピン受容体(PAR1、PAR3、PAR4)、ドーパミン受容体(D1、D2、D3、D4、D5)、バソプレッシン受容体(V1a、V1b、V2)およびヒスタミン受容体(H1、H2、H3)に結合する高親和性ペプチドを決定するために、パニング、ペプチド合成および結合研究の類似の戦略を使用することも可能である。より高い結合親和性のペプチド類似体が解明されたら、これらを利用して、GPCR-Gタンパク質相互作用を阻害することも可能である。

30

40

## 【0110】

[000130]この方法によって選択される、高親和性で、望ましいGPCR仲介シグナル伝達事象の特異的遮断または増進に特徴付けられるペプチドを、GPCR活性を修飾することによって利益を得る障害を治療する、伝統的な薬剤または遺伝子治療などの療法剤として用いるか、あるいは高親和性ペプチド類似体と競合するか、または高親和性ペプチド類似体もしくは高親和性ペプチド類似体-融合タンパク質の結合親和性を調節する(すなわち増加させるかまたは減少させる)ことが可能な化合物のさらなるライブラリーをスクリーニングするのに用いることも可能である。

## 【0111】

50

[000131]スクリーニング用の小分子ライブラリーを選択し、そして合成するための、当該技術分野に知られる方法はいずれも、本発明での使用に意図される。スクリーニングしようとする小分子を、コンビナトリアル・ライブラリーの形で、好適に収集する。例えば、薬剤様小分子ライブラリー、例えば - ターン模倣ライブラリー等を、例えば ChemDiv (<http://www.chemdiv.com>)、Pharmacopia (<http://www.pcop.com>) または CombiChem (<http://www.combichemlab.com>) から購入することも、あるいは合成することも可能であるし、そしてこうしたライブラリーは、その開示が本明細書に援用される、Tietze および Lieb, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 363-371, 1998; Carrell ら, Chem Biol. 2: 171-183, 1995; 米国特許第 5,880,972 号、米国特許第 6,087,186 号および米国特許第 6,184,223 号に記載される。

10

## 【0112】

[000132]当該技術分野に知られるこれらのライブラリーはいずれも、スクリーニングに適しており、ランダムライブラリーまたは個々の化合物も同様である。一般的に、親水性化合物は、より容易に溶解し、より容易に合成され、そしてより容易に化合するため、こうした化合物が好ましい。約 500 の平均分子量を有する化合物が、しばしば、最も有用であるが、この範囲外の化合物、またはこの範囲から遠く外れた化合物であってもまた、使用可能である。一般的に、約 5.0 の  $\log P$  スコアを有する化合物が好ましいが、該方法は、すべての種類の化合物で有用である。Lipinski の「5 のルール」のような単純なフィルターは、予測値を有し、そしてこうしたフィルターを用い、生物学的に利用可能な小分子のみを用いることによって、本発明のこの戦略によって発見されるリード化合物の品質を改善することも可能である。Lipinski ら, Adv. Drug Delivery Rev. 23: 3-25, 1997 を参照されたい。

20

## 【0113】

[000133]薬剤標的に対して、コンビナトリアル・ケミストリー小分子「ライブラリー」をスクリーニングすることも可能である。この考え方は、化学構造が多様であれば、 $10^{20}$  のありうる小有機分子の干草の山から、1本の針を見つける見込みが増加するというものである。これらのコレクションは、新規の容易に入手可能なリード化合物の優れた供給源を提供する。例えば、ChemDiv は、Diversity Collections (小分子ライブラリー) を設計する際に、800 より多い個々の化学コア、ユニークな構築ブロックライブラリー、および自社 (proprietary) 化学反応を用いて、1年に 80,000 ~ 100,000 の化合物を組み立てる。200 ~ 400 の化合物のセットである CombiLab リード化合物ライブラリーもまた、フォローアップとして産生することも可能である。さらに、ChemDiv の化合物は、「薬剤類似性定義」(群類似性および進歩した神経ネットアプローチ) の自社アルゴリズム、並びに分配係数、溶解度、解離係数、および急性毒性などの ADME & T (吸収、分布、代謝、排出および毒性) 特性予測のための多様な知的な装置にしたがって調整され、薬剤に対する類似性を確実にするよう設計される。

30

## 【0114】

[000134]したがって、新規小分子ライブラリーの集中的合成は、最初のリード化合物に構造的に関連する多様な化合物を提供することも可能であり、こうした化合物をスクリーニングして、最適な構造を選択することも可能である。好ましくは、 $pK_a$ 、 $\log P$ 、大きさ、水素結合および極性などの特性に基づいて、「薬剤様」であると予測される化合物ライブラリーを選択する。第一の工程で高親和性ペプチドを生じ、そして続く工程で小分子を生じる本発明の多工程アプローチは、通常のハイスループット・スクリーニング法では選択され、そしてアッセイされなければならない、より低い親和性の小分子を除去することによって、人為的ヒットの数を減少させる。さらに、該アプローチは、受容体上のあらゆる部位への結合に関するスクリーニングよりむしろ、Gタンパク質を模倣するペプチドの結合を調節することが可能な分子に関する検索に重点を置く。この技術の

40

50

他の利点は、実行するのが簡単であり、多くの異なる種類の受容体に受け入れられ、そして非常に大きい化合物ライブラリーを迅速にスクリーニング可能であることである。

【0115】

[000135] いかなる供給源由来の受容体を用いても、ペプチドまたは小分子のスクリーニングを好適に行うことが可能である。一般的に、細胞から受容体を精製し、そして液体小胞中で受容体を再構成するか、あるいは受容体を発現するかまたは過剰発現する昆虫細胞または哺乳動物細胞から単離した膜を使用することが好適である。PAR1およびロドプシンが好適な受容体であるが、本発明で使用するのに適したいかなる受容体も意図される。スクリーニングに用いる受容体を天然供給源から精製するか、または受容体を過剰発現する細胞から精製し、そして液体小胞中で再構成することも可能である。受容体を天然に発現する細胞、例えば、PAR1を発現するSf9細胞から、あるいは受容体を発現するよう遺伝子操作されている細胞、例えばPAR1を過剰発現する哺乳動物細胞または昆虫細胞から、受容体を含む膜を精製することも可能である。3つの異なる方法によって発現された受容体(PAR1)をスクリーニングすることから同定されたペプチドを、表XI、XII、およびXIIIに示す。結果によって、こうした方法が、高い度合いの保存を示す、類似の結果を生じることが示され、(N348; L349)が、受容体発現の3つの方法すべてで同定されている。最初に、ペプチドまたは小分子をスクリーニングしようとする、ペプチド融合タンパク質または高親和性ペプチドの結合親和性を決定することが好適である。これによって、アッセイ中の受容体およびペプチドMBPペプチド融合タンパク質または小分子の量を最適化することが可能になる。

10

20

【0116】

[000136] 一般的に、1ウェル - 1化合物アプローチを用いて、ライブラリーを試験して、ペプチド融合タンパク質または高親和性ペプチドと、受容体への結合に関して競合する化合物を同定することが好適である。ウェルあたり単一の化合物を、各約1 $\mu$ Mで、または試験しようとする化合物およびペプチドに対する受容体の親和性に応じた好適な濃度いずれかで用いることも可能である。化合物を試験のためプールすることも可能であるが、このアプローチはデコンボリューション(decoupling)を必要とする。ウェルあたり約2 ~ 約100以上の化合物の群で、またはウェルあたり約10 ~ 約50化合物の群で、各約10nMで、または試験しようとする化合物に対する受容体の親和性に応じた、好適な濃度いずれかで、化合物をプールすることも可能である。望ましい場合、いくつかの異なる濃度を用いることも可能である。最初の例では、スクリーニングされるペプチドのメンバーは層状(layer)のため、望ましくは、プールするアプローチを用いて、ペプチドをスクリーニングする。ペプチドを個々にスクリーニングすることも可能であるが、好ましくは、ウェルあたり約10<sup>4</sup> ~ 10<sup>12</sup> ペプチド、またはウェルあたり約10<sup>8</sup> ~ 10<sup>10</sup> ペプチド、または最も好ましくはウェルあたり約10<sup>9</sup> ペプチドのプールでスクリーニングする。

30

【0117】

[000137] ELISA、あるいは蛍光アッセイまたはラジオイムノアッセイなどの他の好適なアッセイいずれかを用いて、(1)各ウェル中、1以上のペプチドが、高親和性ペプチド融合タンパク質または高親和性ペプチドによる結合の量を減少させるかどうか、あるいは(2)各ウェル中、1以上のペプチドが受容体に結合するかどうかを決定することも可能である。化合物を一連の濃度で試験することもまた可能であるし、そしてこれは、ペプチドまたはペプチド融合タンパク質の親和性が知られていない場合、一般的に好ましい。ELISAにおいて、OD<sub>450</sub>が対照ウェル(試験化合物なし)の半分以下であるウェルは、一般的に「陽性」と見なされ、そしてこれをさらに研究することも可能である。しかし、アッセイ構成要素およびアッセイの目的に応じて、適切な切捨て点いずれを用いることも可能である。

40

【0118】

[000138] マイクロタイターウェル、バイオチップ、または好適なアッセイ表面いずれか上に固定した望ましいGPCRを用いて、高親和性ペプチド類似体に対するスク

50

リーニングを行うことも可能である。溶液中で行う結合アッセイもまた、適切である。1つ、いくつか、または数千の候補小分子薬剤化合物を、高親和性ペプチド類似体の存在下または非存在下で、受容体への結合に関してスクリーニングすることも可能である。好ましくは、高親和性結合ペプチドの存在下でアッセイを行い、結合に関して、高親和性結合ペプチドに競合するのに成功しうる候補化合物のみが、受容体に捕捉されることを確実にする。あるいは、高親和性ペプチド類似体の存在下でのスクリーニングによって、競合的に結合することが同定された有機化合物または小分子を、さらにより高い親和性を持つさらなる小分子候補化合物に関するスクリーニングにおいて、リード化合物として用いることもまた可能である。どちらのスクリーニングプロセスにおいても、好適な方法いずれかによって、例えばELISA、蛍光アッセイまたはラジオイムノアッセイによって、結合を検出することも可能である。

10

## 【0119】

[000139] 2工程プロトコルを用いて、Gタンパク質シグナル伝達を遮断する化合物を同定することによって、強力で、そして強く結合する化合物のみが選択されるため、化合物のハイスループット・スクリーニングおよび選択された化合物の性質決定は、時間および費用両面で有意に負担が軽減される。Gタンパク質共役型受容体上の結合部位に関して、Gタンパク質と強く競合する高親和性ペプチドを同定する、第一の工程がこのことを確実にするが、これは高親和性ペプチドが、特定の望ましい結合特異性、細胞系内で機能を修飾する能力、および*in vivo*で機能を修飾する能力を持つように設計され、そしてこうしたことに関して試験されるためである。

20

## 【0120】

[000140] 好ましくは、最も強い結合および有効なペプチド類似体または小分子のみが第二のまたは続くスクリーニング工程で用いられる。慣用的なハイスループット・スクリーニング法を用いた場合には、検出され、そして次いでさらに研究されていたであろう、より低い親和性の小分子を排除することによって、この2工程または多工程プロトコルは、偽陽性の数、および弱くしか結合しない化合物の同定を減少させる。この方法は、したがって、実行するのに単純で、安価であり、2、3の構成要素のみからなり、多くの異なる種類の受容体に受け入れられ、そして大きな化合物ライブラリーを迅速にスクリーニングすることが可能である。この方法は、受容体作用の阻害剤または増進剤、例えばトロンピン受容体修飾剤、ドーパミン受容体修飾剤、ヒスタミン受容体修飾剤、またはバソプレッシン受容体修飾剤として機能する、新規種類の小有機ペプチド擬似体分子を効率的に同定することを可能にする。これらの同定された化合物は、単一のGPCR、GPCR種をターゲットとするか、あるいはGPCRに活性化される単一のGタンパク質経路を遮断するかまたは増進することも可能である。

30

## 【0121】

[000141] 既知の方法いずれかにしたがって、療法剤として使用するため選択された化合物(ペプチドまたは小分子いずれか)の徹底的な評価を進めることも可能である。 $pK_a$ 、 $\log P$ 、サイズ、水素結合および極性などの、化合物の特性は、有用な情報である。本発明の方法による同定前に、すでに有用な化合物であることが知られていないならば、これらを容易に測定するか、または例えば2D関連表(*connection table*)から計算することも可能である。適切な結合実験によって、会合/解離速度定数を決定することも可能である。吸収および毒性などのパラメータもまた、測定することも可能であり、それとともに、生物学的活性の*in vivo*確認を行うことも可能である。当該技術分野に知られる方法にしたがって、小分子用に、スクリーニングを最適化することも可能である。さらに、陽性を迅速に解析することを可能にするデータ提示のソフトウェア系を用いることが好ましい。実施例36および図2を参照されたい。

40

## 【0122】

[000142] 当該技術分野に周知の方法にしたがって、本発明のスクリーニングによって同定されたペプチドまたは小分子を、適切な薬剤賦形剤または薬剤賦形剤の組み合わせいづれかとともに、配合することによって、薬剤調製物を調製する。静脈内、筋内、

50

皮下、経口、直腸、膺、経皮、経粘膜、舌下等の経路いずれかによる投与のため、調製物を作成することも可能であるが、一般的に、ペプチド調製物には、非経口経路が好ましい。いかなる適切なビヒクルを用いることも可能であり、静脈内投与には、例えば生理食塩水または乳酸加リンゲル液を用いることも可能である。

【0123】

[000143] GPCR 関連疾患または状態の治療のための投薬量は、障害の性質、関与する GPCR、投与経路、患者の全身肉体的状態および健康状態に関する要因、並びに治療する医師の判断に応じるであろう。当業者は、これらの要因をよく知っており、そして最適な結果を得る投薬量の操作は日常的と見なされる。一般的に、静脈内投与のための投薬量は、約  $0.01 \text{ mg/kg} \sim 1000 \text{ mg/kg}$  の間で多様であることが可能であるが、この範囲は、患者の必要性に応じて拡大可能である。こうした拡大された範囲は、本発明の範囲内と見なされる。

10

【0124】

[000144] あるいは、本発明記載のペプチドを、発現構築物の搬送によって、細胞に、*in vivo* または *ex vivo* で、提供することも可能である。遺伝物質を直接導入して、遺伝子治療を *in vivo* で行うことも可能である。*in vivo* 遺伝子移入は、体内で該ペプチドが見られる部位の細胞、例えば腕の皮膚細胞に、または遺伝子移入ベクターの吸入後、肺上皮細胞に、ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを導入するであろう。あるいは、患者から一時的に取り除かれた生存細胞に遺伝子を移入し、そして次いで、治療後に戻す、*ex vivo* 遺伝子移入（例えば骨髄細胞）もまた使用可能である。

20

【0125】

[000145] 特定の組織または細胞に進入するように、遺伝子移入ベクターを操作することも可能である。形質導入ターゲティングは、遺伝子移入ベクターが、特定の細胞表面受容体と相互作用することを可能にする。形質導入ターゲティングはまた、腫瘍細胞などの迅速に分裂する細胞をターゲットとする遺伝子移入ベクターを用いることによって、細胞分裂速度を利用することも可能である。転写ターゲティングは、別個の細胞プロモーターおよびエンハンサー要素を補充して、療法遺伝子の転写に影響を及ぼす。遺伝子を特定の細胞に搬送するのを補助する、モノクローナル抗体、炭水化物リガンド、およびタンパク質リガンドで、ベクターを操作することによって、トランスフェクション効率もまた、増進される。

30

【0126】

[000146] 細胞内で高親和性ペプチドを産生するのに用いる遺伝子移入ベクターは、ウイルスベクター（例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、単純疱疹ウイルス、またはワクシニアウイルス）であることも可能である。代替法として、非ウイルスベクターを用いることもまた可能であり、これらには、裸の DNA の注入、あるいは陽性荷電脂質、または陽イオン性リポソームへの付着による DNA またはペプチドの導入、エレクトロポレーションあるいは弾道 (*ballistic*) DNA 注入 (*ex vivo* 適用に限定される) とともに、分枝ペプチドの導入などの方法が含まれる。

【0127】

[000147] 脳心筋炎ウイルス由来の内部リボソーム進入部位 (IRES) に駆動される GFP を同時発現する天然 C 末端配列の Tet 誘導性レトロウイルスベクター (*p-Tet-Ti-GFP*) を用いることも可能である。これらのベクターが高親和性ペプチド配列をコードするように、修飾することも可能である。さらに、空間的発現または時間的発現を可能にする配列によって、高親和性ペプチドを駆動することも可能である。*in vitro* 研究のため、血清不含培地中の GP-293 (*Clontech*) など、汎親和性生産株からウイルス上清を収集することも可能である。4、22,000 rpm で 2 時間、超遠心することによって、ウイルス上清を濃縮し、そして少なくとも  $10^8$  IU (感染単位) / ml の力価で、血清不含培地中、元来の体積の 1/100 に、ペレットを再懸濁し、そして -80 で保存することも可能である。

40

50

## 【0128】

[000148] ネズミ白血病ウイルス (MLV) 由来レトロウイルスベクターは、上皮細胞に療法遺伝子を安定して搬送するために一般的に用いられるビヒクルである。in vivo のレトロウイルス研究のため、Tet 誘導性であり、そして脳筋炎ウイルス由来の内部リボソーム進入部位に駆動される GFP を同時発現する、複製不全ネズミモロニーレトロウイルスベクター (pTet-GFP) に、高親和性ペプチドを好適にサブクロニングする。次いで、これらの構築物を、産生株に一過性にトランスフェクションして、 $10^6 \sim 10^{10}$  IU/ml の細胞不含力価を生じることが可能である。必要な場合、水疱性口内炎ウイルス由来のエンベロープ糖タンパク質である、VSV-G を利用する、汎親和性レトロウイルス発現系 (GP-293; Clontech) を利用して、低トランスフェクション効率を克服することも可能である。細胞に基づくこの革新的遺伝子移入法を用いることによって、安定した、長期の、そして局所化された、高親和性 C 末端ペプチドの遺伝子発現を得ることが可能である。

10

## 【0129】

[000149] この方法によって同定された化合物が、in vivo で、疾患症候群に關与する G タンパク質シグナル伝達事象を調節可能であることを、最終的に立証するため、選択的 G タンパク質シグナル伝達事象との拮抗または該事象の増進を確認することも可能である。化合物が天然 G タンパク質結合と競合する能力を試験する 1 つの方法は、受容体を所持する細胞において、受容体-G タンパク質界面を遮断するペプチドを発現することを伴う。多様な G サブユニット由来のカルボキシル末端ペプチド配列 (表 VI を参照されたい) などの GPCR 結合領域ペプチドをコードするプラスミド構築物を用いて、選択的 GPCR 遮断の代謝上の効果を定性的および定量的に研究可能であるように、こうした構築物を in vivo、ex vivo または in vitro で、細胞において発現させることも可能である。こうした研究は、化合物が所持する結合が、in vivo で選択的 G タンパク質シグナルを調節するのに有用であることの立証を提供する。

20

## 【0130】

[000150] 実施例 23 および実施例 24 に記載するものなどの方法により、ミニ遺伝子アプローチを用いて、ペプチドの発現が好適に達成されるが、いかなる適切な方法を用いることもまた可能である。ミニ遺伝子ベクターは、ハイスループット・スクリーニング前に、細胞系において、高親和性ペプチドを評価することを可能にする。これらの方法を用いて、いかなる望ましいペプチド配列を発現することも可能である。当業者は、高親和性ペプチド類似体を含むタンパク質およびペプチド構築物の構築、トランスフェクションおよび発現の代替法をよく知っており、そしてこうした方法は、本発明の方法とともに使用することが意図される。

30

## 【0131】

[000151] ヒト胚性腎細胞を、好適に、10% ウシ胎児血清 (Gibco)、および Pen/Strep ( $5000 \text{ U/ml}$ ;  $5000 \mu\text{g/ml}$  / Gibco) を含む DMEM (Gibco) 中、95% 空気 / 5%  $\text{CO}_2$  の大気中で、37 で培養する。トランスフェクション前日に細胞を 60~70% の密度で蒔き、そして Qiagen の Effectene キットを用いて、挿入物を含む pcDNA3.1 ベクター (pcDNA3.1-高親和性ペプチド) またはベクター単独の DNA ( $3 \mu\text{g}$ ) で 1.5 時間、一過性トランスフェクションすることも可能である。トランスフェクション後、細胞を 1 回洗浄した後、完全 HMEC 培地を添加する。必要な場合、トランスフェクション 48 時間後に、培地にネオマイシンを添加することによって、ミニ遺伝子を所持する細胞の選択を行うことも可能である。トランスフェクションの効率を監視するため、細胞を GFP プラスミド (Clontech) でトランスフェクションする。必要な場合、 $300 \mu\text{g/ml}$  ジェネチン (G418) を用いて、トランスフェクタントを選択することも可能である。mRNA 発現に関して、逆転写 (RT) PCR およびノーザンブロット解析を用いて、HEK トランスフェクタント中のベクターの発現を確認することも可能であり、そして先に記載されるような HPLC によって、ペプチド発現を性質決定することも可能である

40

50

。その開示が本明細書に援用される、Gilchrist, Methods Enzymol. 344: 58-69, 2002を参照されたい。

【0132】

表VI. C末端ミニ遺伝子ペプチドの典型的な配列

【0133】

【表6】

ペプチド名	配列	配列番号:
Gαi	MGIKNNLKDCGLF	112
GαiR	MNGIKCLFNDKL	113
Gαq	MGLQLNLKEYNAV	114
Gαq**	MGLQLNLKEYNTL	115
Gα12	MGLQENLKDIMLQ	116
Gα13	MGLHDNLKQLMLQ	117

10

【0134】

[000152]上に論じるように、多くの受容体が多数のGタンパク質と相互作用し、そしてこれを活性化する。高親和性結合カルボキシル末端ペプチドを細胞に導入する、ミニ遺伝子戦略を用いて、個々のGタンパク質との特異的Gタンパク質共役型受容体の相互作用を阻害し、こうして本発明の方法によって同定された化合物を用いた、*in vivo*での特異的Gタンパク質遮断の実現可能性を立証することが可能である。多数のGタンパク質を活性化する受容体は、各々特定の反応セットを仲介するシグナル伝達経路の別個のセットを活性化するため(例えばトロンピン受容体)、実質的に他の経路に影響を及ぼさずに、1つの経路を阻害することも可能である。

20

【0135】

[000153]受容体-Gタンパク質界面を遮断するペプチドを発現することによって、*in vivo*でGタンパク質シグナル伝達事象と選択的に拮抗するため、哺乳動物細胞へのトランスフェクション後、多様なGサブユニットのC末端ペプチド配列を発現するように、ミニ遺伝子プラスミドベクターを設計した。ランダムな順序でG<sub>i1/2</sub>のカルボキシル末端をコードする、対照ミニ遺伝子ベクターもまた生成した(G<sub>iR</sub>、表VIを参照されたい)。*in vivo*で細胞内シグナル伝達経路を効果的に遮断するため、ミニ遺伝子アプローチに必要な1つの重要な要素は、望ましいペプチドが適切な量で発現されることである。したがって、mRNA、タンパク質または両方を検出する好適な方法によって、ミニ遺伝子発現を確認しなければならない。当該技術分野に知られるいかなる好適な方法を用いることも可能である。

30

【0136】

[000154]GPCR結合ペプチドを発現するミニ遺伝子アプローチが細胞に及ぼす効力を決定するため、そして他の経路が影響を受けずに、既定の受容体が活性化するシグナルに反応する、1つのGタンパク質経路が、特異的に阻害されることを示すため、測定可能な細胞性シグナル伝達終点を示すように設計した系において、化合物を好適にアッセイすることも可能である。こうした系の1つの例は、内皮細胞における、トロンピン受容体、PAR1である。この受容体は、多数のGタンパク質を活性化する。誘導されるPAR1遺伝子発現の転写解析; [Ca<sup>2+</sup>], MAPキナーゼ(「MAPK」)活性、アデニルシクラーゼ活性、およびイノシトールリン酸集積を含む、エフェクター分子の生化学的解析; それとともに細胞増殖および内皮浸透性などの機能アッセイを含む、いくつかのシグナル伝達終点が、この受容体でのリガンド結合による、異なるGタンパク質の特異的活性化または活性化の調節を測定するのに利用可能である。いかなる好適な方法によって、シグナル伝達活性を測定することも可能であり、これらの方法には: イノシトールリン酸集積測定; 細胞内カルシウム濃度レベル測定; 経内皮電気抵抗測定; ストレスファ

40

50

イパー形成測定；リガンド結合（アゴニスト、アンタゴニスト、逆アゴニスト等）測定；受容体発現測定；受容体脱感作測定；キナーゼ活性測定；ホスファターゼ活性測定；核転写因子測定；細胞遊走（走化性）測定；スーパーオキシド形成測定；一酸化窒素形成測定；細胞脱顆粒測定；GIRK活性測定；アクチン重合測定；血管狭窄測定；細胞浸透性測定；アポトーシス測定；細胞分化測定；プロテインキナーゼCなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の膜会合の測定；プロテインキナーゼCなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の細胞質ゾル集積の測定；srcなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の細胞質ゾル集積の測定；およびRanなどの、GPCR活性化に際して転位置するタンパク質の核会合の測定が含まれる。経内皮電気抵抗（TEER）の変化によって測定されるような、トロンピンが誘導する細胞退縮の機構におけるG<sub>i</sub> C末端ミニ遺伝子の機能的影響もまた、Gタンパク質阻害測定に使用可能である。

10

## 【0137】

【000155】例えば、G<sub>i</sub>ミニ遺伝子構築物を発現するヒト微小血管内皮細胞（HMEC）において、トロンピンが仲介するPAR1遺伝子誘導が阻害された。しかし、G<sub>q</sub>ミニ遺伝子構築物の発現は、トロンピンが仲介するイノシトールリン酸集積に影響を及ぼした。G<sub>q</sub>の発現はまた、トロンピンが誘導する細胞内[Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>上昇およびトロンピンが誘導するMAPK活性をとともに特異的に減少させた。

## 【0138】

【000156】HMECにおけるG<sub>i</sub>機構のトロンピン活性化は、イソプロテレノール（G<sub>s</sub>を通じて作用する）に反応して増加するcAMPレベルを減少させる。GPCR結合ペプチド発現が、G<sub>i</sub>シグナル伝達を遮断することを示すため、イソプロテレノール単独に反応するcAMPレベル増加に関するアッセイを、G<sub>i</sub>を発現する細胞におけるトロンピン・プレインキュベーション後の増加に比較することも可能である。

20

## 【0139】

【000157】Gohlaら、J. Biol. Chem. 274: 17901 - 17907, 1999による最近の研究は、トロンピン受容体が、EGF受容体から独立した方式で、G<sub>12</sub>を介してストレスファイバー集積を誘導することを手際よく立証した。ストレスファイバー形成は、Rho依存性であるようである。G<sub>12</sub>およびG<sub>13</sub>はどちらも、Rhoシグナル伝達経路に関連付けられてきている。したがって、HMECにおけるG<sub>12</sub>およびG<sub>13</sub> GPCR結合ペプチドの発現を用いて、これらのペプチドが、トロンピンに反応したストレスファイバーの出現を遮断可能であるかどうか決定した。

30

## 【0140】

【000158】分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）の細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）サブファミリーは、増殖および分化に関する多くの細胞シグナル伝達事象を制御する。これは、GPCR結合ペプチドが、特定のGタンパク質仲介経路に影響を及ぼしうるかどうかを決定しうると、別のアッセイの基礎を形成する。HA-MAPKとともにGPCR結合ペプチドをコードするミニ遺伝子でHMEC細胞をトランスフェクションした後、HA-MAPKを免疫沈降すると、GPCR結合ペプチドを発現する細胞に対する影響のみを測定することが可能になる。

40

## 【0141】

【000159】多くの研究によって、M<sub>2</sub> ムスカリン性受容体（mAChR）がG<sub>i</sub>/G<sub>O</sub>ファミリーにのみ共役することが示されている。Dell'Acquaら、J. Biol. Chem. 268: 5676 - 5685, 1993; Laiら、J. Pharm. Exp. Ther. 258: 938 - 944, 1991; Offermannsら、Mol. Pharm. 45: 890 - 898, 1994; Thomasら、J. Pharm. Exp. Ther. 271: 1042 - 1050, 1994を参照されたい。最後の5アミノ酸が、G<sub>i</sub>またはG<sub>O</sub>由来の対応する残基で置換されている、突然変異体G<sub>q</sub><sup>\*\*</sup>にM<sub>2</sub> mAChRが効率的に共役可能であり、このことは、この受容体が、G<sub>i</sub>/G<sub>O</sub>サブユニットのカルボキシル末端に特異的に認識されるドメインを含有することを

50

示唆する。Liur, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11642 - 11646, 1995を参照されたい。

【0142】

[000160] ミニ遺伝子構築物を用いて発現されたカルボキシル末端Gペプチドによる、Gタンパク質共役型受容体仲介細胞性反応の阻害を試験するため、百日咳毒素感受性M<sub>2</sub> mAChRに制御される、Gに直接活性化される原型チャネル(GIRKチャネル)がモデルとして選択された。このモデルでは、Gカルボキシル末端および下流エフェクター系の重要性がよく確立されている。Krapivinskyら, J. Biol. Chem. 270: 29059 - 29062, 1995; Krapivinskyら, J. Biol. Chem. 273: 16946 - 16952, 1998; Sowellら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7921 - 7926, 1997を参照されたい。カリウム流を内向きに整流するM<sub>2</sub> mAChR活性化の阻害を試験して、Gカルボキシル末端ペプチド・ミニ遺伝子で一過性にトランスフェクションした細胞、または高親和性Gペプチドに対してスクリーニングすることによって同定された薬剤化合物で処理した細胞上のGPCRのアゴニスト刺激後の下流機能性反応の阻害を立証することも可能である。

10

【0143】

[000161] GIRKチャネルは、多くの興奮性細胞における電気活性を調節する。Breitwieserら, J. Membr. Biol. 152: 1 - 11, 1996; Janら, Curr. Opin. Cell Biol. 9: 155 - 160, 1997; Wickmanら, Curr. Opin. Neurobiol. 5: 278 - 285, 1995を参照されたい。チャネルは、Gの直接相互作用の結果開放されるため、I<sub>K(ACh)</sub>の全細胞パッチクランプ記録を用いて、Gカルボキシル末端ペプチド・ミニ遺伝子で一過性にトランスフェクションした細胞、または高親和性Gペプチドに対してスクリーニングすることによって同定された薬剤化合物で処理した細胞上のGPCRのアゴニスト刺激後の下流機能性反応の阻害を立証することも可能である。GIRK1/GIRK4を発現する細胞をそのリガンドであるアセチルコリン(ACh)で灌流すると、カリウム流の内向き整流が活性化される。

20

【0144】

[000162] *in vivo*の細胞性結果の指標となることが認められた、よく確立された受容体モデルを用いて、この種のデータは、既定のGPCRを介して活性化される個々のGタンパク質が、細胞事象を仲介する際に特定の役割を有し、そして個々のGサブユニットのGPCR結合領域を模倣するリガンドによって、特異的方式で調節されることを示すことも可能である。特に、多数のGタンパク質を活性化し、こうしたGタンパク質の各々が特定の反応セットを仲介するシグナル伝達経路の別個のセットを活性化する、トロンピン受容体などの受容体では、本発明の方法を用いて、1つの経路を遮断する一方、すべての他の経路を機能するままにしておくことが可能である。連続アフィニティ精製および競合結合によって*in vitro*で同定された高親和性ペプチド類似体は、Gタンパク質シグナル伝達の下流の結果を特異的に阻害することが可能である。

30

【0145】

[000163] 上に記載するアッセイは、*in vitro*競合結合研究によって同定された化合物が、GPCRが細胞内で多数のGタンパク質を制御する場合であっても、特定のGPCR-Gタンパク質相互作用を選択的に調節する能力を、明らかに立証する。さらに、該ペプチドは、非常に有効に天然配列と競合する。さらに、上に記載し、そして以下の実施例に例示する、ミニ遺伝子アプローチは、内皮浸透性の増加の機構に関与することも可能なG<sub>12</sub>およびG<sub>13</sub>などの他のGタンパク質の役割を体系的に試験することを可能にし、そしてこのアプローチが、Gサブユニット調節化合物を選択し、そして同定しうることを明らかに立証する。したがって、該ペプチドは、Gタンパク質シグナル伝達が過剰であることに特徴付けられる障害または症候群いずれの治療で使用するのに適している。

40

50

## 【0146】

[000164]別の側面において、本発明は、本発明が提供する物質を用いて、特定のオーファン受容体が共役するGタンパク質を同定する方法に関する。例えば、記載する方法を用いて、GPCRいずれかを、一連のGサブユニットペプチドと試験して、どの種のGタンパク質(単数または複数)が、受容体の効果を仲介するかを決定することも可能である。実施例12~14に記載する方法が適切である。当業者は、これらのアッセイを指針として用いて、他のアッセイ、または変動および修飾を設計することが可能である。

## 【0147】

[000165]多くのコンホメーション状態で、ロドプシンを分光光度的に測定することも可能である。高親和性で生物学的に活性であるロドプシン状態は、「エキストラ」MIIアッセイによって、前駆体MIから容易に区別可能である。実施例35を参照されたい。このアッセイは、MIIが、高pHおよび低温の条件下、Gtの存在下で安定化され、そして分光光度的に測定可能であるという観察に基づく。C末端ペプチドがヘテロ三量体Gtと同じ方式で、MetaIIを安定化する能力があることから、活性化された受容体のアゴニスト結合部位とGタンパク質の相互作用の構造的基礎を調べるツールが提供される。

## 【0148】

[000166]本発明の1つの態様にしたがった、スクリーニングの基本骨格は、Gタンパク質を模倣するか、またはGPCRの活性コンホメーションを安定化させる、高親和性ペプチドの結合を増加させる小分子を同定することも可能である。これらの小分子は、適切な用量曲線を有し、そして低 $\mu\text{M}$ 範囲の $\text{EC}_{50}$ を有する。尿素洗浄桿体外節の試料は、Gタンパク質が添加されなければ、典型的には、ほとんどまたはまったく( $<5\%$ )安定化されないが、スクリーニングの一例において、本発明によって同定された小分子は、ロドプシンの活性(シグナル伝達)コンホメーション(MII)を安定化させる。小分子のみを添加すると、70%の安定化が生じる。MIIの安定化の $\text{EC}_{50}$ もまた、低 $\mu\text{M}$ 範囲にあるようである。さらに、これらの同じ小分子をヒト胚性腎(HEK)細胞に添加して、第二のGPCRに対するカルシウム反応を測定すると、関連しないGPCRのシグナル伝達は増進されず、そして急性毒性反応は生じないようである。

## 【0149】

[000167]薬剤発見は、製品の本質的にランダムなスクリーニングから、潜在的な生物活性剤、例えばアゴニスト、アンタゴニストおよび逆アゴニストとして、多数の合成分子を合理的に、そしてコンビナトリアルに設計するとともに、ポリペプチド、タンパク質、または核酸であることも可能な、生物学的ターゲットを構造的に性質決定することを含むプロセスへと発展してきた。療法ターゲットの構造を理解するのを容易にするいくつかのアプローチが発展してきている。これらには、タンパク質および核酸の配列決定(Findlayら、Protein Sequencing: A Practical Approach, IRL Press, オックスフォード, 1989; Adamsら、Automated DNA sequencing and Analysis中、Academic Press, サンディエゴ, 1994)、NMRを介した、二次構造および三次構造の解明(Jefson, Ann. Rep. Med. Chem. 23: 275, 1998; EriksonおよびFesik, Ann. Rep. Med. Chem. 27: 271-289, 1992)、X線結晶学(EriksonおよびFesik, Ann. Rep. Med. Chem. 27: 271-289, 1992)、並びにタンパク質フォールディングを予測するためのコンピュータアルゴリズム(Copeland, Methods of Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols, Chapman and Hall, ニューヨーク, 1994; Creighton, Protein Folding, W. H. Freeman and Co., 1992)が含まれる。ELISA(KemenyおよびChallacombe, ELISA and other Sol

10

20

30

40

50

id Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects; Wiley, ニューヨーク, 1988) および放射性リガンド結合アッセイ (Berson および Yalow, Clin. Chim. Acta, 22: 51-60, 1968; Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier press, アムステルダム/ニューヨーク, 1982)、表面プラズモン共鳴 (Karlsson ら, Anal. Biochem. 300: 132-138, 2002)、およびシンチレーション近接アッセイ (Kariv ら, J. Biomol. Screen. 4: 27-32, 1999) もまた、受容体 - Gタンパク質相互作用の性質を理解するのに使用可能である。

10

## 【0150】

[000168] 目的のタンパク質 - タンパク質相互作用を遮断するペプチドは、相互作用しているタンパク質の1つの表面に結合し、そして受容体と完全タンパク質の相互作用を模倣することによって、相互作用を遮断する。活性受容体結合ペプチドのコンホメーションが結合型と入れ替わる場合には、ペプチドがより緊密に結合しているならば転移 N O E S Y NMR法またはX線回折を用いて、これらのコンホメーションを研究することも可能である。結合したペプチドのコンホメーションは、目的のタンパク質 - タンパク質相互作用を遮断する非ペプチド小分子薬剤リード化合物を設計するのに有用なテンプレートを提供することも可能である。光活性化可能なアミノ酸類似体でペプチド残基を置換し、ペプチドを受容体結合部位に架橋し、受容体をペプチド断片に切断し、そして結合部位の位置を質量分析で解析することによって、光化学架橋を用いて、受容体上のペプチドの結合部位を調べることもまた可能である。多様な実験からの構造データを組み合わせることによって、コンピュータグラフィックスを用いて相互作用タンパク質表面のモデルを発展させることが可能になり、そしてこれは、相互作用を調節する新規非ペプチド分子の設計の指針となる。

20

## 【0151】

[000169] X線回折結晶学では、研究中の分子の結晶型をX線ビームに曝露して、そして入射の角度から多様な角度で回折放射線の強度を測定する。X線ビームは、多数の回折「反射」に回折し、各反射は、逆格子ベクトルに相当する。反射の回折強度から、「構造因子」として知られる、一連の数字の大きさを決定する。構造因子は、一般的に、複素数であり、複素平面内に大きさおよび位相を有し、そして結晶の単位格子内の電子分布によって定義される。

30

## 【0152】

[000170] 目的の特定のコンホメーションを安定化させるペプチドに結合した、受容体または受容体部分から、結晶を形成することも可能である。ありうるアミノ酸配列の完全なセットをスキャンして、高親和性で特定の受容体に特異的に結合するものを見出すコンビナトリアル技術を用いて、ペプチドを同定する、本発明の方法は、GPCRの特定のコンホメーションに結合するペプチドを同定することも可能である。NMRまたは結晶学による構造決定研究のため、これらのペプチドを受容体に結合させる（そして共結晶化する）ことも可能である。当該技術分野に知られる方法いずれか、例えば、その開示が本明細書に援用される、Kimple ら, Nature 416: 878-881, 2002の方法にしたがって、この方式の共結晶化を行うことも可能である。

40

## 【0153】

[000171] したがって、別の態様において、活性化されたロドプシンに結合する高親和性ペプチド類似体の選択に関して上述した方法にしたがって、GPCRの特定の配座異性体に結合するペプチドを同定するアッセイを行う。高親和性ペプチドが同定されたら、ペプチド擬似体研究にこれらを用いることも可能である。特定のペプチド、例えばオリゴペプチドのコンホメーションおよび望ましい特徴を模倣するが、望ましくない特徴、例えば柔軟性（コンホメーションの喪失）および代謝性分解を回避する化合物は、「ペプチド擬似体」として知られる。高親和性ペプチド類似体の三次元構造を模倣するか、受容

50

体への結合を可能にする表面活性基を有するか、または高親和性ペプチド類似体の三次元構造を模倣する物理的コンホメーションを有する、ペプチド擬似体を用いて、薬剤組成物を作成することも可能である。本発明記載の合理的薬剤設計を用いて、指定された受容体に結合する高親和性ペプチド類似体の機能を模倣する能力を持つ薬剤を同定することも可能である。化合物は、同一のまたは類似の生物学的活性を所持するように、好ましくは、高親和性ペプチド類似体の表面活性官能基、または実質的に類似の基を、同一のまたは実質的に類似の配向で含む。高親和性ペプチド類似体中の表面活性官能基は、受容体が存在する場合、部分的に二次構造または三次構造のため、特定の配向を所持する。合理的薬剤設計は、親分子の機能を模倣する、適切な化合物の同定および化学的修飾両方を含む。

## 【0154】

[000172] 一次構造、二次構造および三次構造によって、部分的に、ペプチド擬似体の物理的コンホメーションを決定する。ペプチドの一次構造は、高親和性ペプチド類似体のアミノ酸の数および正確な配列によって定義される。二次構造は、ポリペプチド鎖がらせん構造または他の安定な構造いずれかを所持する度合いによって定義される。三次構造は、ポリペプチドが、大規模なコイル形成またはフォールディングを経て、複雑で、幾分強固な三次元構造を生じる傾向によって定義される。

## 【0155】

[000173] コンピュータモデリング技術によって、科学者が、選択された分子の三次元原子構造を視覚化することが可能になり、そして分子を模倣するか、または分子と相互作用する新規化合物を合理的に設計することが可能になる情報が得られる。選択された分子のX線結晶解析および/またはNMR画像化由来のデータに基づいて、あるいは例えば米国特許第5,612,895号に記載されるように、もっぱらまたは部分的に一次構造に基づく非経験的な技術から、三次元構造を決定することも可能である。コンピュータグラフィックス系によって、新規化合物がどのようにターゲット分子と連結するかを予測することが可能になり、そして完全な結合特異性を持つように、化合物およびターゲット分子の構造の実験操作を行うことが可能になる。

## 【0156】

[000174] 薬剤設計に用いるため、多くのデータベースおよびコンピュータソフトウェアプログラムが利用可能である。例えば、Ghoshら, *Pol. J. Pharmacol.* 48(4):359-377, 1996; Wendoloskiら, *Pharmacol. Ther.* 60(2):169-183, 1993; およびHuangら, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 11:21-78, 1997を参照されたい。制約された、代謝的に安定な非ペプチド部分を含むデータベースを用いて、スクリーニングで同定された高親和性ペプチドの適切な類似体に関して検索し、そしてこうした類似体を示唆することも可能である。これらの分子の活性領域の既知の構造に対して三次元類似性を有する非ペプチド(有機)構造(例えば非ペプチド類似体、および/または二ペプチド類似体)の三次元データベースを用いて、検索を行うことも可能である。例えば、Allen, *Acta Crystallogr. B.* 58:380-388, 2002を参照されたい。

## 【0157】

[000175] あるいは、分子力学などの他の手段によって生成された三次元構造を考慮に入れることも可能である。さらに、三次元データベース比較の検索アルゴリズムが文献において入手可能である。Rufinoら, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 8:5-27, 1994。こうした検索のための商業的ソフトウェアもまた、Accelrys Inc. (9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752)などの業者から入手可能である。すべての残基レベルで、置換部分を有する類似体をシミュレーションするかまたは合成することによって、体系的な方式で検索を行う。好ましくは、主鎖の一部の置換が三次構造を妨害せず、そして側鎖置換が高親和性ペプチド/受容体相互作用を保持するのに適合するように注意を払う。

10

20

30

40

50

## 【0158】

[000176] 重要なアミノ酸の結合角および空間的幾何学に関する情報を用い、本明細書に記載するようなコンピュータプログラムを用いて、ペプチド擬似体を発展させることも可能である。既定のリガンドがターゲット受容体タンパク質に結合するかどうか決定するには、熱タンパク質アンフォールディング、または熱「シフト」アッセイが用いられてきた。物理的熱シフトアッセイにおいて、温度増加の関数として、タンパク質の生物物理パラメータにおける変化を監視する。例えば、熱量測定研究において、測定される物理的パラメータは、タンパク質が温度に誘導されるアンフォールディング遷移を経る際の、熱容量における変化である。示差走査熱量測定を用いて、Gタンパク質共役型受容体のリガンドの親和性を測定することも可能である。Grauschopfら, *Biochemistry* 39:8878-87, 2000; Brandtsら, *Biochemistry* 29:6927-40, 1990。したがって、当業者に一般的な方法を用いて、受容体の熱シフトを調節する能力に関して、高親和性ペプチドをアッセイすることも可能である。

10

## 【0159】

[000177] GPCRから高解像度の結晶構造を得ることが困難であるため、Gタンパク質、受容体およびリガンド間の相互作用を性質決定するために、多様な生物物理学的方法が適用されてきた。これらには、蛍光標識ペプチド類似体を用いて行う蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)実験(Bettioら, *Biopolymers* 60:420-37, 2001)、生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)実験(Ayoubら, *J. Biol. Chem.* 277:21522-8, 2002)、光親和性標識(Turekら, *J. Biol. Chem.* 277:16791-16797, 2002)、蛍光分光(Ghanouniら *J. Biol. Chem.* 276:24433-24436, 2001)、部位特異的スピン標識(Hubbellら, *Nat. Struct. Biol.* 7:735-739, 2000)、フーリエ変換赤外示差分分光(Vogelら, *Biochemistry* 35:11149-11159, 1996)、および内因性トリプトファン蛍光分光(Farrensら, *J. Biol. Chem.* 270:5073-5076, 1995)が含まれる。

20

## 【0160】

[000178] 以下の限定されない実施例を提供して、本発明の特定の側面を例示する。

30

## 【実施例】

## 【0161】

(実施例1)

ペプチドライブラリーの構築

[000179] バイアスペプチドライブラリーの構築が先に記載されてきている。Martínら, *J. Biol. Chem.* 271:361-366, 1996; Schatzら, *Meth. Enzymol.* 267:171-191, 1996。ライブラリー構築に用いたベクターは、pJS142であった(図3を参照されたい)。このベクターは、LacIおよびバイアス11量体ペプチドコード配列の間のリンカー配列とともに、ライブラリーオリゴヌクレオチドをクローニングするための制限部位を有した。突然変異誘発ライブラリーをコードするよう合成したオリゴヌクレオチドを、各位に関して、70%の正しい塩基および10%の他の塩基各々で合成した。この突然変異誘発率は、11のコドンがいずれも適切な(天然)アミノ酸である可能性がおよそ50%、そして別のアミノ酸である可能性がおよそ50%であるような、バイアスライブラリーを生じる。さらに、4つのランダムNNK(NはA、C、GまたはTを示し、そしてKはGまたはTを示す)コドンのリンカーを配列の5'端で合成して、全部で15のランダムコドンを作成する。この方法を用いて、G<sub>t</sub>のカルボキシル末端配列(IKENLKDCGLF; 配列番号15)に基づいて、連結に用いるベクター、マイクログラムあたり、10<sup>9</sup>より多い独立クローンを含むライブラリーを構築した。このライブラリーを生成するのに用いた核酸

40

50

は :

【 0 1 6 2 】

【 化 1 】

5'-

GAGGTGGTNNKNNKNNKNNKattcaaggagaacctgaaggactgcggcctcttcTAACTA  
AGTAAAGC-3', ここで N= A/C/G/T 及び K= G/T; 配列番号 :118).

【 0 1 6 3 】

であった。

( 実施例 2 )

G サブユニットペプチドライブラリーを生成するための配列

[ 0 0 0 1 8 0 ] 実施例 1 の方法および以下の表 V I I に列挙する配列を用いて、ライ  
ブラリーを生成した。

【 0 1 6 4 】

表 V I I . C 末端 G サブユニットペプチドライブラリー構築物

【 0 1 6 5 】

【 表 7 】

Gαサ ブユニ ット	RE	リンカー	ペプチドコード領域	終止	RE	配列 番号 :
Gs	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	attcgtgaaaacttaaagattgtggtcgtttc	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	14
G11	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	ctgcagctgaacctgaaggagtacaatctggtc	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	119
G12	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	ctgcaggagaacctgaaggacatcatgctgcag	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	120
G13	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	ctgcatgacaacctcaagcagcttatgctacag	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	121
G15	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	ctgcccggctacctggacgagattaatctgctg	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	122
Gz	5-GAGGTGGT	NNKNNKNNKNNK	atacagaacaatctcaagtacattggcctttgc	TAA	CTAAGTAAAGC-3'	123

【 0 1 6 6 】

( 実施例 3 )

トロンピン受容体を発現する昆虫細胞からの膜単離

[ 0 0 0 1 8 1 ] 0 . 1 % プルロニック F - 6 8 ( L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c . 、 ニューヨーク州グランドアイランド ) 、 1 0 % ウシ胎児血清、および 2 0 μ g / m l ゲンタマイシンを含有する 2 0 0 m l の G r a c e の昆虫細胞培地 ( L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c . 、 ニューヨーク州グランドアイランド ) を用いて、1リットルのスピナ・フラスコ中、27 で25時間、Sf9細胞 ( 2 x 1 0 <sup>8</sup> 細胞 ) を培養した。感染効率3~5のThR / p B l u e b a c 組換えウイルスで、Sf9細胞を感染させ、そして27 で4日間培養した。細胞を採取し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、そして次いで10mM T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 に再懸濁した。次いで、低速に設定した手持ちホモジナイザーで20秒間、細胞をホモジナイズした。次いで、壊れた細胞を17,000 x g で15分間沈降した。上清を廃棄し、そして50mM T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 および10%グリセロールからなる緩衝液にペレットを再懸濁した。膜調製物中の受容体濃度は、1~10,000 p m o l / m g の範囲であった。スクリーニングのため、200 μ g / m l の最終濃度を用いた。MBP - G q 融合タンパク質を用いて、天然 G q - C 末端ペプチドに結合する能力に関して、トロンピン受容体を試験した。

【 0 1 6 7 】

( 実施例 4 )

トロンピン受容体を過剰発現する哺乳動物細胞からの膜の単離

[ 0 0 0 1 8 2 ] ポリメラーゼ連鎖反応によって P A R 1 受容体 c D N A ( 2 . 1 k b 挿入物 ) を得て、そして哺乳動物発現ベクター p B J 5 にクローニングした。リン酸カル

10

20

30

40

50

シウム共沈殿法によって、チャイニーズハムスター卵巢細胞に、生じたプラスミドをトランスフェクションした。10%ウシ胎児血清、100単位/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを含有するダルベッコの修飾イーグル培地を用いて、PAR1トランスフェクション細胞を増殖させた。5mM EDTAを含むPBSを用いて、細胞を脱離させ、そしてPBS中で2回洗浄した。ペレットを膜調製に直ちに用いるか、または-20℃で凍結保存した。Dounceホモジナイザー(10ストローク)を用いて、5mM EDTAおよび0.5mM PMSFを含む20mM Tris-HCl、pH7.5中にペレットをホモジナイズし、そして10秒間超音波処理した。3000rpmで10分間遠心分離することによって、核破片および損なわれていない細胞を除去した。上清を12,000×gで30分間沈降し、そして生じたペレットを、25mM Tris-HCl、pH7.5、25mM MgCl<sub>2</sub>、10%スクロース、0.5mM PMSF、50μg/mlアンチパイン、1μg/mlアプロチニン、40μg/mlベスタチン、100μg/mlキモスタチン、0.5μg/mlロイペプチン、および0.7μg/mlペプスタチンに再懸濁した。膜をアリコットし、そして-80℃で凍結した。

10

## 【0168】

(実施例5)

桿体外節の調製

[000183] Arsharkyら, J. Biol. Chem. 269:19882-19887, 1994に記載されるように、薄暗い赤色光下で、新鮮な網膜から、ウシ桿体外節(ロドプシン含有膜)を調製した。切開のため、氷上の単離緩衝液(90mM KCl、30mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EDTA、1mM DTT、50μMフェニルメチルスルホニルフロリド、10mM MOPS、pH7.5)中の30%(w/v)スクロース、200mlを満たしたビーカーに網膜を入れ、切開中、中程度に一定に溶液を攪拌した。切開後、網膜溶液を、氷上で1時間、暗所に放置した。網膜-スクロース溶液を8本の50ml試験管に分配し、そして4、3000×gで4分間沈降した。上清を新たな8本の遠心管にデカントし、そして氷上に置いた。試験管上端から1.5cm下まで単離緩衝液を満たし、次いで17,000×gで20分間沈降した(「スピン1」)。

20

## 【0169】

[000184] ペレットを少量の30%スクロースに再懸濁し、そして8本の試験管から4本の試験管にまとめた。試験管上端から1.5cm下まで30%スクロースを満たし、4、5000×gで4分間沈降し、そして上清を4本の清浄試験管にデカントした。これらの試験管上端から1.5cm下まで単離緩衝液を満たし、そして4、17,000×gで20分間沈降した(「スピン2」)。

30

## 【0170】

[000185] 6本の勾配試験管中に、以下の表VIIIの溶液、#2、#3、#4を上から下の順序で用いて、段階的スクロース勾配を調製した。

表VIII. スクロース勾配溶液

## 【0171】

40

【表 8】

溶液	#2 (0.84 M)	#3 (1.0 M)	#4 (1.14 M)
42% スクロース	51.30 g	61.05 g	69.75 g
1.0 M MOPS	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L
2.0 M KCl	2250 $\mu$ L	2250 $\mu$ L	2250 $\mu$ L
3.0 M NaCl	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L
2.0 M MgCl <sub>2</sub>	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L
全量	83.25 g	84.75 g	86.25 g

10

## 【0172】

[000186] 「スピン1」および「スピン2」由来のペレットを、試験管あたり1 mlの26%スクロース緩衝液を用いて、単離緩衝液中に再懸濁した。スラリーを作成した後、各試験管を1 mlピペットでホモジナイズし、そして試験管をまとめた。ペレット溶液を注意深くスクロース勾配上に上層し、そして勾配層に進入しないようにした。スイングバケットローター中、勾配試験管を4 で、24,000 x gに30分間供し、その後、膜を含有するオレンジの層を注意深く収集して、ペレットまたはペレット近くの黒ずんだ溶液を乱さないようにした。膜を6本の50 ml試験管に分配し、そして氷上に置いた。次いで、試験管上端から1.5 cm下まで単離緩衝液を満たし、そして4、17,000 x gで20分間沈降した。上清を廃棄し、そして5  $\mu$ g/mlペプスタチンおよび10  $\mu$ g/ml E-64を含有する1 mlの単離緩衝液に、ペレットを再懸濁した。この懸濁物を、アルミホイルを巻いた15 mlコニカル試験管中で、必要になるまで-80 で保存し、次いで融解し、EDTA緩衝液(10 mM Tris、pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT)中でホモジナイズし、そして30,000 x gで30分間沈降した。上述のように、上清を廃棄し、そしてペレットを再懸濁し、そして再び沈降した。次いで、ペレットを尿素緩衝液(10 mM Tris、pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、7 M尿素)に再懸濁し、ホモジナイズし、そして45,000 kgで40分間沈降した。これらのペレットを再懸濁し、そして緩衝液A(200 mM NaCl、10 mM MOPS、pH 7.5、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100  $\mu$ M PMSF)中でホモジナイズし、次いで30,000 x gで30分間沈降した。各ペレットを再懸濁し、そして1 ml緩衝液A中でピペッティングすることによってホモジナイズし、そしてアッセイで使用するため、アルミホイルで覆った試験管中、100  $\mu$ lのアリコットにして、-80 で保存した。スクリーニングのため、10  $\mu$ g/mlで受容体をウェルに添加した。実施例18におけるように、結合アッセイを行った。

20

30

## 【0173】

(実施例6)

昆虫細胞からのPAR1トロンピン受容体の精製および受容体の脂質小胞への再構成

[000187] 0.1%ブルロニックF-68(Life Technologies, Inc.)、10%ウシ胎児血清、および20  $\mu$ g/mlゲンタマイシンを含有するGraceの昆虫細胞培地(Life Technologies, Inc.、ニューヨーク州グランドアイランド)中、1リットルのスピナ・フラスコ中、27 で25時間、Sf9細胞(2 x 10<sup>8</sup>細胞)を培養した。感染効率3~5のThR/pBluebac(組換えウイルス)で、該細胞を感染させ、そして27 で4日間培養した。細胞を採取し、2.7 mM EDTAを含有するリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、そして使用するまで-70 で保存した。細胞を溶解緩衝液(2.5 mM Tris-HCl、pH 7.2、7.5 mM NaCl、10 mM EDTA、1 mMフェニルメチルスルホニルフロリド、10 mg/mlロイペプチン、10 mg/mlアプロチニン、50 mM NaF)に再懸濁し、そして洗浄した。続く工程はすべて、4 以下で、冷たい緩衝液および遠心分

40

50

離ローターを用いて、氷上で行った。細胞を最大速で1分間ホモジナイズし、そして30,000 x gで45分間沈降した。ペレットを溶解緩衝液に再懸濁し、そしてホモジナイズ/洗浄工程を3回反復した。生じたペレットを、30 mlの可溶化緩衝液(20 mM Tris-HCl、pH 7.4、15 mM EGTA、1 mM フェニルメチルスルホンフルオリド、10 mg/ml ロイペプチン、10 mg/ml アプロチニン、50 mM NaF、0.1% (w/v) ジギトニン、0.1% (w/v) デオキシコール酸 (deoxycholate) Na) に再懸濁し、そして次いで1分間ホモジナイズした。懸濁物を4で90分間攪拌し、そして次いで30,000 x gで60分間沈降した。0.2% ジギトニンを含有する可溶化緩衝液で平衡化した、抗PAR1モノクローナル抗体カラム上に上清を装填した。上清を適用した後、0.2% (w/v) ドデシルマルトシドNaを含有する10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.4、10カラム体積でカラムを洗浄した。10 mM トリエチルアミン、pH 11.8を用いて、受容体を溶出した。1 M HEPES、pH 6.4を用いて、溶出分画を直ちに中和した。50% (v/v) グリセロール、0.1 M NaClおよび0.2% (w/v) ドデシルマルトシドNaを含有する50 mM HEPES緩衝液、pH 7.4に対して、プールした分画を透析した。アリコットを-80で保存した。

#### 【0174】

[000188] 脂質小胞を調製するため、200 µlのホスファチジルセリン(CHCl<sub>3</sub>中、50 mg/ml; Matreya)を回転蒸発装置中で30分間、または乾燥N<sub>2</sub>流を用いて、乾燥させた。200 µlの緩衝液A(50 mM HEPES、100 mM NaCl、0.2% (w/v) ドデシルマルトシドNa)を添加した後、N<sub>2</sub>大気下で試験管を密封し、そして水槽超音波装置中で30分間超音波処理した。実施例5におけるように調製した精製受容体を用いて、同じ日に、脂質小胞中に受容体を再構成した。精製受容体ストック(200 µg/ml)を氷上で融解し、そして適切なアゴニストペプチド(最終濃度100 nM)とともに、50 µlを4で20分間インキュベーションした。トロンビン受容体の場合、アゴニストは、トロンビン受容体アゴニスト・ペプチド(Calbiochem)である。80 µlの超音波処理脂質および50 µlの緩衝液Aを添加した後、ポルテックス装置を用いて試料を混合し、そして氷上に10分間置いた。次いで、0.2% BSAで洗浄し、そしてドデシルマルトシドNaを含まない5 ml緩衝液Aであらかじめ平衡化しておいた、1 ml Extractigel<sup>TM</sup>カラム上に、試料を装填した。2.5 mlのHEK緩衝液を用いて、カラムから再構成小胞を溶出した。

#### 【0175】

[000189] SDS-PAGEによる純度解析のため、試料(100~200 µl)を収集した。各バッチの濃度は、一般的に、約10~1000 µg/mlであった。使用のため、約1~100 µg/mlで、マイクロタイタープレートに受容体を入れた。MBP-Gq融合タンパク質を用いて、天然Gp-C末端ペプチドに結合する能力に関して、精製、再構成したトロンビン受容体を試験した。対照として、MBP-Gq融合タンパク質を用いて、天然Gp-C末端ペプチドに結合する能力に関して、空の小胞もまた試験した。

#### 【0176】

(実施例7)

#### GPCR結合高親和性ペプチド類似体の同定(パニング)

[000190] 以下のように電氣的にコンピテントな(electrocompetent)細胞を産生した。単一コロニーのARI814細菌を、5 ml無菌SOP(20 g/lバクトトリプトン; 10 g/lバクト酵母エキス; 5 g/l NaCl; 2.5 g/l無水K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 g/l Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)中、37で一晚増殖させた。この一晚増殖物の1 mlを、500 mlのSOPに添加し、そしてOD<sub>600</sub>読取値が0.6~0.8になるまで細菌を増殖させた。すべてのさらなる洗浄工程を冷温中で行った。細胞を少なくとも15分間氷冷水槽に入れ、次いで、4、4000 x gで15分

間、遠心分離に供して、その後、500 mlの10%グリセロールに再懸濁した。氷上に30分間静置した後、上述のように、沈降とともに、細胞を500 mlおよび20 mlの10%グリセロール中でさらに2回洗浄し、そして最後に4、5000 x gで10分間沈降し、そして1 mlの10%グリセロールに再懸濁した。後で使用するため、ドライアイスおよびイソプロパノールを用いて、細胞を100 µlのアリコットで迅速凍結した。

【0177】

[000191] トランスフェクションするため、融解したARI814細胞のアリコット(40 µl)を、3本の冷却した微量遠心管各々に入れた。実施例1にしたがって、Gtの11量体カルボキシル末端ペプチド(配列番号15)に基づくペプチドディスプレイライブラリーを調製した。2 µlのライブラリープラスミドを試験管に添加し、そして混合した。第一周期の「パニング」のため、200 µlのプラスミドライブラリーを添加した。続く周期のため、3セットのトランスフェクションを行った(受容体を含有するウェル由来の付着プラスミド(+); 受容体を含有しないウェル由来の付着プラスミド(-); およびインキュベーションしていないPRE試料)。以下を参照されたい。

10

【0178】

[000192] 各周期のパニングには、前より少ないライブラリーを用いた(第2周期: 100 µl; 第3周期: 50 µl; 第4周期: 10 µl)。パニングが完了した後、LacI融合タンパク質のDNAを溶出した。このDNA(50 µl)を用いて、冷却無菌0.1 cm電極ギャップキュベットを用いたエレクトロポレーションによって、大腸菌細胞をトランスフェクションした。200 mのPulsar Controller装置とともに、1.8 kV、25 µF容量、時間定数4~5 m秒に設定したBioRad大腸菌Pulsarセットを用いて、キュベットを1回パルス処理した。直ちに1 mlのSOCを添加し、そしてラベルを貼った17 x 100 mmポリスチレン試験管に、混合物を移した。試験管を37で1時間振盪した。各セットからアリコットを採取し、LB-AMPプレート上に100 µl、未希釈試料から10<sup>-6</sup>希釈試料までを蒔いた。PREプレートのカウントはライブラリーの多様性を示し、一方、(+ )プレートおよび(- )プレートの比較は、特定のクローンがパニング法によって濃縮されているかどうかを示した。

20

【0179】

[000193] あらかじめ37に温めた200 ml LB-AMP培地を含有する1 lフラスコに、+受容体試験管中に残った~900 µlを添加し、そしてOD<sub>600</sub> = 0.5になるまで、振盪しながら37で増殖させた。次いで、細胞の試験管を、氷冷水槽に少なくとも10分間入れ、そして続く洗浄工程中、4以下への冷却を維持した。細胞を5000 x gで6分間沈降し、100 ml WTEK緩衝液中に再懸濁し、5000 x gで6分間沈降し、50 ml TEK緩衝液に再懸濁し、5000 x gで6分間再沈降し、そして4 ml HEK緩衝液に再懸濁した。細胞を凍結バイアルに分け、そして-70で保存した。1つの試験管を次の周期のパニングに使い、そしてその他はバックアップ用に保存した。

30

【0180】

[000194] パニング法を図1に例示する。ライブラリーを「パニング」によってスクリーニングするため、0.1 mM EDTA、50 mM KClおよび1 mMジチオスレート(HEK/DTT)を含有する冷35 mM HEPES、pH 7.5中、実施例5にしたがって調製したロドプシン受容体を、Immulon 4(Dynatech)マイクロタイターウェルに直接固定した(0.1~1 µgタンパク質/ウェル)。4で1時間振盪した後、未結合膜断片をHEK/DTTで洗い流した。HEKL(35 mM HEPES; 0.1 mM EDTA; 50 mM KCl; 0.2 M -ラクトース; pH 7.5、1 mM DTTを含む)中の2% BSA 100 µlで、ウェルをブロックした。第1周期および第2周期に関してはBSAをブロックングに使い; 後の周期に関しては、1%脱脂粉乳を用いた。第1周期のパニングのため、96ウェルプレートの約24ウェルを用いた。続く周期では、受容体を含む8ウェルおよび受容体を含まない

40

50

8 ウェルを調製した。

【0181】

[000195] Gtライブラリーを融解し(2mlアリコット)、そして氷上で6mlの溶解緩衝液と混合した。溶解緩衝液は、4.25mlのHE(25mM HEPES: 0.1mM EDTA; pH7.5); 1mlの50%グリセロール; 750 $\mu$ lのHE中の10mg/mlプロテアーゼ不含BSA; 10 $\mu$ lの0.5M DTT; および6.25 $\mu$ lの0.2M PMSFを含有する。新たに調製したリゾチーム溶液(150 $\mu$ lの冷HE中の10mg/mlリゾチーム)を添加し、そして試験管を穏やかに数回反転させ、そして氷上で、2分間以下でインキュベーションした。混合後に、試験管の上端へと泡がゆっくり移動するのに注目することによって、粘性の増加が観察可能であることから、溶解の度合いが示される。2mlの20%ラクトースおよび250 $\mu$ lの2M KCl中で混合することによって、溶解を終結させた。直ちに、4、13,000 $\times$ gで15分間、試験管を遠心分離し、そして上清を新規試験管に移した。0.1%の少量のアリコット(PRE試料)を、ラベルを貼った別個の試験管に保存した。ブロッキングしたロドプシン受容体コーティングプレートをHEK L / 1% BSAで4回リンスし、そして光活性化型ロドプシンの場合は、氷上で5分間以下、室内光に曝露して、ロドプシンを活性化し(表IX)、また暗順応(不活性)ロドプシンの場合は、暗所に放置した(表X)。その直後、ペプチドライブラリー由来の未精製細菌溶解物(200 $\mu$ l)を各ウェルに添加し、そして4で1時間、穏やかに振盪させた。第2周期では、この同じ方法にしたがった。第3周期では、用いる溶解物の量を100 $\mu$ lに減少させた。続く周期では、溶解物を、HEK L / BSA中で1:10に希釈した。すべての周期で、200 $\mu$ M天然ペプチド5~10 $\mu$ lをウェルに添加して、より低い親和性で結合するペプチドを追い払った。

【0182】

[000196] 細菌溶解物とインキュベーションした後、冷HEK L / 1% BSAで4回、ウェルを洗浄した。超音波処理したサケ精子DNA(200 $\mu$ lのHEK L / 1% BSA中、0.1mg/ml)を各ウェルに添加し、そして4で30分間穏やかに振盪した。冷HEK Lでプレートを4回洗浄し、そして冷HEKで2回洗浄し、次いで、室温で30分間、勢いよく振盪しながら、HE中の1mM IPTG / 0.2M KClを50 $\mu$ l / ウェル、添加することによって、溶出した。ウェルの各群由来の溶出物(+受容体または-受容体)を、必要に応じて、1以上の微量遠心管中で合わせた。先に保存しておいたPRE試料の体積を、溶出試料の体積と一致するようにして、そしてこれらと平行して沈殿させた。沈殿させるため、1/10体積の5M NaClを各試料と混合し、次いで1 $\mu$ lの20mg/mlグリコーゲンを試料と混合した。次いで、等体積のRTイソプロパノールを添加し、そして完全に混合した。試料を13,000 $\times$ g、15分間の遠心分離に供し、そして上清を吸引した。ペレットを500 $\mu$ lの冷80%エタノールで洗浄し、そして再び13,000 $\times$ g、10分間の遠心分離に供した。プラスミドDNAのペレットを、無菌再蒸留水中で再懸濁し、PRE試料200 $\mu$ l、および+受容体試料または-受容体試料4 $\mu$ lを-20で保存した。

【0183】

[000197] 光活性化型ロドプシンおよび暗順応ロドプシン両方を用いて、この方式でライブラリーをスクリーニングした。以下の表IXおよびXを参照されたい。光活性化型ロドプシンを用いて得た配列のうち6つは、ロドプシン結合に際して、天然配列より100~1000倍強力であり、そしてこれらを表IXに列挙する。Gtライブラリーを用いて、光活性化型ロドプシンをパニングすると、残基L344、C347およびG348が不変であった。また、最高の親和性の配列各々において、341位の塩基性残基(R341)は中性残基に変化していた。Gtライブラリーを用いて、暗順応ロドプシンをパニングすると、L344、C347、およびG348残基はもはや不変ではなく(L344は配列の62.5%に存在し、C347は配列の25%に存在し、G348は配列の75%に存在する)、そして341位の残基は、通常、変化しなかった。したがって、

不活性暗順応状態にある受容体のコンホメーションは、光活性化受容体とは異なるセットのペプチド類似体に結合することを可能にする。さらに、光活性化受容体では、最も重要なのはペプチドの最後の7アミノ酸(344~350)であるが、暗順応ロドプシン結合には、最初の6アミノ酸(340~345)が最も重要であるようである。

【0184】

表IX. 光活性化型ロドプシン高親和性配列

【0185】

【表9】

クローン番号 ライブラリー配列	配列番号:	配列	
	124	IRENLKDCGLF	10
8	125	LLENLRDCGMF	
9	126	IQGVLKDCGLL	
10	127	ICENLKECGLF	
18	128	MLENLKDCGLF	
23	129	VLEDLKSCGLF	
24	130	MLKNLKDCGMF	
3	131	LLDNIKDCGLF	
4	132	ILTKLTDCGLF	20
6	133	LRSLKQCGLF	
11	134	IHASLRDCGLF	
13	135	IRGSLKDCGLF	
14	136	IFLNKDCGLF	
15/28	137	IRENLEDCGLF	
16	138	IIDNLKDCGLF	
17	139	MRESLKDCGLF	
19	140	IRETLKDCGLL	30
26	141	ILADVIDCGLF	
27	142	MCESLKECGLF	

【0186】

表X. 暗順応ロドプシン高親和性配列

【0187】

【表10】

クローン番号 ライブラリー配列	配列番号:	配列	
	124	IRENLKDCGLF	
2	143	IREKWKDLALF	40
3	144	VRDNLKNCFLF	
7	145	IGEQIEDCGPF	
17	146	IRNNLKRYGMF	
21	147	IRENLKDLGLV	
26	148	IRENFKYLGLW	
33/37	149	SLEILKDWGLF	
41	150	IRGTLKGWGLF	50

## 【0188】

(実施例8)

## Gqペプチドライブラリーを用いたPAR1のスクリーニング

[000198] 実施例7の方法を用い、Gqライブラリーを用いて、PAR1受容体の異なる供給源をスクリーニングした。脂質小胞中で再構成した精製PAR1(実施例6)、PAR1を発現するSf9昆虫細胞から調製した膜(実施例3)、およびPAR1を過剰発現している哺乳動物細胞から調製した膜を用いた。スクリーニングの結果を、それぞれ、表XI、XIIおよびXIIIに示す。3つのスクリーニングすべての競合剤として用いたペプチドは、LQLNLKEYNLV(配列番号2)であった。4残基リンカー配列はランダムであり、そして場合によって、結合ペプチドのアミノ末端に存在する。これらの結果は、同定された高親和性ペプチドが、スクリーニングされるPAR1の3つの供給源すべてで類似であることを示す。Gqバイアスライブラリーを用いてPAR1をパニングした場合、受容体認識に重要であるようであり、そしてしたがって不変である位は、N348、L349およびV350である。

10

## 【0189】

表XI. 再構成精製組換えPAR1受容体;スクリーニング結果。

## 【0190】

## 【表11】

クローン	リンカー	配列番号:	配列番号:
		LQLNLKEYNLV	2
R2-16	*SWV	151	LQFNLNDCNLV 102
R2-17	FVNC	152	LQRNKKQYNLG 160
R2-18	EVRR	153	MKLKLEKEDNLV 103
R2-20	*RVQ	154	HQLDLLEYNLG 104
R2-21	RLTR	155	LQLRYKCYNLV 161
R3-37	SR*K	156	LQOSLIEYNLL 111
R3-38	MTHS	157	VHVKLKEYNLV 162
R3-44	SGPQ	158	LQLNVKEYNLV 163
R3-46	ML*N	159	LRIYLLKGYNLV 164

20

## 【0191】

表XII. PAR1受容体Sf9昆虫細胞膜;スクリーニング結果。

## 【0192】

## 【表12】

クローン	リンカー	配列番号:	配列番号:
		LQLNLKEYNLV	2
S1-13	S*IR	165	MKLVSESNLV 94
S1-18	RWIV	166	LQLNLKVYNLV 175
S1-23	G*GH	167	LELNLKVYNLF 176
S2-26	RSEV	168	LQLKHKENNLN 100
S2-30	CEPG	169	LHLNMAEVSLV 177
S2-36	HQMA	170	LQVNLEEYHLV 101
S3-6	VPSP	171	LQKNLKEYNMV 106
S3-8	QMPN	172	LQMYLRGYNLV 108
S3-10	MWPS	173	LKRYLKECNLV 178
S3-15	C*VE	174	MNLTLKECNLV 110

40

## 【0193】

表XIII. PAR1を過剰発現する哺乳動物(CHO)細胞;スクリーニング結果。

## 【0194】

【表 1 3】

クローン	リンカー	配列番号 :	配列番号 :
			LOLNLKEYNLV 2
C4-5	PRQL	179	LQLKRGEYILV 183
C4-19	VRPS	3	LQLNRNEYLV 4
C5-10	SRHT	11	LRLNGKELNLV 12
C5-12	FFWV	180	CSLKLKAYNLV 184
C4-16	QRDT	181	LQMNHNEYNLV 185
C7-3	NFRN	182	PQLNLNAYNLV 186
C7-10	LPQM	9	QRLNVGEYNLV 10
C7-13	LSTN	7	LHLNLKEYNLV 8
C7-14	LSRS	5	LQOKLKEYSLV 6

10

【0195】

(実施例9)

GPCR結合高親和性ペプチド類似体の同定(パニング)

[000199] Gsライブラリーでパニングした組換え再構成<sub>2</sub> アドレナリン作用性受容体を用いて、実施例7の方法を反復した。パニングスクリーニングおよび選択したペプチドのELISA結合親和性の結果を、以下の表XIVに示す。

【0196】

表XIV. Gsライブラリーでスクリーニングした、<sub>2</sub>-アドレナリン作用性受容体

20

【0197】

【表 1 4】

配列番号

競合剤	配列番号	ELISA
	QRMHLRQYELL	13
AG1	QGMQLRRFKLR	187
AG20	RWLHWQYRGRG	188
AG19	PRPRLRFKIP	189
AG2	QGEHLRQLQLQ	190
AG4	QRLRLGPDEL	191
BAR1	QRHRRPFKFF	192
AG3	QRMLRLFEFL	193
BAR2	QRVHLRQDELL	194
AG11	DRMHLWRFGLL	195
AG9	QRMLRQYELL	196
BAR3	QWMDLRQHELL	197
AG18	QRMNLGPCGLL	198
BAR20	NCMKFRSCGLF	199
AG13	QRLHLRGYEFL	200
BAR11	HRRHIGPFALL	201
BAR8	ERLHRRLFQLH	202
BAR40	PCIQLGQYESF	203
BAR31	QRLRLRKYRLF	204

30

40

【0198】

50

(実施例10)

GPCR結合高親和性ペプチド類似体の同定(パニング)

[000200] Gtライブラリーでのロドプシンスクリーニングを用いて、実施例7の方法を反復した。パニングスクリーニングおよび選択したペプチドのELISA結合親和性の結果を、以下の表XVに示す。結合の順位を同定するため、二次抗体をHRPにコンジュゲート化したELISA法を用いて、溶解物を解析した。基質添加後、分光計を用いてマイクロプレートを読み取った。結合は、受容体を含むウェルのOD<sub>450</sub> - 受容体含まないウェル(空の脂質小胞を含む対照ウェル)のOD<sub>450</sub>である。

【0199】

表XV. Gtライブラリーを用いたロドプシンスクリーニング

10

【0200】

【表15】

配列番号

競合剤	配列番号	ELISA
	IRENKDCGLF	124
L33	IVEILEDGLF	205
L4	MLDNLKACGLF	206
L3	ILENKDCGLF	207
L14	LRENKDCGLL	208
L38	LLDILKDCGLF	209
L15	VRDILKDCGLF	210
L34	ILESNECGLF	211
L17	ILQNLKDCGLF	212
L7	MLDNLKDCGLF	213
L10	IHDRKDCGLF	214
L20	IRGSLKDCGLF	135
L6	ICENKDCGLF	215
L8	IVKNLEDGLF	216
L13	ISKNLKDCGLL	217
L10	IRDNLKDCGLF	218

20

30

【0201】

(実施例11)

さらなるペプチド類似体

[000201] 以下の表XVIに示す競合ペプチドを用いて、チャイニーズハムスター卵巣で発現されたPAR1を、Gt、G12およびG13ライブラリーに対してスクリーニングした。実施例1記載のチャイニーズハムスター卵巣細胞から得た、PAR1受容体に対する高親和性結合に関するスクリーニングで、示すようなGt、G12またはG13ライブラリー、および競合剤として、それぞれ、IRENLKDCGLF(配列番号124)、LQENLKDIMLQ(配列番号38)またはLQDNLKQLMLQ(配列番号233)を用いて、以下の表XVIIに示す、さらなるペプチド類似体を同定した。

40

【0202】

表XVI. CHO発現PAR1を用いて同定されたペプチド

【0203】

【表 16】

Gtライブラリー (IRENLKDCGLF; 配列番号 :124)	G12ライブラリー (LQENLKDIMLQ; 配列番号 :38)	G13ライブラリー (LQDNLKQLMLQ; 配列番号 :233)
IREFLTDCGLF 219	LQENLKEMMLQ 225	LQDNLRHLMLQ 234
IRLDLKDVSLEF 220	LRENLYKVRMLD 226	LQDKINHMLQ 235
ICERLNDGGLC 221	LQEDLKGMTLQ 227	LQANRKLGLMLQ 236
PRDNTKVRGLF 222	LQETMKDQSLQ 228	LIVKVKQLIWQ 237
FWGNLQDSGLF 223	PQVNLKSIMRQ 229	MRAKLNNLMLL 238
RRGNGKDCRHF 224	WQHKLSEVMLQ 230	LQDNLRHLIQ 239
	LKEHLMERMLQ 231	LQDNRRNQLLF 240
	LLGMLLEPLMEQ 232	

10

【0204】

表XVII. G11ライブラリーを用いてスクリーニングしたPAR1結合ペプチド  
(LQLNLKEYNLV; 配列番号2)

【0205】

【表 17】

CHO 発現	配列番号 :	組換え/ 再構成	配列番号 :	SF9 発現	配列番号 :
LQLNVKEYNLV	163	LQLNVKEYNLV	163	LQLNLKVYNLV	175
LQLNRKQYNLV	241	LQLRVKEYKRG	244	LQLKHKENNLV	100
LQLRYKCYNLV	161	LQLRYKCYNLV	161	LQKNLKEYNMV	106
LQLDLKESNMV	242	LQIYLGKYNLV	245	LQVNLBEYHLV	101
LQLNLKKYNRV	243	LQPNLDCNLV	102	LPLNLKEYSLV	257
LQLRVKEYKRG	244	LQRNKKQYNLG	160	LELNLRVYNLV	258
LQRNKKQYNLG	160	LQRNKKQYNLG	254	LPLNPKEYSLV	109
LQIYLGKYNLV	245	LQOSLIEYNLL	111	LPLNLIDFSLV	259
LQPNLDCNLV	102	LRLDFSEKQLV	105	LPRNLKEYDLG	260
LQYNLKESEFVV	246	LYLDLKEYCLF	255	LRLNDIEALLV	261
LQOSLIEYNLL	111	HQLDLLEYNLG	104	LVLNRIEYNLL	262
LQRDHVEYKLF	247	VQVKLKEYNLV	251	LHLNMAEVSLV	177
LVIKPKFNLV	248	MKLKLEDNLV	103	MNLTLKEDNLV	110
IQLNLKQYNIV	249	SAKELDQYNLG	256	MKLVNSESNLV	94
HQLDLLEYNLG	104	VHVKLKEYNLV	162	LKRYLKESNLV	178
MQLNLKEYNLV	250			LKRKLEKESNLV	263
VQVKLKEYNLV	251			LKRKVKEYNLG	264
QLLNQYVYNLV	252			LELNLRVYNLF	176
MKLKLEDNLV	103			LQMYLRGYNLV	108
WRLSLKVYNLV	253				
LQLKRGEYILV	183				
LQLNRNEYLV	4				
LRLNGKELNLV	12				
CSLKLKAYNLV	184				
LQMNHNEYNLV	185				
PQLNLNAYNLV	186				
QRLNVGEYNLV	10				
LHLNLKEYNLV	8				
LQOKLKEYSLV	6				

10

20

30

## 【0206】

(実施例12)

## LacI溶解物の調製

[000202] パニングの最後の周期で、(+)受容体プレートからいくつかのクローンを選択し、そしてLB-Amp培地中で一晚増殖させた。「ELISA溶解物培養」のため、一晚培養物300 $\mu$ lを3mlのLB-Amp培地で希釈した。別の30 $\mu$ lを等体積の50%グリセロールに添加し、ラベルを貼った微量遠心管中、-70 $^{\circ}$ Cで保存した。残った4.5mlを、標準的ミニプレップ・プロトコル(Qiagen Spinprep<sup>TM</sup>キット)を用いたDNA作成に使い、そしてライブラリーのランダム領域を終結させるTAA停止コドンから56塩基対下流の部位のベクターに相同である、19塩基対の逆プライマー(GAAAATCTTCTCTCATCCG; 配列番号265)を用いて、配列決定した。DNAを-20 $^{\circ}$ Cで保存した。ELISA溶解物培養を37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪させた。33 $\mu$ lの20%アラビノース(0.2%最終濃度)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで2~3時間振盪して、発現を誘導した。次いで、培養物を、4000 $\times$ g、5分間の沈降

40

50

に供し、ペレットを3 mlの冷WTEK緩衝液に再懸濁し、4000 x gで5分間再沈降し、そしてペレットを1 mlの冷TEK緩衝液に再懸濁した。1.5 mlの微量遠心管に移した後、ペレットを13,000 x gで2分間沈降し、そして上清を吸引した。細胞ペレットを1 mlの溶解緩衝液(42 ml HE、5 mlの50%グリセロール、3 mlのHE中の10 mg/ml BSA、750 µlのHE中の10 mg/mlリゾチームおよび62.5 µlの0.2 M PMSF)に再懸濁し、そして氷上で1時間インキュベーションした。110 µlの2 M KClを溶解混合物に添加し、そして反転して混合し、次いで、4、13,000 x gで15分間沈降した。透明な未精製溶解物(約0.9 mlの上清)を新規試験管に移し、そして-70 で保存した。

#### 【0207】

(実施例13)

##### LacI - ペプチド融合タンパク質のPAR1受容体特異的結合

[000203] 個々のクローンにコードされるペプチドの結合特性を以下のようにアッセイした。Sf9昆虫細胞から調製した精製PAR1受容体(50 mM Tris-HCl、pH 7.4、10%グリセロール中、1~10,000 pg/ml)を、実施例6にしたがって、脂質小胞中に再構成した。0.2~20,000 µg/mlの範囲の受容体を含む膜(+/-受容体)の連続希釈を、マイクロタイタープレート上のウェルに添加し、そして4 で1時間、穏やかに振盪した。洗浄後、実施例12記載の方法にしたがって、LacI-Gqクローンから調製したLacI-Gq溶解物の1:1~1:10,000連続希釈をウェルに添加し、プレートを4 で1時間、穏やかに振盪して、そして洗淨した。抗LacI抗体(Stratagene)を添加し(1:1000)、そしてプレートを4 で1時間、穏やかに振盪した。洗浄後、HRP-コンジュゲート化ヤギ抗ウサギ抗体(Kierkegaard and Perry Laboratories)を添加し(1:2500)、そしてプレートを4 で1時間、穏やかに振盪した。プレートを洗淨し、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼを用いて発色させ、そして次いで、ELISA読取装置中、OD<sub>450</sub>で読み取った。ELISAの一般的方法論を図4に例示する。図5に示す結果は、LacI-Gq融合タンパク質が、濃度依存方式でトロンピン受容体に結合することを示す。LacI-Gq融合タンパク質が空の小胞に結合する能力は、トロンピン受容体で再構成した小胞よりも有意に低かった。

#### 【0208】

(実施例14)

##### 高親和性ペプチドの存在下でのスクリーニング

[000204] 光活性化型ロドプシンに対して、実施例7に記載するパニング法によって同定されたものより、さらに高い親和性を有するペプチドを同定するため、第3周期および第4周期のライブラリー・インキュベーションに、高親和性ペプチドを含んだ。天然配列より1000倍高く、光活性化型ロドプシンへの結合を示すペプチドとして、第一のスクリーニングでペプチド8(LLENLRDCGMF;配列番号125)が同定された。第3周期および第4周期において、ウェルに10 µlの100 µM(最終濃度100 nM)のペプチド8を含んだことを除いて、実施例7に記載するとおりに、Gtライブラリーのスクリーニングを行った。このスクリーニングによって、ロドプシンに非常に高い親和性で結合し、そしてなおかつその活性型、メタロドプシンIIにロドプシンを安定化する、いくつかのクローンが明らかになった。以下の表XVIIを参照されたい。表IXおよび表XVIIを比較すると、スクリーニングにペプチド8を用いた結果、341位が中性残基に変化することが明らかである。残基L344、C347およびG348は、ペプチド8がスクリーニングに含まれていなくても、安定なままであった。ペプチド8を用いた結果、340位のイソロイシンの発生率はより高く(天然ペプチドでは17%であるのに対して、ペプチド8では71%)、そして342位のグルタミンの発生率はより低かった(天然ペプチドでは67%であるのに対して、ペプチド8では29%)。この種の情報は、薬剤または薬剤スクリーニング化合物として使用するための非常に強力な類似体ペプチドの発見に寄与するだけでなく、Gtおよび受容体間の接触部位の根底

10

20

30

40

50

にある、構造フレームワークの理解も進める。

【0209】

[000205]この方式で同定されたクローンのいくつかに対して行った結合アッセイを図6に示す。スクリーニングプロセスでペプチド8を用いて同定されたペプチドはすべて、ペプチド8と等しいかまたはそれより高い親和性で、光活性化型ロドプシンに結合した。最初のバー(HAP=ペプチド8)を残りのバーと比較されたい。

【0210】

表XVIIII. ペプチド8を添加したスクリーニングで同定された、典型的な光活性化型ロドプシン高親和性配列

【0211】

【表18】

クローン番号	配列番号	配列
ライブラリー配列 ペプチド 8	124	IRENLKDCGLF
	125	LLENLRDCGMF
3	266	ILENLKDCGLL
7	213	MLDNLKDCGLF
8	216	IVKNLEDCGLF
10	218	IRDNLKDCGLF
13	217	ISKNLRDCGLL
17	212	ILQNLKDCGLF
19	206	MLDNLKACGLF

【0212】

(実施例15)

MBPベクターへのサブクローニングおよびMBP未精製溶解物の調製

[000206] pELM3をAgeI(New England Biolabs)を用いて室温で消化して、そして0.7%アガロースゲル上で、切断されたベクターを切断されなかったベクターから分離した。DNAを精製し(Qiagen Extract-a-ge1キット)、そしてScaI(New England Biolabs)で消化した。1%アガロースゲル上で、5.6kb MBPベクター断片を分離し、そして上述のように精製した。ペプチドライブラリーの最後のアフィニティー精製周期中、細胞を採取する前に、200mlの増幅培養物の20ml部分を取り置いた。この20ml部分を、飽和するまで、通常は一晚、増殖させ、そして該細胞からDNAを調製した(Qiagenミディプレップ・キット)。pJS142プラスミドDNAをBspEIおよびScaIで消化した。1%アガロースゲル上で、3.1kbおよび1.7kbベクター断片から、0.9kbペプチドコード断片を分離し、そして精製した。

【0213】

[000207]異なる比の5.6kb MBPベクター断片およびペプチドコード0.9kb断片(1:2、1:1、2.5:1、5:1、10:1)を、0.4mM ATPを含有するリガーゼ緩衝液中、T4 DNAリガーゼを用いて、14で一晚、連結した。温度を10分間、65に上昇させることによって、連結を終結させた。バックグラウンドを低下させるため、連結混合物をXbaIで消化した後、1μlグリコーゲンキャリアーとして用いて、イソプロパノール沈殿した。80%エタノールで1回洗浄した後、ペレットを20μlの再蒸留水に再懸濁した。XbaIで消化した連結混合物の沈殿物1μlを用いて、実施例7に記載するように、ARI814細胞を形質転換した。細胞を1ml SOC中、37で1時間振盪させた後、100μlの懸濁物をLB-Ampプレート上に蒔いた。実施例12のLacI溶解物に関して記載するように、未精製溶解物

10

20

30

40

50

を調製した。

【0214】

(実施例16)

MBP - ペプチド融合タンパク質精製

[000208] 単一MBP - ペプチド融合タンパク質クローンの一晩培養物(1ml)を200mlのLB - AMP培地に接種した。OD<sub>600</sub> = 0.5になるまで、培養物を37℃で振盪した。37℃で2時間、連続して振盪しながら、150μlの1M IPTG(最終濃度0.3mM)を添加することによって、タンパク質発現を誘導した。次いで、培養物を5000×gで20分間沈降し、そして5mMカラム緩衝液(10mM Tris、pH7.4; 200mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT)中に再懸濁し、そして16.25μlの0.2M PMSFを添加した。次いで、再懸濁した細胞ペレットを-70℃で保存した。保存したペレットを冷水中で融解し、そして氷温水槽に入れた。Fisher Scientific 55 Sonic Dismembratorを用いて、15秒間未満、短いパルスでペレットを超音波処理した(40%一定時間、アウトプット5、全部で1分間の期間で、5回反復)。超音波ペレットを9000×gで30分間の遠心分離に供し、その後、上清を取り置き、そしてカラム緩衝液を用いて100mlに希釈した。通常、タンパク質濃度は、およそ2.5mg/mlであった。7.5mlアミロース樹脂をBioRad使い捨てカラムに注ぎ、そして8体積のカラム緩衝液で洗浄することによって、カラムを調製した。希釈した未精製抽出物を約1ml/分の重力流によって装填し、そして8体積のカラム緩衝液でカラムを再び洗浄した。10mlのカラム緩衝液中の10mMマルトースで融合タンパク質を溶出し、そしてAmicon centrifuge 30<sup>T</sup>Mカラムを用いて濃縮し、次いでアリコットし、そして-70℃で保存した。

【0215】

(実施例17)

ELISAによってライブラリー未精製溶解物をスクリーニングする方法

[000209] マイクロタイターウェルを、1mM DTTを含有する最終体積100μlのHEK中、0.1~1.0μg/ウェルのロドプシン受容体で、振盪しながら4で1時間コーティングした。次いで、1mM DTTを含む100μlのHEK中の2%ウシ血清アルブミン(BSA)をウェルに添加し、そして4で少なくとも30分間、振盪を続け、次いで1mM DTTを含有するHEKで4回洗浄することによって、ウェルをBSAでブロックした。1mM DTTを含有するHEK中、未精製溶解物を1:50に希釈し、そしてコーティングしたウェルに添加した(100μl/ウェル)。プレートを4で1時間振盪し、PBS/0.05% Tween<sup>T</sup>M 20 1mMマルトースで4回洗浄し、そして次いで、0.05% Tween<sup>T</sup>M 20および1mMマルトースを含有するPBS中、100μlの1:1000ウサギ抗MBP抗体(New England Biolabs)で、振盪しながら、4で30分間、探査した。もう1度洗浄した後、1% BSAおよび1mMマルトースを含有するPBS中、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼにコンジュゲート化した、100μlの1:7500のヤギ抗ウサギ二次抗体を用いて、振盪しながら、4で30分間、探査した。0.05% Tween<sup>T</sup>M 20および1mMマルトースを含有するPBSで、プレートを4回洗浄した。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ基質(Bio-Fx; 100μl)を添加し、そして20~30分間発色させた。100μlの2N硫酸を添加することによって反応を停止し、そしてプレートをOD<sub>450</sub>で読み取った。発色があまり迅速に(10分未満)起こるか、または陰性対照ウェルのバックグラウンドが高すぎる(0.2より高い)場合、未精製溶解物の1:100または1:200希釈を用いて、アッセイを反復した。

【0216】

(実施例18)

高親和性ロドプシン結合ペプチド融合タンパク質の結合アッセイ

[000210] パニングの第4周期で同定されたペプチドコード配列の全集団(実施 50

例7を参照されたい)を、pJ S 1 4 2からpE L M 3 (New England Biolabs)に移した。このプラスミドは、修飾ポリリンカーを含むpMal-c2誘導体であり、イソプロピル - チオガラクト - ピラノシドによって誘導可能であり、そしてリーダー配列が欠失された大腸菌malE遺伝子を含むし、そしてMBP融合タンパク質の細胞質発現を導く。MBP - カルボキシル末端ペプチド類似体融合タンパク質を大腸菌で発現させた。

#### 【0217】

[000211]アッセイのため、暗所で、実施例5に記載するようなROS膜(ロドプシン)1 $\mu$ g/ウェルを、冷HEK/DTT中、マイクロタイターウェル上に、4で1時間、直接固定した。ウェルをリンスし、HEK/DTT中、1% BSAで、4で1時間ブロッキングし、そして再びリンスした。氷上で5分間、光に曝露することによって、結合したロドプシンを活性化した後、MBP融合タンパク質を添加した(未精製細菌溶解物を、1 $\mu$ Mジチオステイトールを含むHEK中で1:50に希釈し;精製タンパク質を0.2~120nMで用いた)。MBP - G t 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 R (pE L M 1 7)融合タンパク質およびリンカー配列のみを含むMBP (pE L M 6)は、最終濃度50nMで対照ウェルに存在した。30分後、ウェルを洗浄し、そしてウサギ抗MBP抗体(New England Biolabs)を添加した。未精製溶解物では、1:1000希釈で、そして精製タンパク質では1:3000希釈で、抗MBP抗体を用いた。30分後、ウェルを再洗浄し、そして西洋ワサビ・ペルオキシダーゼにコンジュゲート化したヤギ抗ウサギ抗体(未精製溶解物では1:7500希釈;精製タンパク質では1:10,000希釈;Kierkagaard & Perry Laboratories)を添加した。30分後、0.05% Tween<sup>T M</sup> 20を含有するPBSでプレートを4回洗浄した。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ基質(100 $\mu$ l)を添加し、そして約20分間発色させた。100 $\mu$ lの2N硫酸を添加することによって、反応を停止した。結果を図7に示す。値はOD<sub>450</sub>の吸光度を示す。アッセイの陽性対照は、MBP融合タンパク質G t 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 Rをコードする、pE L M 1 7であった。リンカー配列のみに融合してMBPタンパク質を発現するpE L M 6は、陰性対照として働いた。アッセイ内のいかなる固有の非特異的結合も反映する、「溶解物なし」の対照ウェルを含んだ。図7を参照されたい。

#### 【0218】

[000212]高親和性MBP融合タンパク質のIC<sub>50</sub>値は、3.8~42nMの範囲であり、IC<sub>50</sub>が6 $\mu$ MであるMBP - G t 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 Rよりも、最大3桁、より強力である。最高親和性配列のすべてで、天然配列では陽性荷電残基である341位は、中性残基に変化していた。Leu344、Cys347、およびGly348が不変であることが見出され、そして340位、349位、および350位には常に疎水性残基が位置し、これらの残基が非常に重要な性質を持つことが示された。

#### 【0219】

(実施例19)

ロドプシンへの高親和性ペプチド融合タンパク質の結合は、ヘテロ三量体Gtによって競合的に阻害可能である

[000213]光活性化型ロドプシンを、GtのC末端に基づくペプチドに関してスクリーニングして、多数の高親和性配列を得た。ライブラリー由来の高親和性ペプチドを含有するMBP融合タンパク質(クローン8、9、10、18、23、24由来の配列とともに、野生型ペプチド配列をコードするpE L M 1 7、およびペプチドを含有しないpE L M 6; MBP - 8、MBP - 9、MBP - 10、MBP - 18、MBP - 23、MBP - 24、MBP - pE L M 1 7)の結合を、これらが、ヘテロ三量体Gtの存在下または非存在下で、ロドプシン(0.5 $\mu$ gロドプシン/ウェル)に結合する能力に関して評価した。

#### 【0220】

[000214]各クローン由来の溶解物(50 $\mu$ l)を添加し、そして光の元でイン

10

20

30

40

50

キュベーションした。45分後、1  $\mu$ Mのヘテロ三量体Gtを添加し、そして溶液を30分間インキュベーションした。抗MBP抗体を添加し、次いでヤギ抗ウサギ・アルカリホスファターゼ・コンジュゲート化抗体および基質を添加した。発色させた。吸光度データを図8に提示する。

【0221】

[000215] 得られた大部分のペプチド配列は、天然Gt C末端配列に非常に相同であった。これらの配列のうちいくつかは、非常に高親和性(親ペプチドより>1000倍高い)であり、そして受容体仲介Gタンパク質活性化の強力な力であり、そして特異的なアンタゴニストである。光活性化型ロドプシンへの結合に関して、そしてこれらがMIIコンホメーションを安定化させる能力に関して、高親和性ペプチド融合タンパク質を試験した(表XXI)。

10

【0222】

[000216] MBP-8は、高親和性でロドプシンに結合し、そしてMIIを安定化させるため、スクリーニングにはこのペプチドを用いた。MBP-18およびMBP-24は、どちらも、ロドプシンに対して、MBP-8より高い結合親和性を示したが、親和性が非常に高いため、小分子がこれらの結合を競合的に阻害することが不可能である可能性もあることから、これらのペプチドは用いなかった。もちろん、好適であるように、別のペプチド、例えばさらに強力な小分子を見出すためのより高い親和性のペプチドを用いて、スクリーニングを反復することも可能である。

20

【0223】

表XIX. 選択したMBP-高親和性ペプチド融合タンパク質に関する、パニングELISAのOD<sub>450</sub>の吸光度、並びにMII結合およびMII安定化のEC<sub>50</sub>値

【0224】

【表19】

		配列番号:	ELISA OD <sub>450</sub>	MI I 結合 EC <sub>50</sub>	MI I 安定化 EC <sub>50</sub>
Gt	IKENLKDCGLF	15	.01	6000 nM	>100 $\mu$ M
9	LQQVLKDCGLL	267	.35	10 nM	1.05 $\mu$ M
10	ICENLKDCGLF	215	.36	42 nM	5.40 $\mu$ M
8	LLENLRDCGMI	268	.54	7.8 nM	0.94 $\mu$ M
18	MLENLKDCGLF	128	.58	3.8 nM	1.24 $\mu$ M
24	MLKNLKDCGMF	130	.61	6.6 nM	0.49 $\mu$ M
23	VLEDLKSCGLF	129	.66	20 nM	3.50 $\mu$ M

30

【0225】

[000217] ヘテロ三量体Gtは、光活性化型ロドプシンに対する高親和性ペプチド融合タンパク質を競合的に阻害した。図8を参照されたい。ヘテロ三量体Gtは、ロドプシン結合の多数の決定因子を含有し、そしてサブユニットのミリストイル化およびサブユニット・カルボキシル末端のファルネシル化を介して、膜結合する。したがって、コンビナトリアル・ライブラリーから選択されたペプチド配列は、非常に高い親和性で受容体に結合する。

40

【0226】

(実施例20)

PAR1へのMBPクローンの結合

[000218] PAR1に結合する高親和性ペプチドを同定するため、PAR1を過剰発現している哺乳動物細胞(チャニーズハムスター卵巣細胞)から調製した膜を、G11ペプチドライブラリーでパニングした。選択したクローンのELISA結合親和性の

50

結果を、P A R 1 または G q 共役型ムスカリン性 M 1 受容体いずれかを発現している S F 9 細胞から調製した膜への結合に関して、図 9 に示す。結合を定量化するため、二次抗体が H R P にコンジュゲート化されている E L I S A 法を用いて、精製 M B P クローンを解析した。対照 M B P - G q 融合タンパク質に関する結合を示す。図 9 を参照されたい。データは、二つ組で行った 2 回の別個の実験の平均である。M B P クローン、P A R - 1 3 および P A R - 3 4 は、どちらも、P A R 1 に対して高い結合親和性ととも特異性を示す。M B P クローン、P A R - 2 3 および P A R - 3 3 は、どちらも、低親和性および低特異性であるようである。配列に関しては、表 X I I I を参照されたい。

#### 【0227】

(実施例 21)

##### L a c I - ペプチド融合タンパク質の結合特異性

[000219] G 11 ライブラリーから選択された、L a c I - ペプチド融合タンパク質の P A R 1 結合クローンを、H E K / D T T 中で 1 : 100 に希釈し、そして実施例 3 にしたがって調製した、受容体を発現しないか、M 1 受容体 ( G i に共役する ) または P A R 1 受容体を発現する細胞由来の S f 9 昆虫細胞膜への用量 - 反応結合に関して試験した。図 10 に示すように、増加する量の膜を、マイクロタイターウェルにコーティングし、インキュベーションし、そしてリンスした。L a c I - ペプチド融合タンパク質溶解物を添加し、インキュベーションし、そしてリンスし、そして L a c I 抗体を用いて、上述のように受容体と結合した L a c I - ペプチド融合タンパク質を測定した。単一の代表的なクローンを図 10 に示し、そしてこれによって、P A R 1 に対する選択されたペプチドの特異性が立証される。

#### 【0228】

(実施例 22)

##### P A R 1 への天然 G q - マルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質の結合

[000220] 実施例 6 に上述するように、100 nmol の トロンピン受容体活性化ペプチドの存在下で、精製した再構成 P A R 1 でマイクロタイターウェルをコーティングした。精製マルトース結合タンパク質 - G q ( M B P - G q ) を図 11 に示す濃度で添加し、そして 4 で 1 時間、振盪装置上でインキュベーションした。ウェルをリンスし、そして次いで、上述のように、ウサギ抗マルトース結合タンパク質抗体で探査し、次いでアルカリホスファターゼ・コンジュゲート化二次抗体で探査した。基質を添加し、そして約 20 分間発色させた。405 nm で吸光度を測定し、そして G r a p h P a d P r i s m ( バージョン 2.0 ) を用いて、用量 - 反応曲線を計算した。図 11 の結果を参照されたい。活性化 P A R 1 への G q 結合の計算 I C<sub>50</sub> は、214 nM であった。

#### 【0229】

(実施例 23)

##### G ペプチド・ミニ遺伝子構築物用のオリゴヌクレオチドの設計

[000221] 新規に操作された 5' 端および 3' 端とともに、G サブユニットの最後の 11 アミノ酸をコードする c D N A を合成した ( G r e a t A m e r i c a n G e n e C o m p a n y ) 。 5' 端は B a m H I 制限酵素部位を含有し、その後、ヒト・リボソーム結合コンセンサス配列 ( 5' - G C C G C C A C C - 3' ; 配列番号 269 ) 、翻訳開始のためのメチオニン・コドン ( A T G ) 、並びに翻訳中のリボソーム結合部位および新生ペプチドをタンパク質分解から保護するためのグリシン・コドン ( G G A ) を含有した。翻訳停止コドン ( T G A ) の直後の 3' 端に H i n d I I I 制限酵素部位を合成した。したがって、G i<sub>1/2</sub> カルボキシル末端配列の全長 56 b p オリゴヌクレオチドは

5' - g a t c c g c c g c c a c c a t g g g a a t c a a g a a c a a c c t g a a g g a c t g c g g c c t c t t c t g a a - 3' ( 配列番号 270 ) であり、そして相補鎖は、

5' - a g c t t t c a g a a g a g g c c g c a g t c c t t c a g g t t g t t c t t g a t t c c c a t g g t g g c g g c g - 3' ( 配列番号 : 271 ) であった。図

10

20

30

40

50

12を参照されたい。対照として、新規に操作された5'端および3'端とともに、ランダムな順序でG<sub>i1</sub>/2カルボキシル末端をコードするオリゴヌクレオチド(G<sub>iR</sub>)もまた、合成した。

#### 【0230】

[000222] DNAを無菌ddH<sub>2</sub>O中に希釈して、100μMのストック濃度を形成した。1xNEBuffer3(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、1mM DTT; New England Biolabs)中で、相補的DNAを85℃で10分間アニーリングし、次いで、ゆっくりと室温に冷却した。次いで、DNAを4%アガロースゲル電気泳動に供し、そしてアニーリングしたバンドを切除した。製造者のプロトコルにしたがって、キットを用い(GeneClean IIキット、Bio101)、バンドからDNAを精製した。各制限酵素で消化した後、pcDNA3.1(-)プラスミドベクターを0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、適切なバンドを切り出し、そして上述のようにDNAを精製した(GeneClean IIキット、Bio101)。あらかじめBamHIおよびHindIIIで切断した、切断/清浄化pcDNA3.1プラスミドベクター(Invitrogen)に、アニーリング/清浄化cDNAを、室温で1時間連結した。

10

#### 【0231】

[000223] 連結反応のため、ベクターcDNAに対して、いくつかの異なる比の挿入物(25μM:25pM~250pM:25pMのアニーリングcDNAの範囲)をプレーティングした。連結反応後、試料を65℃に5分間加熱して、T4 DNAリガーゼを非活性化した。実施例7に記載するように、連結混合物(1μl)を50μlのコンピテント細胞にエレクトロポレーションし、そして直ちに細胞を1mlのSOC(Gibco)に蒔いた。37℃で1時間振盪した後、ミニ遺伝子プラスミドDNAを含有する100μlのエレクトロポレーション細胞を、LB/Ampプレート上に蒔き、そして37℃で12~16時間インキュベーションした。挿入物が存在することを確認するため、LB/Amp中でコロニーを一晚増殖させ、そしてそのプラスミドDNAを精製した(Qiagen Spinキット)。プラスミドDNAを、NcoI(New England Biolabs, Inc.)で、37℃で1時間消化し、そして1.5%(3:1)アガロースゲル電気泳動に供した。ベクターのみの場合、3本のバンドが生じた。56bpのアニーリングしたオリゴヌクレオチド挿入物が存在する場合、消化パターンが3本のバンド(3345bp、1352bp、735bp)から4本のバンド(3345bp、1011bp、735bp、380bp)になるように、バンドパターンにシフトを生じる、新規NcoI部位が存在する。図13を参照されたい。正しい電気泳動パターンを持つDNAを配列決定して、適切な配列であることを確認した。この方法を用いて、高親和性ペプチドいずれかを挿入し、ミニ遺伝子を一定して生成することも可能である。

20

30

#### 【0232】

(実施例24)

#### ミニ遺伝子構築物からのペプチドの発現

[000224] 多様なGタンパク質サブユニット(G<sub>i</sub>、G<sub>o</sub>、G<sub>s</sub>、G<sub>q</sub>、G<sub>11</sub>、G<sub>12</sub>、G<sub>13</sub>、G<sub>14</sub>)のカルボキシル末端配列に対応するミニ遺伝子挿入物とともに、ランダムな順序のG<sub>i</sub>配列を含有する対照ミニ遺伝子(G<sub>iR</sub>)を含む構築物を用いて、GPCR結合ペプチドの発現を達成した。5'端および3'端に、それぞれ、BamHIおよびHindIII制限部位を含む、各G<sub>i</sub>のカルボキシル末端由来のペプチド配列に対応する短い相補的オリゴヌクレオチドを合成することによって、ミニ遺伝子挿入物DNAを作成した。相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングし、そしてその開示が本明細書に援用される、Gilchristら, J. Biol. Chem. 274:6610-6616, 1999の方法にしたがって、哺乳動物発現ベクターpcDNBA3.1に連結した。

40

#### 【0233】

[000225] その開示が本明細書に援用される、Sambrookら, Mole 50

50

cular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク, vol. 1-3 (1989)の方法にしたがって、標準的リン酸カルシウム法を用いて、ヒト胚性腎 (HEK) 293細胞をトランスフェクションした。トランスフェクション細胞におけるミニ遺伝子構築物の転写を確認するため、当該技術分野に知られる方法を用いて、pcDNA-G<sub>i</sub>またはpcDNA-G<sub>i</sub>Rでトランスフェクションした48時間後、細胞から総RNAを単離した。逆転写酵素PCRを用いてcDNAを作成し、そして適切なG<sub>i</sub>カルボキシル末端ペプチド挿入物に特異的なプライマー(順方向: 5'-ATCCGCCGCCACCATGGGA(配列番号272);逆方向: 5'-GCGAAAGGAGCGGGGCGCTA(配列番号273))とともに、テンプレートとして該cDNAを用いて、PCR解析を行った。G<sub>i</sub>ミニ遺伝子のこれらのプライマーは、挿入されたペプチド・コード・オリゴヌクレオチドが存在する場合のみ、434bp断片を増幅する;空のpcDNA3.1ベクターでトランスフェクションされた細胞には、バンドは観察されない。PCR産物を1.5%アガロースゲル上で分離した。単一の434bpのバンドが存在していれば、G<sub>i</sub>カルボキシル末端ペプチド・ミニ遺伝子RNAが転写されていたことが示された。図14を参照されたい。ベクター逆方向プライマーとともにT7順方向プライマーを用いて、pcDNA3.1ベクターの存在を確認し、そしてG3DPHプライマー(Clonetech)を用いて総RNAの量を近似する、対照実験を行った。

10

## 【0234】

20

[000226]ペプチドがトランスフェクション細胞で産生されていることを確認するため、既知の方法にしたがって、トランスフェクション48時間後、細胞を溶解し、そしてホモジナイズした。以下のように、勾配逆相HPLCによって、細胞質抽出物を解析した: ddH<sub>2</sub>O中の0.1% TFAで平衡化したC4カラム(Vydac)上に、100μlの細胞質分画抽出物を装填した。45分間に渡って0~60%に増加するアセトニトリル勾配中の0.1% TFAを用いて、ペプチドを溶出した。ピークを収集し、凍結乾燥し、そしてイオンスプレー質量分析(University of Illinois-Urbana Champagne)を用いて分析した。G<sub>i1,2</sub>ペプチドベクター(pcDNA-G<sub>i</sub>)でトランスフェクションした細胞由来のピーク1、およびpcDNA-G<sub>i</sub>Rでトランスフェクションした細胞由来のピーク1の質量分析によつて、各細胞質抽出物には、1450ダルトンのペプチド(どちらの13アミノ酸のペプチド配列に対しても、期待される分子量)が存在することが示された。ミニ遺伝子がコードするペプチドが、細胞質で見られる主要なタンパク質であり、ベクターが適切なペプチド配列を多量に産生したことが強く示唆された。

30

## 【0235】

(実施例25)

トロンピンが仲介するイノシトールリン酸集積の、界面Gタンパク質ペプチドによる阻害

[000227]トランスフェクションの24時間前に、HMECを6ウェルプレートに1x10<sup>5</sup>ウェルで植えた。実施例24に記載するように、pcDNA3.1、pcDNA-G<sub>i</sub>、pcDNA-G<sub>i</sub>R、またはpcDNA-G<sub>q</sub>で細胞を一過性にトランスフェクションした。24時間後、4μCi/ml [<sup>3</sup>H]-ミオイノシトールを含有する2ml培地中で細胞をインキュベーションして、細胞イノシトール脂質の定常状態の標識を得た。トランスフェクション48時間後、イノシトールリン酸(IP)集積に関して、一過性にトランスフェクションした細胞をアッセイした。-トロンピンでの刺激の2時間前に、細胞を洗浄し、そして5mM LiClを含有する培地で、培地交換した。細胞を10nM -トロンピンで10分間刺激した。培地を吸引し、そして氷冷メタノール(最終濃度5%)を添加することによって、イノシトールリン酸(IP)形成を停止した。

40

## 【0236】

50

【000228】過塩素酸で溶解した細胞を、4、2500rpmで5分間遠心分離した。1.6ml陰イオン交換樹脂(DOWEX AG1-X8、ギ酸型、200~400メッシュ)を含有するPoly-Prepクロマトグラフィーカラム(Bio-Rad)を通じて、IPを含有する上清を溶出した。過塩素酸沈殿したペレット(ホスファチジルイノシトールおよび脂質を含有する)を1mlのクロロホルム-メタノール-10M HCl(200:100:1、v/v/v)に再懸濁した。これらの懸濁物を350μlのHClおよび350μlのクロロホルムと混合し、そして2500rpmで5分間沈降して、相を分離した。より下の疎水相を回収し、そして総ホスファチジルイノシトール中の放射能の量を測定するため、計測バイアル中で乾燥させた。生じた $[^3\text{H}]$ -IPの相対量を以下のように計算した： $([^3\text{H}]$ -IP(cpm)/ $[^3\text{H}]$ -IP(cpm) +  $[^3\text{H}]$ -イノシトール(cpm))。pcDNAトランスフェクション細胞で得た基底値(トロンピン刺激なし)を用いて、各値を規準化した。図15を参照されたい。示す結果は、三つ組で行った少なくとも3回の独立した実験の規準化した平均±SEMである。\* \* 記号は $p < 0.005$ を示す。結果によって、トロンピンの添加が、対照細胞(pcDNA、pcDNA-GiR)におけるIP産生を増加させることが示される。pcDNA-Gqでトランスフェクションした細胞では、トロンピンが仲介するIP産生の増加が見られず、一方、pcDNA-Giでトランスフェクションした細胞では、通常の反応が見られた。これによって、Gq C末端ミニ遺伝子ベクターをHMECにトランスフェクションして、続いて、Gq C末端ペプチドが発現されると、トロンピンが仲介するIP増加が阻害されることが示される。

10

20

【0237】

(実施例26)

トロンピンが誘導するP1加水分解および細胞内 $\text{Ca}^{++}$ 増加の、界面Gタンパク質ペプチドによる阻害

【000229】Gq C末端ミニ遺伝子ベクターの発現が、細胞内 $[\text{Ca}^{++}]_i$ レベルに影響を及ぼしうるかどうかを決定するため、空のベクター(pcDNA)、あるいは受容体に結合する能力に関して同定された、高親和性ペプチドをコードする、pcDNA-Gi、pcDNA-Gq、またはpcDNA-GiRミニ遺伝子DNA(1μg)でHMECをトランスフェクションした。トランスフェクション細胞を、トランスフェクション48時間後、24ウェルプレートのカバーガラス上に、低集密度(confuency)で蒔いた。細胞を2時間接着させた。培地を吸引し、そして各カバーガラスを10μMオレゴングリーン488 BAPTA-1アセトキシメチルエステル(カルシウム感受性色素)および0.1%(v/v)プルロニックF-127とインキュベーションし、そして37で20~30分間インキュベーションし、次いで洗浄緩衝液で2回リンスした。 $\text{Ca}^{++}$ 緩衝液中でトロンピン(~70nM)を添加する前に、基底状態を確立した。10秒ごとに記録を行い、そしてトロンピンでの刺激後は、170秒間続けて記録した。NIH Imageを用いて画像を定量化した。少なくとも70の細胞からの個々に記録したデータを用いて、蛍光変化(y軸)を計算した。トロンピン添加30秒後に、蛍光( $[\text{Ca}^{++}]_i$ レベル)が増加することを示す、図16Aを参照されたい。図16Aの各バーは、70を超える個々の記録した細胞の平均( $(F_s - F_B) / F_B - 1$ ) ± SEMに相当する。\* \* 記号は $p < 0.005$ を示す。図16Bは、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の動力学; トロンピンで細胞を刺激した後の蛍光変化を示す。示すデータは、空のベクター(pcDNA)またはGq C末端ミニ遺伝子ベクター(pcDNA-Gq)のcDNAでトランスフェクションした細胞の各記録時点での平均( $(F_s - F_B) / F_B - 1$ ) ± SEMを示す。矢印は、トロンピンを添加した時間を示す。各時点は、100を超える個々の記録した細胞に相当する。

30

40

【0238】

【000230】図16に示すように、トロンピン添加によって細胞を活性化した後、細胞内 $[\text{Ca}^{++}]_i$ レベルが一過性に増加した。トロンピン添加の30秒後、pcDNA-Gqでトランスフェクションした細胞は、pcDNAでトランスフェクションした

50

細胞に比較して、44%減少した、カルシウム反応を有した(図16A)。トロンビン刺激後に測定したすべての時点を平均すると、p c D N A - G qトランスフェクション細胞は、p c D N Aでトランスフェクションした細胞に比較して、45%の減少を有した(図16B)。p c D N A - G iまたはp c D N A - G i Rでトランスフェクションした細胞は、トロンビン刺激された $[Ca^{++}]_i$ レベルにはいかなる影響も持たなかったため、この減少は特異的であるようであった。したがって、G q C末端ペプチドを発現する細胞は、トロンビンでの活性化後に $[Ca^{++}]_i$ レベルを刺激する能力が阻害されているようであり、これは、G qの発現によって、この下流仲介因子が特異的に遮断されたことを示す。

#### 【0239】

[000231] p c D N A、p c D N A - G i R、p c D N A - G i、p c D N A - G q、またはp c D N A - G sミニ遺伝子構築物を、HMECにトランスフェクションし、そしてイノシトールリン酸(IP)集積をアッセイするのに用いた。24時間後、細胞を24ウェルプレートに再度植え付け、そして $[^3H]$ -ミオイノシトール( $2\mu Ci/ml$ )で標識した。48時間後、細胞をリンスし、そしてトロンビン( $10nM$ )を含みまたは含まずに10分間インキュベーションした。 $[^3H]$ IPを分離するため、Dowex<sup>TM</sup>カラムを用いて、上述のように、総IP集積をアッセイした。生じた $[^3H]$ IPの相対量を以下のように計算した： $([^3H]IP(cpm) / [^3H]IP(cpm) + [^3H]イノシトール(cpm))$ 。p c D N Aトランスフェクション細胞で得られる基底値(トロンビン刺激なし)によって、各値を規準化した。図17を参照されたい。示す結果は、三つ組で行った少なくとも3回の独立した実験の規準化した平均 $\pm$ SEMである。\* \* 記号は $p < 0.005$ を示す。

#### 【0240】

(実施例27)

##### トロンビンが誘導するMAPK活性のGPCR結合C末端ペプチドによる防止

[000232] 実施例24記載の方法を用いて、赤血球凝集素(HA) - MAPK( $1 \times 10^5/ml$ )を、p c D N A、p c D N A - G i、p c D N A - G qまたはp c D N A - G i Rミニ遺伝子構築物とともに、HMECに同時トランスフェクションした。30時間後、細胞を18時間、血清枯渇させ、そして次いで、 $10nM$ トロンビンで20分間処理した。次いで、細胞をRIPA緩衝液( $50mM$  Tris、 $pH 7.5$ 、 $150mM$  NaCl、 $2mM$  EDTA、 $1\%$  Triton X-100、 $0.5\%$  デオキシコール酸、 $0.1\%$  SDS、 $10\%$  グリセロール、 $10\mu g/ml$  アプロチニンおよび $10\mu g/ml$  ロイペプチン)で溶解し、そして12CA5抗体(Roche Molecular Biochemicals; インディアナ州インディアナポリス)(1時間、 $4^\circ C$ )およびプロテインAセファロースビーズ(3時間、 $4^\circ C$ )を用いて、HA-MAPKタンパク質を免疫沈降した。RIPA緩衝液中、免疫複合体を3回洗浄した。マルトース結合タンパク質(MBP)基質およびキナーゼアッセイキット(Upstate Biotechnology, Inc.、ニューヨーク州レークブラシッド)を用いて、免疫沈降物のキナーゼ活性を測定した。各々に関してMAPK活性( $nmol/分/mg$ )を得て、そしてMAPK活性の相対的增加(トロンビンが仲介する倍増加)を以下のように計算した： $(刺激された活性(nmol/分/mg) - 基底活性(nmol/分/mg)) / 基底活性(nmol/分/mg)$ 。結果を図18に、少なくとも3回の独立した実験の平均 $\pm$ SEMとして示す。\* 記号は $p < 0.05$ を示す。

#### 【0241】

[000233]  $10nmol$ のトロンビンを添加すると、p c D N A対照ベクターでトランスフェクションした細胞では、HA-MAPK活性に3.66倍の増加が生じた。同様に、p c D N A - G i Rでトランスフェクションした細胞は、トロンビン仲介MAPK活性の本質的に均等な増加(4.46倍の増加)を有した。しかし、G i、G q、G 12またはG 13 GPCR結合ペプチドをコードするミニ遺伝子構築物でトランスフェクションした内皮細胞は、p c D N Aでトランスフェクションした細胞に比較して

10

20

30

40

50

、トロンピンが仲介するH A - M A P K活性の有意な減少を示した（それぞれ、59%、57%、50%および77%）。

【0242】

（実施例28）

トロンピン誘導性の経内皮電気抵抗の減少

[000234] G<sub>q</sub>、G<sub>i</sub>、G<sub>iR</sub>ミニ遺伝子構築物を発現するか、またはミニ遺伝子構築物を発現しないHMEC単層に、交流（50μA；毎分2パルス）を流すことによって、経内皮電気抵抗（TEER）を測定した。基底TEERは、ミニ遺伝子トランスフェクションによって、有意に変化しなかった。しかし、10nMのトロンピンを添加すると、10nMトロンピンの存在下の非トランスフェクション細胞に比較して、G<sub>q</sub>ミニ遺伝子を発現している細胞のTEERに減少が見られた。図19を参照されたい（多数の実験の代表）。トロンピンに反応した経内皮電気抵抗の減少は、G<sub>q</sub>のカルボキシル末端のミニ遺伝子でトランスフェクションした内皮細胞で有意に減少したが、G<sub>i</sub>、G<sub>iR</sub>、または空のベクターでトランスフェクションした細胞では、まったく影響はなかった。これらの結果によって、G<sub>q</sub>が、内皮細胞形状変化に対するトロンピンの効果に部分的に関与することが示唆された。

10

【0243】

（実施例29）

トロンピン仲介性ストレスファイバー形成の阻害

[000235] HMEC細胞を、p c D N A、p c D N A - G<sub>12</sub>またはp c D N A - G<sub>13</sub>ミニ遺伝子構築物各1μg / 100mmプレートでトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞のマーカーとして、緑色蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子を含むp Green Lantern - 1プラスミドを、ミニ遺伝子構築物とともに、同時トランスフェクションした。48時間後、細胞を18時間血清枯渇させ、そして10nMトロンピンで20分間処理した。トロンピンに曝露した後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X - 100で透過処理し、そして1mMローダミン - ファロイジンでF - アクチンに関して30分間染色した。細胞を徹底的に洗浄し、Vectashield<sup>TM</sup> アンチフェード・マウント培地（Vector Laboratories, Inc.）を用いてマウントした。60x油浸対物レンズを用いる、微分干渉顕微鏡および落射蛍光（epifluorescence）観察両方を備えた倒立顕微鏡（Diaphot 200, Nikon, Inc.）で細胞を観察した。蛍光画像およびDIC画像を、顕微鏡に接続された冷却積算CCDアレイカメラ（Imagepoint, Photometrics, Ltd.）を用いて、各細胞フィールドに関して記録した。G<sub>12</sub>ペプチドおよびG<sub>13</sub>ペプチドによる、トロンピン仲介性ストレスファイバーの阻害を示す蛍光画像に関しては、図20を参照されたい。

20

30

【0244】

[000236] p c D N Aでトランスフェクションした血清枯渇細胞は、辺縁に、薄い表層（cortical）F - アクチンの縁を示し、そしてストレスファイバーをほとんど含有しなかった（図20、パネルA）。存在するものは、目立たず、そしてランダムな方向を向いているようであった。p c D N AでトランスフェクションしたHMECでは、トロンピンへの曝露の20分後、アクチンが顕著なストレスファイバーに再編成され、典型的には細胞の長軸に沿った平行のパターンに配置された（図20、パネルB）。p c D N A - G<sub>12</sub>（図20、パネルC）またはp c D N A - G<sub>13</sub>（図20、パネルD）ミニ遺伝子でトランスフェクションした細胞では、トロンピンへの曝露後、非常に異なるパターンが観察された。p c D N A - G<sub>12</sub>およびp c D N A - G<sub>13</sub>トランスフェクション細胞のどちらでも、トロンピン刺激はストレスファイバーの出現を生じなかった。p c D N A - G<sub>13</sub>でトランスフェクションした細胞では、周辺のアクチンの縁が、より厚く、そしてより直線性であるようであり、細胞 - 細胞接合部の明らかな輪郭を提供した。したがって、先の報告と一致して、トロンピンは、内皮細胞において、迅速なストレスファイバー形成を誘導した。p c D N A - G<sub>12</sub>またはp c D N A - G<sub>13</sub>ミニ

40

50

二遺伝子いずれかのトランスフェクションは、トロンピンに誘導されるストレスファイバー形成をもはや示さない細胞を生じた。ストレスファイバー形成が、小さいGTPアーゼRhoに依存することを考慮すると、これらの結果は、G<sub>12</sub>およびG<sub>13</sub>が、Rhoシグナル伝達に緊密に関連するという他の知見と一致し、そしてGPCR結合ペプチドが、細胞内で発現された際に、このGタンパク質経路を特異的に遮断する能力を有することを立証する。

【0245】

(実施例30)

GPCR結合ペプチドによる、単一の損なわれていない細胞におけるGタンパク質活性の阻害

10

[000237] M<sub>2</sub> mAChRを安定して発現する(～400 fmol受容体/mgタンパク質)、ヒト胚性腎(HEK)293細胞を、10%ウシ胎児血清(Gibco)、ストレプトマイシン/ペニシリン(各100U; Gibco)およびG418(500 mg/l; Gibco)を補ったDMEM(Gibco)中で増殖させた。10% CO<sub>2</sub>中、37℃で細胞を増殖させた。電気生理学的研究のため、すべてのトランスフェクションにおいて、CD8レポーター遺伝子系を用い、抗CD8-抗体でコーティングしたDynabeads<sup>TM</sup>(Dyna1)を用いて、トランスフェクション細胞を視覚化した。以下の量のcDNAを用いて、細胞をトランスフェクションした: pC1-GIRK1(ラット)-1 μg; H3-CD\* (ヒト)-1 μg; pcDNA3.1、pcDNA-G<sub>i</sub>、pcDNA-G<sub>i</sub>R、pcDNA-G<sub>q</sub>、またはpcDNA-G<sub>s</sub>-4 μg。したがって、典型的には、1つの10 cmディスクをトランスフェクションするのに用いるcDNAの総量は7 μgであった。GIRK1およびGIRK4のcDNAは、F. LesageおよびM. Lazdunski(フランス・ニース)から寄贈された。Schenbornら, Meth. Mol. Biol. 130:135-145, 2000の方法にしたがって、HEK細胞の一過性トランスフェクションには、標準的リン酸カルシウム法を用いた。すべてのアッセイを、トランスフェクション48～72時間後に行った。

20

【0246】

[000238] M<sub>2</sub> mAChRを安定して発現するHEK293細胞を、GIRK1、GIRK4およびpcDNA-G<sub>i</sub>、pcDNA-G<sub>s</sub>、またはpcDNA-G<sub>q</sub>いずれかで一過性にトランスフェクションして、全細胞電流を記録した。内向きに整流されたK<sup>+</sup>流の測定には、120 mM NaCl; 20 mM KCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; および10 mM HEPES-NaOH、pH 7.4を含有する細胞外溶液を用いて、全細胞電流を記録した。パッチピペットを満たす溶液は、100 mM グルタミン酸カリウム; 40 mM KCl; 5 mM MgATP; 10 mM HEPES-KOH、pH 7.4; 5 mM NaCl; 2 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; および0.01 mM GTPで構成された。慣用的な全細胞パッチ技術を用いて、電圧固定下で、膜電流を記録した。その開示が本明細書に援用される、Bunemannら, J. Physiol. 489:701-777, 1995およびBunemannら, J. Physiol. 482:81-89, 1995を参照されたい。異なるトランスフェクション条件または培養条件による変動を最小限にするため、対照実験(pcDNA-G<sub>i</sub>Rでのトランスフェクション)を平行して行った。水平プレー(P-95 Fleming & Poulsen)を用いて、ホウケイ酸ガラスキャピラリー(GF-150-10, Warner Instrument Corp.)でパッチピペットを製作した。満たしたピペットのDC抵抗は、3～6 MΩの範囲であった。

30

40

【0247】

[000239] パッチクランプ増幅器(Axopatch 200, Axon Instruments)を用いて膜電流を記録した。ローパス・ベッセルフィルター(1～3 kHz コーナー周波数)を用いて、シグナルをアナログ・フィルター処理(analog-filtered)した。電圧調節、データ獲得およびデータ評価用のハードウェア

50

ソフトウェアパッケージ (MFK、ドイツ・フランクフルト/マインによるISO2) を備えたIBM適合PCを用いて、データをデジタル保存した。内向き方向の $K^+$ 流を測定するため、カリウム平衡電位を約 $-50\text{ mV}$ に設定し、そして保持電位は $-90\text{ mV}$ であった。300m秒以内の溶液交換を可能にする、ソレノイド作動性灌流装置を用いて、アセチルコリン (ACh;  $1\text{ }\mu\text{M}$ ) の適用によって、アゴニスト誘導性電流を誘発した。10秒ごとに直線電圧傾斜 ( $500\text{ m秒以内に } -120\text{ mV} \sim +60\text{ mV}$ ) を適用した。アゴニスト非依存性電流を減じることによって、アゴニストが誘導する電流の電流電圧特性を決定することが可能であった。機能するチャネルを発現していない可能性がある細胞由来の電流が記録された実験を排除するため、基底のアゴニスト非依存性 $Ba^{++}$  ( $200\text{ }\mu\text{M}$ ) 感受性内向き整流電流を示す細胞のみを解析に用いた。データ解析のため、AChが誘導する内向き整流 $K^+$ 流の最大電流密度 (ピーク振幅) を $-80\text{ mV}$ で測定し、そして比較した。

10

## 【0248】

[000240] GIRK1/GIRK4およびpcDNA-GiまたはpcDNA-GiR DNAで一過性にトランスフェクションしたHEK293細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のAChで灌流すると、pcDNA-Gi DNAでトランスフェクションした細胞が、 $M_2$  mAChRアゴニストに対して、劇的に損なわれた反応を有することが明らかになった。異なるトランスフェクション条件 (GIRK1/GIRK4およびpcDNA-Giでトランスフェクションした細胞、またはGIRK1/GIRK4およびpcDNA-GiRでトランスフェクションした細胞) に関する、AChが誘発する電流の最大振幅を示すデータを要約した、図21を参照されたい。pcDNA-Giミニ遺伝子ベクターは、Giペプチドの細胞内高発現を生じ、受容体がヘテロ三量体Giをシグナル伝達する能力の減少を導く。

20

## 【0249】

[000241] AChによって誘発された最大電流は、pcDNA-GiRでトランスフェクションした細胞における $24.1 \pm 8.8\text{ pA/pF}$  ( $n=11$ ) に比較して、pcDNA-Giでトランスフェクションした細胞において、 $3.7 \pm 1.5\text{ pA/pF}$  ( $n=14$ ) であった。これは、Giミニ遺伝子構築物が、アゴニストが仲介する $M_2$  mAChR GIRK1/GIRK4反応を完全に遮断する一方、対照ミニ遺伝子構築物 (pcDNA-GiR) がまったく影響を持たないことを示す。図21Aを21Bおよび21Cに比較されたい。GqまたはGsのGカルボキシル末端をコードするミニ遺伝子構築物、pcDNA-GqまたはpcDNA-Gsでトランスフェクションした細胞は、対照ベクターでトランスフェクションした細胞のものと有意に異ならなかった。これらの知見によって、 $M_2$  mAChRが活性化するGタンパク質共役型内向き整流 $K^+$ 流反応の、Giミニ遺伝子の発現による阻害が特異的であることが確認される。

30

## 【0250】

(実施例31)

ヒト微小血管内皮細胞における選択的Gタンパク質シグナル伝達阻害

[000242] トロンピン受容体PAR1を天然に発現するヒト微小血管内皮細胞 (HMEC) において、Gタンパク質シグナル伝達最終作用の異なる測定値をアッセイした。 $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルで、6ウェルプレート上に細胞を植え付け、そして24時間後、製造者のプロトコルにしたがって、Effectene (Qiagen) を用いて、Gカルボキシル末端ペプチドを含有するミニ遺伝子構築物 (pcDNA、pcDNA-Gi、またはpcDNA-GiR; ウェルあたり $1\text{ }\mu\text{g}$ ) で一過性にトランスフェクションした。24時間後、 $3\text{ }\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] - アデニンで細胞を37で30分間標識した。さらに24時間後、 $1\text{ mM}$  イソブチル-メチルキサンチンを含有する血清不含培地で、細胞を洗浄した。cAMP集積を刺激するため、 $1\text{ }\mu\text{M}$  イソプロテレノールで、37で30分間、細胞を処理した。cAMP集積に対するトロンピンの阻害効果を見るため、イソプロテレノールを添加する15分前に、細胞をトロンピン ( $50\text{ nM}$ ) であら

40

50

かじめ処理した。培地を吸引した後、氷冷5%トリクロロ酢酸を添加することによって、反応を終結させた。

【0251】

[000243] (cAMP / cAMP + ATP) × 1000として、図22に結果を提供する。二つ組で3回の別個の実験を行った。\* \* 記号は  $p < 0.005$  を示す。基底cAMPレベルは、試験した条件すべてで、本質的に均等であった。イソプロテレノールで内皮細胞を刺激すると、 $\alpha$ -アドレナリン作用性受容体が活性化され、Gs経路を通じて、該細胞のcAMPレベルが増加する。pcDNA、pcDNA-Gi、またはpcDNA-GiRでトランスフェクションした細胞は、ほとんど相違を示さず、イソプロテレノールが仲介するcAMP集積の増加は、それぞれ、82倍、64倍、および77倍であった。イソプロテレノールを添加する前に、内皮細胞をあらかじめトロンピンとインキュベーションすると、Gi経路のトロンピン活性化のため、cAMPレベルの減少が観察された。pcDNAでトランスフェクションし、そしてトロンピンとあらかじめインキュベーションした内皮細胞は、イソプロテレノールのみで刺激した細胞よりも、cAMPレベルの39%の減少を示した。同様に、pcDNA-GiRでトランスフェクションし、そしてトロンピンとあらかじめインキュベーションした細胞は、イソプロテレノールのみで刺激した細胞よりも、43%の減少を示した。しかし、pcDNA-Giでトランスフェクションし、そしてトロンピンとあらかじめインキュベーションした細胞は、イソプロテレノールのみで刺激した細胞と比較して、cAMPレベルの0.1%の減少しか示さなかった。したがって、GiC末端ペプチドを発現している細胞は、トロンピンでの活性化後、アデニルシクラーゼを阻害不能であるようであり、トロンピンが仲介するGiシグナル伝達が、pcDNA-Giミニ遺伝子の発現によって、特異的に阻害されることが示された。

10

20

【0252】

(実施例32)

逆アゴニストを同定するスクリーニング法

[000244] 実施例7に記載するように、ロドプシン受容体を含有する尿素洗浄桿体外節膜断片をマイクロタイターウェル上に固定し、そしてブロックする。受容体を光活性化する。標識した天然Gtカルボキシル末端ペプチドを、各ウェルに添加し、そして4で1時間、穏やかに振盪する。ウェルを洗浄して未結合ペプチドを取り除く。実施例7記載の方法にしたがって調製したGtカルボキシル末端ペプチド由来の未精製細菌溶解物(標識)(200 $\mu$ l)を各ウェルに添加し、そして振盪しながら4で1時間インキュベーションする。

30

【0253】

[000245] 次いで、ウェルを洗浄して未結合標識を取り除く。ELISAによって上清またはウェル結合標識を定量化して、ライブラリーペプチドの非存在下でインキュベーションした対照ウェルと比較して、ライブラリーペプチドとインキュベーションした後の受容体からの標識天然ペプチドの解離を検出する。

【0254】

(実施例33)

小分子ライブラリースクリーニング法

[000246] 以下のように、GPCR仲介Gタンパク質シグナル伝達の阻害に関して、小分子ライブラリーをスクリーニングする。実施例3にしたがって昆虫細胞から調製した、PAR1トロンピン受容体を、マイクロタイターウェル上に固定し、ブロックし、そして洗浄する。ChemDiv(カリフォルニア州サンディエゴ)から購入した小分子ライブラリーを、96ウェルまたは384ウェルプレート中、MBP-ペプチド融合タンパク質(0.1~1000nM)と同時に添加し、そして4で1時間振盪する。小分子を約5~5000nMで用いて、最初のスクリーニングを行う。0.05% Tween 20<sup>T M</sup> および1mMマルトースを含有する冷PBS中、ウェルを4回洗浄する。ライブラリー化合物を含まずにインキュベーションした対照ウェルに対して、実施例17に

40

50

記載するように、抗MBP抗体を用いて、ウェルに付着するマルトース結合タンパク質の量を定量化する。

## 【0255】

(実施例34)

非常に高い親和性で活性化ロドプシンに結合する、Gtに基づくペプチドの同定

[000247]各位ですべてのありうる突然変異を導入するが、K341R変化を含むGt配列に向かう全体のバイアスを伴って、GtのC末端配列に基づくコンビナトリアル・ペプチドライブラリーを構築し、そして高親和性結合に関してパニングした。その開示が本明細書に援用される、Martinら, J. Biol. Chem. 271:361-366, 1996; Gilchristら, Methods Enzymol. 315:388-404, 2000、並びに用いる方法に関しては、実施例7および12を参照されたい。C末端配列内の特定の残基は、非常に保存されていた。おそらく、より興味深いのは、既定の位で天然アミノ酸を選択しない(R341、以下に示すペプチド中の第二の残基)だけでなく、その位で特定のアミノ酸(ロイシン)を選択するようであることである。表XXを参照されたい。表XXIは、GtのC末端配列に基づく同じコンビナトリアル・ペプチドライブラリーを用いた、暗順応ウシ・ロドプシンのスクリーニングから得られるアミノ酸配列を示す。Gtで観察されるように、カルボキシル末端配列内の特定の残基は保存され、そして特定の残基は選択されない。特に、同一の位で(すなわちC347位)、光活性化型ロドプシンおよび暗順応ロドプシンの選択の間には、極端な相違があり、このことは、活性化に際して、受容体がコンホメーション変化を経て、Gタンパク質が相互作用することも可能な新規部位が暴露されることを示す。

## 【0256】

表XX. 光活性化型ロドプシンを用い、GtのC末端配列に基づいてスクリーニングされた、最高親和性アミノ酸配列の並列

## 【0257】

## 【表20】

													配列番号:
Gtライブラリー	xxxx	I	R	E	N	L	K	D	C	G	L	F	124
3	vgrs	I	L	E	N	L	K	D	C	G	L	L	266
7	tskp	M	L	D	N	L	K	D	C	G	L	F	213
8	fvpd	L	L	E	N	L	R	D	C	G	M	F	125
9	trfa	L	Q	Q	V	L	K	D	C	G	L	L	267
10	aldy	I	C	E	N	L	K	D	C	G	L	F	215
17	lnsd	I	L	Q	N	L	K	D	C	G	L	F	212
18	kqrn	M	L	E	N	L	K	D	C	G	L	F	128
23	tggr	V	L	E	D	L	K	S	C	G	L	F	129
24	kgqa	M	L	K	N	L	K	D	C	G	M	F	130

## 【0258】

表XXI. 暗順応ロドプシンを用い、GtのC末端配列に基づいてスクリーニングされた、アミノ酸配列の並列

## 【0259】

【表 2 1】

													配列 番号
Gtライブラリー	xxxx	I	R	E	N	L	K	D	C	G	L	F	124
2	lmec	I	R	E	K	W	K	D	L	A	L	F	143
3	dfwh	V	R	D	N	L	K	N	C	F	L	F	144
7	pgmh	I	G	E	Q	I	E	D	C	G	P	F	145
17	lrht	I	R	N	N	L	K	R	Y	G	M	F	146
21	lkaw	I	R	E	N	L	K	D	L	G	L	V	147
26	glfk	I	R	E	N	F	K	Y	L	G	L	W	148
33/37	rklt	S	L	E	I	L	K	D	W	G	L	F	149
31	rpkl	I	R	G	T	L	K	G	W	G	L	F	150

10

## 【0260】

[000248] 光順応ロドプシンに対する結合に関して選択されたすべての高親和性配列において、通常、陽性に荷電した残基である341位が中性残基に変化した。RからLへの特定のアミノ酸変化が選択されるようである。この単一の変化を含んで合成したペプチドを、高親和性結合に関してアッセイし、そして結果を表XXに示す。暗順応ロドプシンに対する結合に関して選択したペプチドでは、341位の中性アミノ酸を支持する選択はなかった。表XXIを参照されたい。Argが75%に見られる。光活性化型ロドプシンに関して選択されたペプチドでは、Leu344、Cys347、およびGly348が不変であることが見出され、そして340位、349位および350位には、疎水性残基が常に位置し、これらの残基が重要な性質を持つことが示された。これは、暗順応ロドプシンへの結合に関して選択されるペプチドとはかなり異なっており、暗順応ロドプシンには、不変な位はまったくなかった。最も特筆すべきなのは、Cys347位を選択しないようであることである。Cys347およびGly348はどちらもII'型ターンの一部であり、これはMII安定化に必要である。これによって、GtのCys347に結合するのに必要なロドプシン上の部位が、受容体が光子を受け取り、そしてMIIを形成した後に初めて暴露されることが示唆される。Gilchristら, *Methods Enzymol.* 15:388, 2000を参照されたい。他の研究によって、光活性化型ロドプシンに結合するCys347の重大な性質は、その疎水性のためであることが示されている。Arisら, *J. Biol. Chem.* 276:2333, 2001。Cys347を、疎水性アミノ酸で置換すると(Cys347Met、Cys347ValおよびCys347Abu)(Abu=2-アミノ酪酸)、親ペプチドと同じ度合いに、そして類似の強度で、MIIが安定化される。暗順応ロドプシンペプチドにおいて、347でLysが選択されるようであることから、暗順応ロドプシンへのGtペプチドの結合が、光活性化型ロドプシンとは非常に異なることが明らかに示される。これらの結果によって、GtのC末端テールに認識されるロドプシン上の部位は、受容体が暗順応しているかまたは光活性化されているかに応じて異なることが示される。これは、光活性化型ロドプシンへの結合に関して選択された高親和性ペプチドが、活性化状態の受容体のみ結合し、そして暗順応受容体には結合しないことを暗示する。

20

30

40

## 【0261】

(実施例35)

メタロドプシンIIに対する、ペプチド、ペプチド-融合タンパク質または小分子の親和性を決定するアッセイ

[000249] 「エキストラMII」アッセイでは、EDTAで洗浄したロドプシン(実施例5; 5 μM)を、100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、および1 mM DTTを含む50 mM HEPES緩衝液、pH 8.2中、Gt340-350類似体ま

50

たはG tの非存在下または多様な濃度での存在下で、5.3でインキュベーションする。390nmおよび440nmのSLM Aminco DW2000分光光度計中、水ジャケット型および温度調節型循環装置キュベットホルダーを用いて、試料を5.4に維持する。ロドプシンの10%をブリーチする閃光を提示し、そして1分間インキュベーションした後、第二のスペクトルを測定し、そしてスペクトルの相違を計算する。390nmおよび440nmの吸光度間の相違として、「エキストラ」MIIを計算する。プログラムGraph Pad PRISMを用いた非線形回帰によって、 $t_{340350}$ ( )、突然変異体340-350K341L( )、およびヘテロ三量体Gt(v)によるMII安定化の用量反応曲線を解析し、そして図23に示す。

#### 【0262】

[000250] MII崩壊アッセイでは、ペプチド、高親和性ペプチドを発現する融合タンパク質または小分子の存在下、0.1M KCl、0.1mM EDTA、1mM DTTを含有する10mM  $K_2PO_4$ 、pH6.5中、SLM Aminco DW2000分光光度計中で、EDTAで洗浄したROS(10 $\mu$ M)の吸光度スペクトルを測定する。スペクトルを暗所で測定し、次いで、室内光で完全にブリーチする。ブリーチした試料のスペクトルを、6時間の期間に渡って、30分間隔で測定する。

#### 【0263】

(実施例36)

#### 小分子ライブラリースクリーニングのデータ解析

[000251] 競合ELISAアッセイを使用して、活性化ロドプシンに結合し、そしてMBP-8高親和性ペプチド融合タンパク質の結合を増加させる/減少させる化合物に関して、小分子ライブラリー(ChemDivの薬剤様分子の多様なコレクションを代表する10,000化合物ライブラリー)をスクリーニングした。中程度の親和性に基づいて、MBP8を選択した。より高い親和性およびMIIを安定化する能力を示すMBP(すなわちMBP18;表XIX)を用いて、スクリーニングを反復することも可能である。いかなる大きさのライブラリーで、これらの種類のスクリーニングを用いることも可能であり、したがって、化合物ライブラリーのサイズを10倍以上増加させ、そして類似の方式で、小分子ヒットに関するスクリーニングを続けることも可能である。

#### 【0264】

[000252] 結合した光活性化型ロドプシン結合ペプチド融合タンパク質の阻害または刺激の量に相当するユニークな色コードを持つ比色読取値として、スクリーニング結果を示す、ソフトウェアプログラムが好適であり、そして好ましい。光活性化型ロドプシン結合MBP-8高親和性ペプチド融合タンパク質を、80の異なる化合物による競合結合に関してアッセイする、2つの代表的な96ウェルプレートを用いた。実験を二つ組で行い、そして2つの別個のプレートの結果を平均した。

#### 【0265】

[000253] MIIの用量反応曲線(図24)は、PL\_0302 R3.C4( )およびヘテロ三量体Gt( )両方が、ロドプシンの活性化型を安定化することを示す。EDTAで洗浄したロドプシン(5 $\mu$ M)を、100mM NaCl、1mM  $MgCl_2$ 、および1mM DTTを含む50mM HEPES緩衝液、pH8.2中、5.3でインキュベーションし、そして「エキストラ」MIIを測定した。色コード読取を用いて、MBP-8結合を25%より増進させた化合物に関して、用量研究を行って、 $EC_{50}$ 曲線を生成した。以下の表XXIIは、各化合物のメタロドプシンII安定化に関する計算 $EC_{50}$ 値を提供する。

#### 【0266】

表XXII. MIIへのMBP-8結合に対する、選択した小分子の $EC_{50}$ 値

#### 【0267】

10

20

30

40

【表 2 2】

小分子名	MW (ダルトン)	MBP-8の結合 EC <sub>50</sub> (μM)
PL_0568 R1.C5	291.2	0.96
PL_0551 R8.C1	328.5	0.95
PL_0894 R3.C7	424.9	10.1
PL_0302 R3.C4	290.27	11.9
PL_1012 R2.C1	433.5	5.12

10

## 【0268】

(実施例37)

ロドプシンに非常に高親和性であるアゴニストは、PAR-1刺激されたCa<sup>++</sup>過渡応答に対してまったく影響を持たない

[000254]非関連受容体(PAR1)がCa<sup>++</sup>シグナル伝達を活性化する能力に対する影響に関して、小分子PL\_0568 R1.C5、PL\_0551 R8.C1、PL\_0894 R3.C7、PL\_0302 R3.C4、およびPL\_1012 R2.C1を試験した。96ウェル形式で、ヒト胚性腎細胞を培養し、そして2時間接着させた。培地を吸引し、そして0.1%(v/v)プルロニックF127および10μMオレゴングリーンBapta-1アセトキシメチルエステルを含有する、0.5mlの装填緩衝液(20mM HEPES(pH7.4)、130mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgSO<sub>4</sub>、0.83mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.17mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mg/ml BSA、25mM マンノース)中で、プレートを37で30分間インキュベーションした。30分後に小分子を適切なウェルに添加し、そして37でさらに30分間、細胞をインキュベーションした。Flexstat<sup>TM</sup>系を用いて、カルシウム濃度に関して、96ウェルプレートを試験した。トロピン添加(±70nM)前に、基底状態を確立した。5秒ごとに記録を行い、そしてトロピンでの刺激後、>100秒続けた。図25を参照されたい。

20

## 【0269】

(実施例38)

小分子による、ロドプシンへのMBP-8結合の調節

[000255]細胞における小分子の影響を試験するため、サンショウオ(salamander)の暗順応網膜から単離した桿体に対して、光反応実験を行った。網膜の小片を細かく刻むことによって、単一の桿体を単離した。光受容体を暗順応網膜から機械的に単離し、そして倒立顕微鏡のステージ上の重力送り灌流チャンパーに入れた。RiekeおよびBaylor, Biophys. J. 71:2553-2572, 1996に記載されるように、120mM NaCl、2.0mM KCl、2mM NaHCO<sub>3</sub>、1.6mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mM CaCl<sub>2</sub>、10mMグルコースおよび3mM HEPES、pH7.6を含有するリングル溶液中で、Baylorら(Baylorら, J. Physiol. (Lond.) 288:589-611, 1979; Baylorら J. Physiol. (Lond.) 288:589-611, 1979)に記載される吸引電極を用いて、膜電流を記録した。吸引電極によって収集された膜電流を増幅し、20Hzでローパス・フィルター処理し(3dBポイント; 8極ベッセル・ローパス)、100Hzでデジタル化し、そして続く解析のため、コンピュータに保存した。50~500nm光の10m秒閃光によって、光反応を誘発した。校正した減光フィルターを用いて、閃光強度を調節した。できるだけ多くの暗電流を収集するように、細胞を吸引電極中に配置した。一連の電氣的に調節されたピンチバルブ(Biochem Valves、ニュージャージー州ブントン)であって、その出口が、直径約100μmの共通の灌流パイプに連結された、前記ピンチバルブを用いて、溶液変化(これによって小分子の添加を達成した)を達成した。この系を用いると、溶

30

40

50

液変化は、200～300msで完了した。直径約50 $\mu$ mの開口部のガラスパイプ対を通じて、陽圧によって溶液を駆動した。パイプを圧電トランスレーション・ステージ(Burleigh Instruments、ニューヨーク州フィッシャー)に載せた。この系を用いると、外節の切断端での溶液変化は、10ms未満で完了した。

#### 【0270】

[000256]デュアルビーム・オプティカルベンチから、光刺激を搬送した。タングステン-ハロゲン電球からの光を10nmの公称帯域幅の干渉フィルターに通過させることによって、単色光を得た。刺激光の波長(桿体には520nm、そして錐体には440nmまたは620nm)および強度をそれぞれ、較正した狭帯域干渉フィルターおよび減光フィルターを用いて設定した。サンショウウオL感受性、S感受性、および紫外線感受性錐体は、600nm、430nm、および360nmのピーク感受性を有し(MakinoおよびDodd, J. Gen. Physiol. 108:27-34, 1996)、そして620nm、440nm、および380nmの光に対する反応の相対的振幅によって、容易に同定される。同定後、S錐体を440nm光で刺激し、そしてL錐体を620nmで刺激した。紫外光感受性錐体は研究しなかった。較正した一組の減光フィルターを用いて、光強度を調節し、そして光通路中の電氣的に調節されるシャッターによって、閃光を生じた。

10

#### 【0271】

[000257]それぞれ5 $\mu$ M化合物PL\_\_0302R3C4の存在下または非存在下の、サンショウウオの暗順応網膜から単離した桿体の光反応を示す結果を図26および図27に示す。各図のパネルAは、閃光が増加した結果の光反応の時間に対してプロットした膜電流(反応)を示す。パネルBでは、最高閃光の電流が1.0であるように、ピーク反応を規準化した。円は、各閃光のピーク反応に対応する。図27のパネルBでは、二分する(bisecting)線によって、PL\_\_0302R3C4の存在下では、電流の同じ変化を得るのに、より低い強度しか必要でないことが示される。結果によって、化合物PL\_\_0302R3C4が、閃光の強度に応じて、ピーク反応(電流変化によって測定されるようなもの)を20%～50%増加させ、そしてしたがって、活性化されるロドプシン受容体の量を増加させることが示される。この結果は、これらの別個の実験の代表である。結果によって、化合物PL\_\_302R3C4が、アロステリック・アゴニストとして作用可能であり、そして細胞において、受容体のシグナル伝達活性を増加させることが示唆される。

20

30

#### 【0272】

[000258]MPB-8の結合を増進する能力に関してもまた、小分子を試験した。EDTAで洗浄したロドプシンを含有する96ウェルプレートに、PELM6(MBP対照)およびMBP-8をプレATINGした。小分子化合物ライブラリーを添加し、そして結合したままのPELM6またはMBP-8の量を測定した。標準法を用いた。

#### 【0273】

[000259]図28～32は、高親和性ペプチド融合タンパク質、MBP-8が、EDTA洗浄したロドプシンに結合するのを増進する小分子の能力を示す、MBP-8結合曲線を示す。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0274】

【図1】[00056]図1は、基本的な2工程基本骨格を示す模式図である。

【図2】[00057]図2は、GPCR結合ペプチドを分離し、そして同定するのに用いる親和性スクリーニング法の基礎を示す模式図である。

【図3】[00058]図3は、ベクターpJS142の模式図である。

【図4】[00059]図4は、ELISA法を示す模式図である。

【図5】[00060]図5は、濃度依存方式で、LacI-Gq融合タンパク質がロドプシン受容体に結合することを示す結果を提供する。

【図6】[00061]図6は、スクリーニングプロセスにおいて、ペプチド8を用いて

50

同定された、いくつかのクローンに対して行った、結合アッセイのデータを示す。

【図7】[00062] 図7は、PAR1受容体へのLacIペプチド融合タンパク質の結合データを提示する。pELM6は、MBPベクターのみであり；pELM17は、MBP-天然Gt340-350ペプチド融合タンパク質である。

【図8】[00063] 図8は、高親和性ペプチド8融合タンパク質(MBP8)に対して、高親和性融合タンパク質の結合を比較する棒グラフである。

【図9】[00064] 図9は、精製MBP-C末端融合タンパク質を用いた、ヒト・トロニン受容体(PAR1)を過剰発現するCHO細胞のパニングのELISA結果を示す。MBP-G11 = xxxxx (配列番号1) LQLNLKEYNLV (配列番号2)；PAR-13 = VRPS (配列番号3) LQLNRNEYLYLV (配列番号4)；PAR-23 = LSRSL (配列番号5) LQQKLKEYSLV (配列番号6)；PAR-33 = LSTNL (配列番号7) LHLNLKEYNLV (配列番号8)；PAR-34 = LPQM (配列番号9) QRLNVGEYNLV (配列番号10)；PAR-45 = SRHT (配列番号11) LRLNGKELNLV (配列番号12)。

【図10】[00065] 図10は、LacI-Gq溶解物でアッセイした、SF9膜(PAR1受容体)の用量-反応曲線を示す。

【図11】[00066] 図11は、脂質小胞中で再構成したPAR1への天然Gqペプチド-マルトース結合タンパク質の結合を示す濃度反応曲線である。

【図12】[00067] 図12は、典型的なcDNAミニ遺伝子構築物を示す模式図である。配列番号270および271を示す。

【図13】[00068] 図13は、ミニ遺伝子ベクターのNcoI消化物のアガロースゲルである。レーン1は1kb DNAラダーであり；レーン2はpcDNA3.1であり；レーン3はpcDNA-Giであり；レーン4はpcDNA-GiRであり；そしてレーン5はpcDNA-Gqである。

【図14】[00069] 図14は、トランスフェクション細胞におけるペプチド・ミニ遺伝子RNAの転写を示す、PCR産物のアガロースゲルである。レーン1はサイズマーカーを含有し、レーン2は、pcDNA-GiRでトランスフェクションした細胞からのPCR産物を含有し、レーン3は、pcDNA-Giでトランスフェクションした細胞からのPCR産物を含有し、そしてレーン4は、空ベクターであるpcDNA3.1でトランスフェクションした細胞からのPCR産物を含有する。

【図15】[00070] 図15は、基底値に対して規準化した、トロニン刺激後の相対的[<sup>3</sup>H]イノシトールリン酸産生を示す棒グラフである。

【図16】[00071] 図16は、同定された高親和性ペプチドをコードするミニ遺伝子ベクターの存在下または非存在下での、GPCRが仲介する細胞内カルシウム濃度増加の阻害を示すデータを提示する。図16Aは、トロニン添加の30秒後の蛍光([Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>レベル)増加を示す。図16Bは、トロニンでの細胞刺激後の[Ca<sup>++</sup>]蛍光変化の動力学を示す。

【図17】[00072] 図17は、同定された高親和性ペプチドをコードするミニ遺伝子ベクターの存在下または非存在下での、GPCRが仲介するホスホイノシトール(PI)加水分解の阻害を示すデータを提示する。

【図18】[00073] 図18は、GPCR結合ペプチドを発現する細胞における、同定された高親和性ペプチドをコードするミニ遺伝子ベクターの存在下または非存在下での、GPCRが仲介するMAPK活性の相対的増加を示す棒グラフである。

【図19】[00074] 図19は、Gq、Gi、GiRまたは空ベクターを発現する細胞における、トロニンが誘導する経内皮電気抵抗の減少を示す。

【図20】[00075] 図20は、F-アクチンに関して染色した細胞の一連の写真であり、pcDNA-G12またはpcDNA-G13ミニ遺伝子構築物を発現する細胞における、トロニン曝露後のストレスファイバー形成の阻害を示す。

【図21】[00076] 図21は、GIRK1/GIRK4および示すミニ遺伝子構築物で一過性にトランスフェクションしたHEK293細胞に関するアセチルコリン(Ac

10

20

30

40

50

h) 反応 ( p A / p F ) を示す棒グラフである。

【図 2 2】 [ 0 0 0 7 7 ] 図 2 2 は、G カルボキシル末端ペプチド挿入物を含有するミニ遺伝子構築物を発現する細胞における、選択的 G タンパク質仲介アデニリルシクラーゼの阻害を示す。

【図 2 3】 [ 0 0 0 7 8 ] 図 2 3 は、 t 3 4 0 3 5 0、突然変異体 t 3 4 0 - 3 5 0 K 3 4 1 L およびヘテロ三量体 G t による M I I 安定化の用量 - 反応曲線を示す。

【図 2 4】 [ 0 0 0 7 9 ] 図 2 4 は、小分子 P L \_ 0 3 0 2 R 3 C 4 による M I I 安定化を示す。

【図 2 5】 [ 0 0 0 8 0 ] 図 2 5 は、ロドプシンのスーパー・アゴニストが、P A R 1 が刺激する C a <sup>2+</sup> 過渡応答に影響を及ぼさないことを示す蛍光データを提示する。

10

【図 2 6】 [ 0 0 0 8 1 ] 図 2 6 は、小分子 P L \_ 0 3 0 2 R 3 C 4 の存在下で、暗順応したサンショウウオ網膜の単離桿体の光反応 ( 電流変化によって測定されるもの ) を示すグラフである。

【図 2 7】 [ 0 0 0 8 2 ] 図 2 7 は、小分子の非存在下で、暗順応したサンショウウオ網膜の単離桿体の光反応 ( 電流変化によって測定されるもの ) を示すグラフである。

【図 2 8】 [ 0 0 0 8 3 ] 図 2 8 は、化合物 P L \_ 1 0 1 2 R 2 C 1 を添加した M B P - 8 結合曲線であり、該化合物の構造を示し、該化合物が、E D T A で洗浄したロドプシンへの M B P - 8 結合を増進させる能力を示す。

【図 2 9】 [ 0 0 0 8 4 ] 図 2 9 は、化合物 P L \_ 0 8 9 4 R 3 C 7 を添加した M B P - 8 結合曲線であり、該化合物の構造を示し、該化合物が、E D T A で洗浄したロドプシンへの M B P - 8 結合を増進させる能力を示す。

20

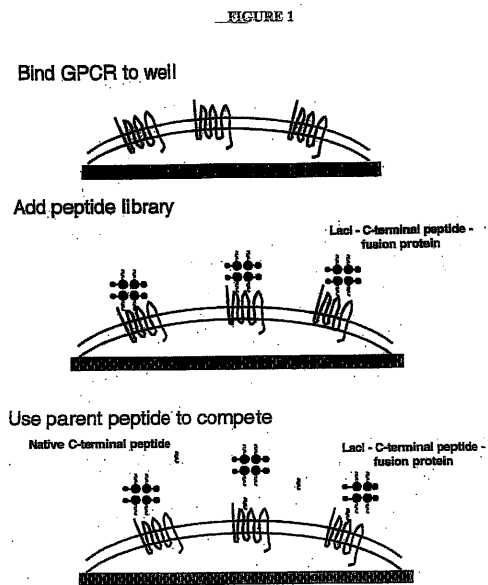
【図 3 0】 [ 0 0 0 8 5 ] 図 3 0 は、化合物 P L \_ 0 5 6 8 R 1 C 5 を添加した M B P - 8 結合曲線であり、該化合物の構造を示し、該化合物が、E D T A で洗浄したロドプシンへの M B P - 8 結合を増進させる能力を示す。

【図 3 1】 [ 0 0 0 8 6 ] 図 3 1 は、化合物 P L \_ 0 5 5 1 R 8 C 1 を添加した M B P - 8 結合曲線であり、該化合物の構造を示し、該化合物が、E D T A で洗浄したロドプシンへの M B P - 8 結合を増進させる能力を示す。

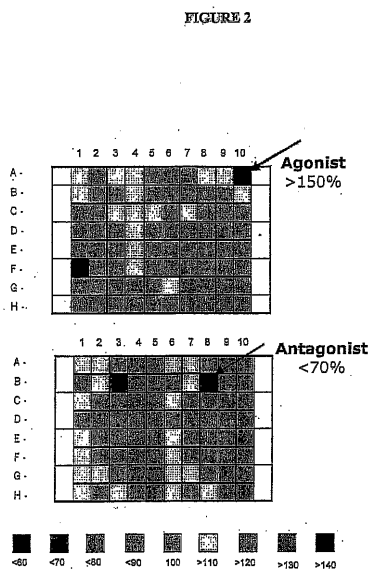
【図 3 2】 [ 0 0 0 8 7 ] 図 3 2 は、化合物 P L \_ 0 3 0 2 R 3 C 4 を添加した M B P - 8 結合曲線であり、該化合物の構造を示し、該化合物が、E D T A で洗浄したロドプシンへの M B P - 8 結合を増進させる能力を示す。

30

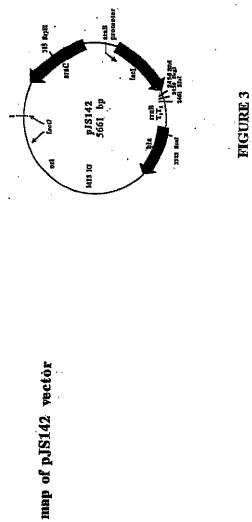
【 図 1 】



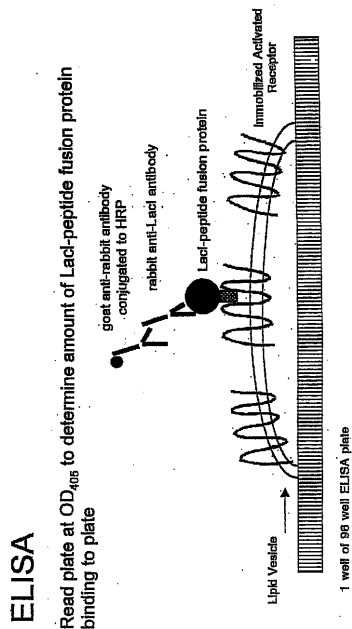
【 図 2 】



【 図 3 】

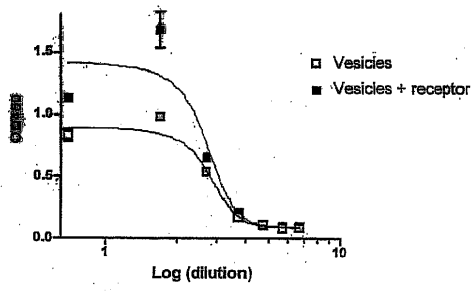


【 図 4 】



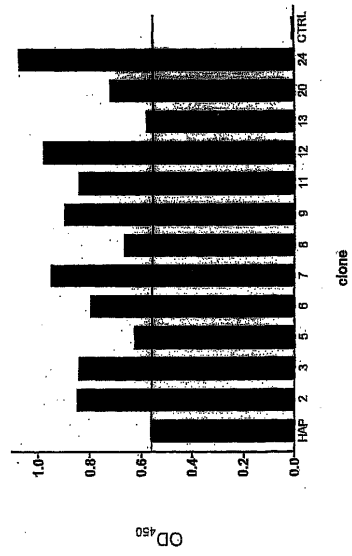
【 5 】

FIGURE 5



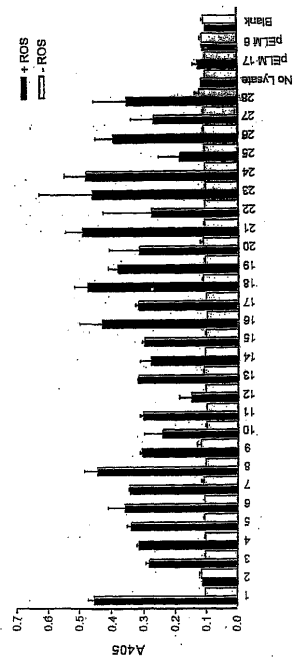
【 6 】

FIGURE 6



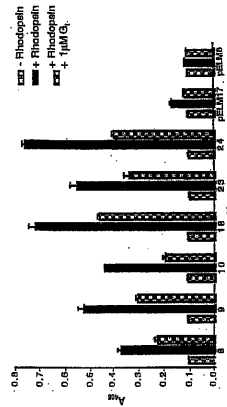
【 7 】

FIGURE 7



【 8 】

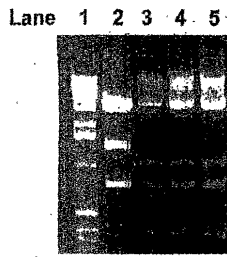
FIGURE 8





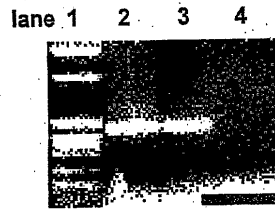
【 13 】

FIGURE 13



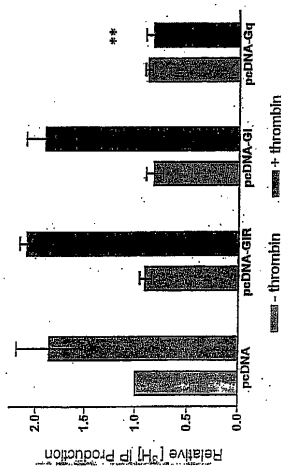
【 14 】

FIGURE 14



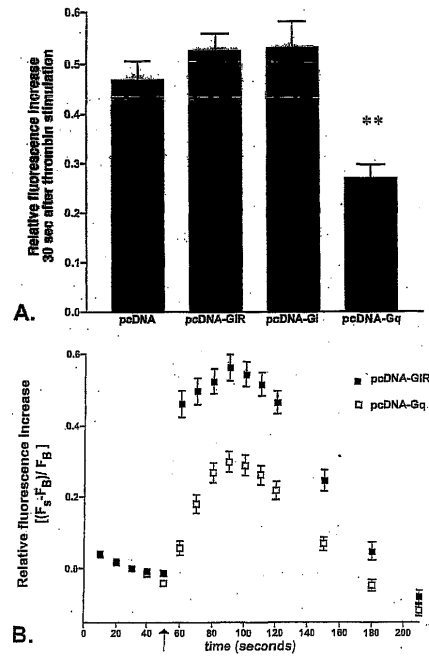
【 15 】

FIGURE 15



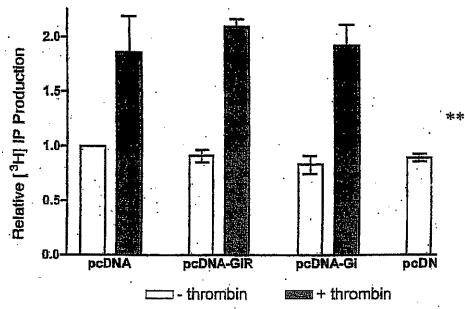
【 16 】

FIGURE 16



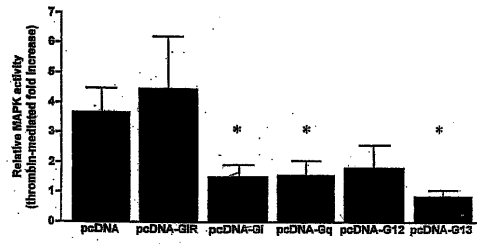
【 17 】

FIGURE 17



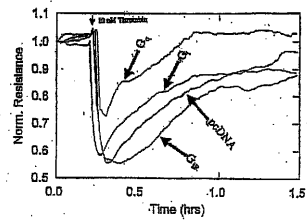
【 18 】

FIGURE 18



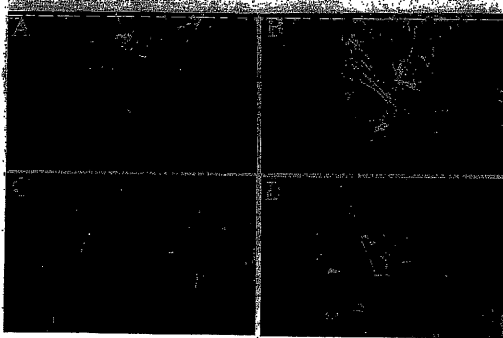
【 19 】

FIGURE 19



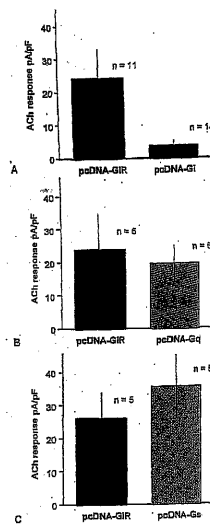
【 20 】

FIGURE 20



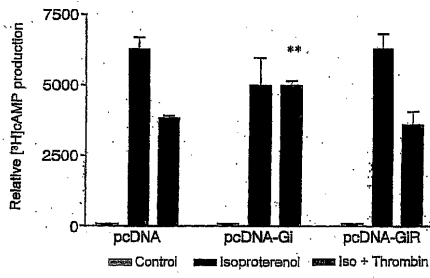
【 21 】

FIGURE 21



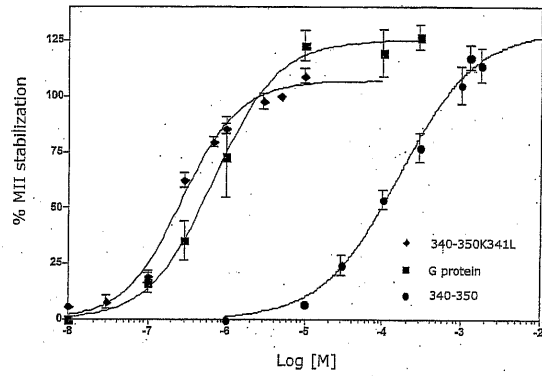
【 2 2 】

FIGURE 22



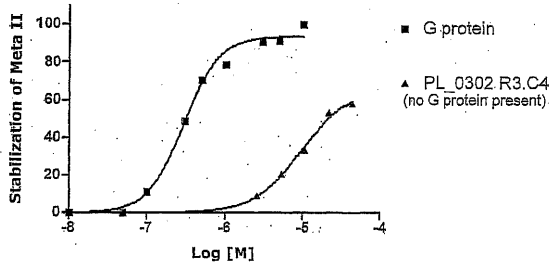
【 2 3 】

FIGURE 23



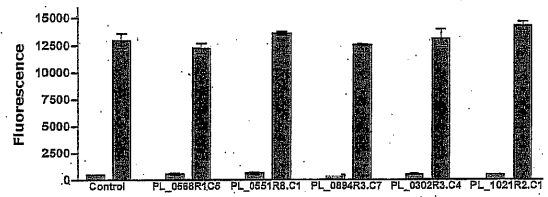
【 2 4 】

FIGURE 24



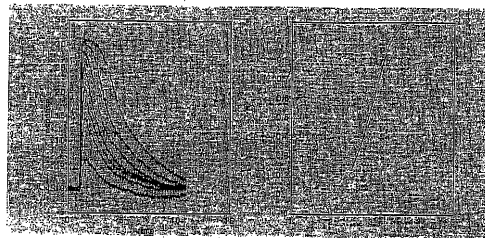
【 2 5 】

FIGURE 25



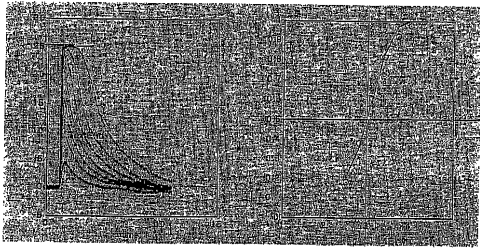
【 2 6 】

FIGURE 26



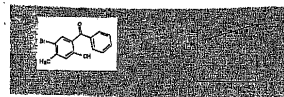
【図 27】

FIGURE 27



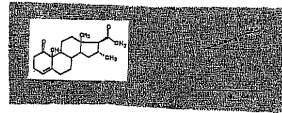
【図 30】

FIGURE 30



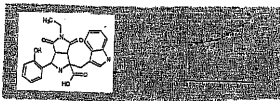
【図 31】

FIGURE 31



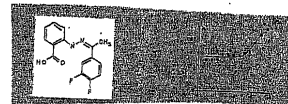
【図 28】

FIGURE 28



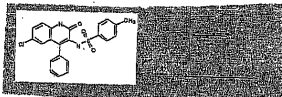
【図 32】

FIGURE 32



【図 29】

FIGURE 29



## 【配列表】

[2007525170000001.xml](#)

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年4月11日(2007.4.11)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチドを同定する方法であって：

(a) 天然Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し；

(b) 前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、前記ペプチドライブラリーをスクリーニングし；そして

(c) 天然ペプチドより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する、前記ペプチドライブラリーのメンバーを選択する

ことを含む、前記方法。

【請求項2】

工程(b)の前記スクリーニングが、損なわれていない(intact)Gタンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項1の方法。

【請求項3】

工程(b)の前記スクリーニングが、Gタンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項1の方法。

## 【請求項 4】

工程 ( a ) の前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが、G タンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 5】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 70 アミノ酸である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 6】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 55 アミノ酸である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 7】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 8 ~ 約 50 アミノ酸である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 8】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 9 ~ 約 23 アミノ酸である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 9】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 11 アミノ酸である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 10】

前記 G タンパク質サブユニット断片が G サブユニットである、請求項 4 の方法。

## 【請求項 11】

前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが G サブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項 4 の方法。

## 【請求項 12】

前記 G タンパク質サブユニットが G 二量体である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 13】

工程 ( b ) の前記スクリーニングが競合結合アッセイを含む、請求項 1 の方法。

## 【請求項 14】

前記競合結合アッセイが、前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと、前記ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられる、請求項 13 の方法。

## 【請求項 15】

前記ペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 16】

前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 17】

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 1 の方法。

## 【請求項 18】

前記ペプチドライブラリーがコンビナトリアル・ペプチドライブラリーである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 19】

前記コンビナトリアル・ペプチドライブラリーがタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 18 の方法。

## 【請求項 20】

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 19 の方法。

## 【請求項 21】

前記ペプチドライブラリーがペプチドディスプレイライブラリーである、請求項 1 の方

法。

【請求項 2 2】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって：

( a ) 前記 G タンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し；

( b ) 高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドを提供し；

( c ) 前記高親和性 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと競合する、前記 G タンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の前記ライブラリーをスクリーニングし；そして

( d ) 工程 ( b ) のペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で前記 G タンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が工程 ( b ) のペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定する

ことを含む、前記方法。

【請求項 2 3】

工程 ( c ) の前記スクリーニングが、損なわれていない G タンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項 2 2 の方法。

【請求項 2 4】

工程 ( c ) の前記スクリーニングが、G タンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項 2 2 の方法。

【請求項 2 5】

工程 ( b ) の前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが、G タンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項 2 2 の方法。

【請求項 2 6】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 7 0 アミノ酸である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 7】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 7 ~ 約 5 5 アミノ酸である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 8】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 8 ~ 約 5 0 アミノ酸である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 9】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 9 ~ 約 2 3 アミノ酸である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 3 0】

前記 G タンパク質サブユニット断片が長さ約 1 1 アミノ酸である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 3 1】

前記 G タンパク質サブユニットが G サブユニットである、請求項 2 5 の方法。

【請求項 3 2】

前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドが G サブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項 2 5 の方法。

【請求項 3 3】

前記 G タンパク質サブユニットが G 二量体である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 3 4】

工程 ( c ) の前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求 2 2 の方法

。

【請求項 3 5】

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と活性化リガンドの相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 2 2 の

方法。

【請求項 36】

工程 (a) の候補化合物の前記ライブラリーが、工程 (b) のペプチドの構造に基づく、候補化合物の集中的 (f o c u s e d) ライブラリーである、請求項 22 の方法。

【請求項 37】

工程 (a) の候補化合物の前記ライブラリーがコンビナトリアル・ライブラリーである、請求項 22 の方法。

【請求項 38】

前記コンビナトリアル・ライブラリーが薬剤様分子を含む、請求項 37 の方法。

【請求項 39】

前記コンビナトリアル・ライブラリーが集中的小分子ライブラリーである、請求項 37 の方法。

【請求項 40】

前記集中的小分子ライブラリーのメンバーが、工程 (b) のペプチドの化学的構造に基づく、請求項 39 の方法。

【請求項 41】

請求項 1 の方法にしたがって同定される、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾ペプチド。

【請求項 42】

請求項 22 の方法にしたがって同定される、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物。

【請求項 43】

Gタンパク質共役型受容体を有する細胞において、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達を修飾する方法であって、請求項 1 の方法にしたがって同定された化合物を前記細胞に投与することを含む、前記方法。

【請求項 44】

Gタンパク質共役型受容体を有する細胞において、Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達を修飾する方法であって、請求項 22 の方法にしたがって同定された化合物を前記細胞に投与することを含む、前記方法。

【請求項 45】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達を阻害する方法であって、前記Gタンパク質共役型受容体と同族 (c o g n a t e) Gタンパク質に結合するのに干渉する化合物と、前記Gタンパク質共役型受容体を接触させることを含む、前記方法。

【請求項 46】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物を同定する方法であって：

(a) 請求項 1 の方法にしたがって同定されたペプチドを提供し、ここで前記ペプチドは検出可能なペプチドシグナルを提供するように標識されている；

(b) 候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物のライブラリーを提供し；

(c) 前記ペプチドと前記Gタンパク質共役型受容体を、前記ペプチドが前記Gタンパク質共役型受容体に結合する条件下で接触させ；

(d) 未結合ペプチドを前記Gタンパク質共役型受容体から取り除き；

(e) ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性を測定し、そして前記検出可能ペプチドシグナルを測定し；

(f) 候補Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達修飾化合物の前記ライブラリーのメンバーと、ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体を接触させ；

(g) ペプチドが結合した前記Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達活性を測定し、そして前記検出可能ペプチドシグナルを測定し；

(h) 前記Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達活性が、前記候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているか、そしてGタンパク質共役型受容体ペプチド結合

が、前記候補化合物との接触後に増加しているかまたは減少しているかを決定し；そして  
 ( i ) ペプチドが結合した前記 G タンパク質共役型受容体との接触が、前記 G タンパク質共役型受容体へのペプチド結合増加、および G タンパク質共役型受容体シグナル伝達増加の両方を生じる化合物を同定し、ペプチドが結合した前記 G タンパク質共役型受容体との接触が、前記 G タンパク質共役型受容体へのペプチド結合減少、および G タンパク質共役型受容体シグナル伝達減少の両方を生じる化合物を同定し、そしてペプチドが結合した前記 G タンパク質共役型受容体との接触が、工程 ( a ) のペプチドの結合親和性増加を生じる化合物を同定することを含む、前記方法。

【請求項 47】

ペプチドが結合した前記 G タンパク質共役型受容体の前記シグナル伝達活性を測定する方法が：

- ( a ) イノシトールリン酸集積測定；
- ( b ) 細胞内  $Ca^{2+}$  レベル測定；
- ( c ) アデニルシクラーゼ活性測定；
- ( d ) 経内皮電気抵抗測定；
- ( e ) ストレスファイバー形成測定；
- ( f ) リガンド結合測定；
- ( g ) 受容体発現測定；
- ( h ) 受容体脱感作測定；
- ( i ) キナーゼ活性測定；
- ( j ) ホスファターゼ活性測定；
- ( k ) 核転写因子測定；
- ( l ) 遊走 ( 走化性 ) すべての測定；
- ( m ) スーパーオキシド形成測定；
- ( n ) 一酸化窒素形成測定；
- ( o ) 細胞脱顆粒測定；
- ( p ) G I R K 活性測定；
- ( q ) アクチン重合測定；
- ( r ) 血管狭窄測定；
- ( s ) 細胞浸透性測定；
- ( t ) アポトーシス測定；
- ( u ) 細胞分化測定；
- ( v ) プロテインキナーゼ C などの、G P C R 活性化に際して転位置するタンパク質の膜会合の測定；
- ( w ) プロテインキナーゼ C などの、G P C R 活性化に際して転位置するタンパク質の細胞質ゾル集積の測定；および
- ( x ) R a n などの、G P C R 活性化に際して転位置するタンパク質の核会合の測定からなる群より選択される、請求項 46 の方法。

【請求項 48】

配列番号 2、4、6、8、10、12、13、15、17、21、23、25～27、30、32、34、36、38、40、45～85、94～111、125～150、160～164、175～178 および 183～264 からなる群より選択される化合物。

【請求項 49】

療法 G タンパク質共役型シグナル伝達修飾ペプチドを哺乳動物に提供するための 医薬組成物 であって、請求項 48 の化合物を発現する発現構築物を含む、前記 医薬組成物。

【請求項 50】

過剰な G タンパク質共役型受容体シグナル伝達が原因因子である疾患状態を治療するための 医薬組成物 であって、請求項 48 記載の化合物を含む、前記 医薬組成物。

【請求項 51】

Gタンパク質共役型受容体シグナル伝達増進剤を同定する方法であって：

(a) 天然Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドに基づくペプチドライブラリーを提供し；

(b) 前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、前記ペプチドライブラリーをスクリーニングし；

(c) 天然ペプチドより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する前記ペプチドライブラリーメンバーを選択し；

(d) 前記Gタンパク質共役型受容体への結合に関してスクリーニングする候補化合物のライブラリーを提供し；

(e) 工程(c)で選択した前記ペプチドライブラリーのメンバーと競合する、前記Gタンパク質共役型受容体への高親和性結合に関して、候補化合物の前記ライブラリーをスクリーニングし；そして

(f) 工程(c)で選択したペプチドと等しいかまたはそれより高い親和性で前記Gタンパク質共役型受容体に結合する候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定するか、あるいはその結合が工程(c)のペプチドの結合親和性増加を生じる、候補化合物の前記ライブラリーのメンバーを同定することを含み、前記方法。

【請求項52】

工程(b)または工程(e)の前記スクリーニングが、損なわれていないGタンパク質共役型受容体への結合に関して試験することによって行われる、請求項51の方法。

【請求項53】

工程(b)または工程(e)の前記スクリーニングが、Gタンパク質共役型受容体の少なくとも細胞内断片への結合に関して試験することによって行われる、請求項51の方法。

【請求項54】

工程(a)の前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドが、Gタンパク質サブユニットまたはその断片である、請求項51の方法。

【請求項55】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約70アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項56】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約7～約55アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項57】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約8～約50アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項58】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約9～約23アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項59】

前記Gタンパク質サブユニット断片が長さ約11アミノ酸である、請求項54の方法。

【請求項60】

前記Gタンパク質サブユニットがGサブユニットである、請求項54の方法。

【請求項61】

前記Gタンパク質共役型受容体結合ペプチドがGサブユニット・カルボキシル末端ペプチドである、請求項54の方法。

【請求項62】

前記Gタンパク質サブユニットがG二量体である、請求項54の方法。

【請求項63】

工程(b)の前記スクリーニングが競合結合アッセイを含む、請求項51の方法。

**【請求項 6 4】**

前記競合結合アッセイが、前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと、前記ペプチドライブラリーのメンバーの同時インキュベーションに特徴付けられる、請求項 6 3 の方法。

**【請求項 6 5】**

前記ペプチドライブラリーメンバーが、検出可能シグナルを提供可能である、請求項 5 1 の方法。

**【請求項 6 6】**

前記スクリーニングが酵素連結免疫吸着アッセイである、請求項 5 1 の方法。

**【請求項 6 7】**

請求項 6 6 の方法であって、前記酵素連結免疫吸着アッセイが：

( a ) 前記 G タンパク質共役型受容体を固体支持体上に固定し；

( b ) タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーを提供し；

( c ) 前記 G タンパク質共役型受容体に対して、少なくとも前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドと同程度に高い結合親和性を有するタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーが、前記の固定された G タンパク質共役型受容体に結合する条件下で、前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーのメンバーと、前記の固定された G タンパク質共役型受容体を、前記 G タンパク質共役型受容体結合ペプチドの存在下でインキュベーションし；

( d ) 前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーの未結合メンバーを取り除き；

( e ) 前記の結合したタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーと、前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーのタンパク質部分を特異的に認識する抗体を、前記抗体が前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーメンバーに特異的に結合する条件下で、インキュベーションし；

( f ) 未結合抗体を取り除き；そして

( g ) 前記の結合した抗体を検出する

工程を含む、前記方法。

**【請求項 6 8】**

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ディスプレイライブラリーであり、そして前記抗体が抗マルトース結合タンパク質抗体である、請求項 6 7 の方法。

**【請求項 6 9】**

前記 G タンパク質共役型受容体への結合が、前記 G タンパク質共役型受容体と前記シグナル伝達増進剤の相互作用から生じるシグナルを測定することによって決定される、請求項 5 1 の方法。

**【請求項 7 0】**

前記ペプチドライブラリーがコンビナトリアル・ペプチドライブラリーである、請求項 5 1 の方法。

**【請求項 7 1】**

前記コンビナトリアル・ペプチドライブラリーがタンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 7 0 の方法。

**【請求項 7 2】**

前記タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーがマルトース結合タンパク質 - ペプチド融合タンパク質ライブラリーである、請求項 7 1 の方法。

**【請求項 7 3】**

前記ペプチドライブラリーがペプチドディスプレイライブラリーである、請求項 5 1 の方法。

**【請求項 7 4】**

工程 ( d ) の候補化合物の前記ライブラリーが、工程 ( c ) で選択された化合物の構造に基づく、候補化合物の集中的ライブラリーである、請求項 5 1 の方法。

【請求項 7 5】

候補化合物の前記ライブラリーがペプチドライブラリーである、請求項 5 1 の方法。

【請求項 7 6】

候補化合物の前記ライブラリーが小分子ライブラリーである、請求項 5 1 の方法。

【請求項 7 7】

請求項 5 1 記載の方法によって同定される化合物。

【請求項 7 8】

請求項 6 7 記載の方法によって同定される化合物。

【請求項 7 9】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療するためのものである医薬組成物であって、請求項 4 8 記載の化合物を含む、前記医薬組成物。

【請求項 8 0】

G タンパク質共役型受容体シグナル伝達の改変が原因因子である疾患状態を治療するための医薬組成物であって、請求項 7 8 記載の化合物を含む、前記医薬組成物。

【請求項 8 1】

G タンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって：

( a ) 前記 G タンパク質共役型受容体と、請求項 7 8 の化合物を、結合が生じ、そして前記 G タンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；

( b ) G タンパク質共役型受容体 - 化合物結合対を共結晶させ；

( c ) 前記共結晶結合対を X 線結晶学に供し；そして

( d ) 前記共結晶結合対の三次元構造を決定する、ここで前記 G タンパク質共役型受容体の原子座標が得られる

ことを含む、前記方法。

【請求項 8 2】

G タンパク質共役型受容体の三次元構造を決定する方法であって：

( a ) 前記 G タンパク質共役型受容体と、請求項 7 8 の化合物を、結合が生じ、そして前記 G タンパク質共役型受容体のコンホメーションが安定化される条件下で接触させ；

( b ) 前記結合対を核磁気共鳴研究に供し；そして

( c ) 前記結合対の三次元構造を決定する、ここで前記 G タンパク質共役型受容体の原子座標が得られる

ことを含む、前記方法。

【請求項 8 3】

G タンパク質共役型受容体結合パートナーを単離する方法であって：

( a ) 請求項 7 8 の結合化合物を含む固体支持体を提供し；

( b ) 候補 G タンパク質共役型受容体結合パートナー化合物のライブラリーを提供し；

( c ) 候補化合物の前記ライブラリーと、前記固体支持体を、前記化合物への前記候補化合物の結合が生じる条件下で接触させ；

( d ) 未結合候補化合物および非特異的に結合した候補化合物を前記固体支持体から溶出し；そして

( e ) 前記固体支持体から、結合した候補化合物を回収する

ことを含む、前記方法。

【請求項 8 4】

G タンパク質共役型受容体の活性化を修飾する小分子を設計する方法であって：

( a ) 請求項 8 1 の方法にしたがって、G タンパク質共役型受容体の三次元構造を決定し；そして

( b ) 前記原子座標に基づくコンピュータモデリングによって候補構造を設計する、ここで前記候補構造は、前記 G タンパク質共役型受容体に結合すると予測される

ことを含む、前記方法。

**【請求項 85】**

Gタンパク質共役型受容体の活性化を修飾する小分子を設計する方法であって：

(a) 請求項 82 の方法にしたがって、Gタンパク質共役型受容体の三次元構造を決定し；そして

(b) 前記原子座標に基づくコンピュータモデリングによって候補構造を設計する、ここで前記候補構造は、前記 Gタンパク質共役型受容体に結合すると予測されることを含む、前記方法。

**【請求項 86】**

請求項 77 のペプチドをコードする DNA を含む核酸であって、前記 DNA が異種転写制御配列に機能可能であるように連結されている、前記核酸。

**【請求項 87】**

請求項 86 の核酸を含む発現ベクター。

**【請求項 88】**

請求項 87 の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

**【請求項 89】**

請求項 48 のペプチドを特異的に認識する抗体。

**【請求項 90】**

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される、請求項 89 の抗体。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>		<i>E</i>	<i>4 C 0 8 4</i>	
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>			<i>4 C 0 8 5</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>5/10</i>			<i>4 H 0 4 5</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>7/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>7/06</i>			<i>5 B 0 7 5</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/44</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>16/44</i>				
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>				
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/02</i>				
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>		<i>D</i>		
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 1 1</i>			
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10</i>	<i>1 0 1</i>			
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/12</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/04</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/04</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/10</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/12</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/18</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>11/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>1/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>11/06</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>1/04</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/10</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/04</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>13/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>1 0 1</i>			
<i>A 6 1 P</i>	<i>15/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>13/02</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>3/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>15/08</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>13/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>3/04</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/22</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>13/08</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/22</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>3/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/08</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/24</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>3/00</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/16</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/24</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/28</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/16</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/14</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/28</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/30</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/14</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>1/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/30</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/20</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>1/00</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/20</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/18</i>				
<i>G 0 6 F</i>	<i>17/30</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/00</i>				
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 0 5</i>			
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>				
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>		<i>N</i>		
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 6 F</i>	<i>17/30</i>	<i>1 7 0 F</i>			
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>		<i>D</i>		
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>		<i>Z</i>		
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>		<i>Z</i>		

C 1 2 P 21/08

(81)指定国 AP(BW, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 ギルクリスト, アネット

アメリカ合衆国イリノイ州 6 0 0 1 0 , バーリントン, キングストン・ドライブ 5 1 0 9

(72)発明者 ハム, ハイディ・エム

アメリカ合衆国テネシー州 3 7 2 1 5 , ナッシュヴィル, ブレッケンリッジ 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA34 CB01 DA36

4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA02 CA07 DA06 EA04 GA11 GA25

HA01 HA11 HA20

4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89

QQ91 QR72 QR77 QS31

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02

BA30 CA24 CA43 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 BA01 BA18 BA23 CA17 CA53 DC50 NA14 ZA022

ZA052 ZA062 ZA082 ZA122 ZA152 ZA162 ZA182 ZA362 ZA402 ZA422

ZA432 ZA452 ZA592 ZA662 ZA682 ZA702 ZA812 ZA962 ZA972 ZB132

ZB152 ZB212 ZB262 ZB312 ZB332 ZB352 ZC022 ZC392 ZC552

4C085 AA13 AA14 BB11 DD23 DD31

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA13 BA16 BA41 CA40 DA75 DA76

EA20 EA50 FA71 FA72 FA74

5B075 UU18

专利名称(译)	鉴定G蛋白偶联受体信号传导的调节剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007525170A</a>	公开(公告)日	2007-09-06
申请号	JP2006509913	申请日	2004-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	队列生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	队列Biotech公司		
[标]发明人	ギルクリストアネット ハムハイディエム		
发明人	ギルクリスト,アネット ハム,ハイディエム		
IPC分类号	C12N15/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/06 C12Q1/02 C07K5/10 C07K7/06 C07K16/44 C07K19/00 A61K38/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/04 A61P35/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/08 A61P11/06 A61P1/04 A61P19/10 A61P19 /04 A61P29/00 A61P13/02 A61P15/08 A61P3/04 A61P13/08 A61P25/22 A61P25/08 A61P3/00 A61P25 /24 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/30 A61P1/00 A61P25/20 A61P25/18 A61P9/00 G06F17 /30 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12P21/08 A61P25/34 A61P33/00 C07K C07K1/04 C07K14 /435 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/566 G01N33/68 G06F19/16		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/08 A61P19/04 A61P19/10 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25 /28 A61P25/30 A61P25/34 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 C07K1/047 C07K14/4722 G01N33/566 G01N33/6845 G01N33/74 G01N2333/4719 G01N2333/726 G01N2500/02 G01N2500/04 G16B15/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA C12N1/15.ZTD C12N1/19.ZCC C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.E C12Q1/02 C07K5 /10 C07K7/06 C07K16/44 C07K19/00 A61K37/02 A61K39/395.D A61P43/00.111 A61P9/10 A61P9/10. 101 A61P9/12 A61P9/04 A61P35/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/08 A61P11 /06 A61P1/04 A61P19/10 A61P19/04 A61P29/00.101 A61P13/02 A61P15/08 A61P3/04 A61P13/08 A61P25/22 A61P25/08 A61P3/00 A61P25/24 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/30 A61P1/00 A61P25/20 A61P25/18 A61P9/00 A61P43/00.105 A61P29/00 A61K39/395.N G06F17/30.170.F G01N33 /53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024 /CA02 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063 /QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS31 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065 /AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA01 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/CA53 4C084 /DC50 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA082 4C084/ZA122 4C084 /ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA432 4C084 /ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA812 4C084/ZA962 4C084 /ZA972 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZB332 4C084 /ZB352 4C084/ZC022 4C084/ZC392 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085 /DD23 4C085/DD31 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA16 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045 /FA72 4H045/FA74 5B075/UU18		
代理人(译)	小林 泰		

千叶昭夫

优先权

10/411336 2003-04-11 US

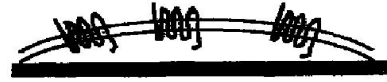
外部链接

[Espacenet](#)

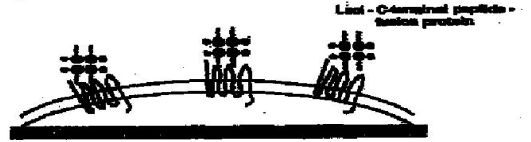
摘要(译)

本发明涉及以高亲和力和特异性阻断或增强G蛋白偶联受体介导的信号转导和/或稳定G蛋白偶联受体的某些构象异构体的方法。鉴定肽和其他化合物。还公开了与这些方法组合开发的测定，疗法和其他方法。

Bind GPCR to well



Add peptide library



Use parent peptide to compete

