(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2011-508875
(P2011-508875A)
(43)公表日　平成23年3月17日(2011.3.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	ZNAZ	2G045
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	U	4B064
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z	4H045
C40B 20/04	(2006.01)	C40B	20/04		
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	595	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 114 頁）　最終頁に続く

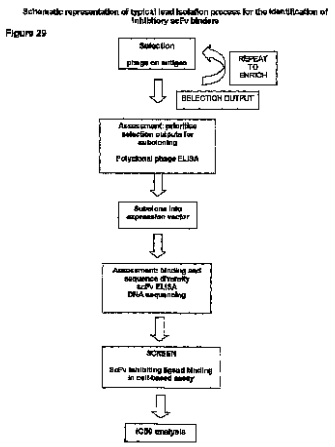
(21)出願番号　特願2010-538902 (P2010-538902)
(86)(22)出願日　平成20年12月19日 (2008.12.19)
(85)翻訳文提出日　平成22年8月20日 (2010.8.20)
(86)国際出願番号　PCT/GB2008/004223
(87)国際公開番号　WO2009/081136
(87)国際公開日　平成21年7月2日 (2009.7.2)
(31)優先権主張番号　0724860.2
(32)優先日　平成19年12月20日 (2007.12.20)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(71)出願人　510172871
ヘプテアズ　セラピューティクス　リミッテッド
HEPTARES THERAPEUTICS LIMITED
イギリス国　ハーフォードシャー　エイエル７　３エイエックス，　ウェリンガーデンシティー，　ブロードウォーターロード，　バイオパーク　（番地なし）
BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX United Kingdon

最終頁に続く

(54)【発明の名称】スクリーニング

(57)【要約】
ＧＰＣＲの立体構造特異的結合パートナーを生産する方法であって、
ａ）親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、該親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を提供する工程、
ｂ）試験化合物を提供する工程、
ｃ）前記試験化合物が、特定の立体構造を備える場合の前記ＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定する工程、及び
ｄ）前記特定の立体構造を備える場合の前記ＧＰＣＲ変異体に結合する試験化合物を単離する工程
を含む方法。親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲを生産する方法も開示される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＰＣＲの結合パートナーを生産する方法であって、
ａ）親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、該親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を提供する工程、
ｂ）１つ又は複数の試験化合物を提供する工程、
ｃ）前記試験化合物又はその各々が、特定の立体構造を備える場合の前記ＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定する工程、及び
ｄ）前記特定の立体構造を備える場合の前記ＧＰＣＲ変異体に結合する１つ又は複数の試験化合物を単離する工程
を含む方法。
【請求項２】
ｅ）前記試験化合物又はその各々が、前記特定の立体構造を備える場合の前記親ＧＰＣＲに結合するか否かを測定する工程、及び
ｆ）前記特定の立体構造にある場合の前記親ＧＰＣＲにも結合する前記試験化合物又はその各々を単離する工程
をさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項３】
前記ＧＰＣＲ変異体が固体支持体に固定化されている、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記支持体がビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートのいずれかである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ＧＰＣＲ変異体が共有結合相互作用を介して支持体に固定化されている、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
前記支持体がポリマー支持体で被覆されている、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ポリマー支持体がカルボキシル化デキストランである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＧＰＣＲ変異体が非共有結合相互作用を介して支持体に固定化されている、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項９】
前記支持体が、アビジン、ストレプトアビジン、金属イオン、親ＧＰＣＲに対する抗体、又は前記ＧＰＣＲ変異体に結合した分子タグに対する抗体のいずれかで被覆されている、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＧＰＣＲ変異体が、Ｃ末端又は細胞外ドメインが外側を向くように細胞内ドメインを介して固定化されている、請求項３から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＧＰＣＲ変異体が、Ｎ末端又は細胞内ドメインが外側を向くように細胞外ドメインを介して固定化されている、請求項３から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＧＰＣＲ変異体がＣ末端又はＮ末端に分子タグを含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記タグが、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、ｃ－Ｍｙｃタグ、ＤＤＤＤＫタグ、ＨＳＶタグ、Ｈａｌｏタグ、又はビオチンタグのいずれかである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＧＰＣＲ変異体が、全細胞製剤中又は細胞膜断片中に存在するか、界面活性剤に可

溶化されているか、脂質単層中、脂質二重層中、ビーズ結合脂質粒子中、固体支持脂質層中、又はプロテオリポソーム中に存在する、請求項１から１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

前記試験化合物が固体支持体に固定化されている、請求項１、２、１２から１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記固体支持体がビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートのいずれかである、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

前記ＧＰＣＲ変異体及び前記試験化合物が固体支持体に固定化されていない、請求項１、２、１２から１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

前記試験化合物が、ポリペプチド；アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アプタマー；ダルピン；Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ若しくはｄＡｂ抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラトリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質；又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトγクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質のいずれかである、請求項１から１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９】

前記試験化合物が生物学的試料として提供される、請求項１から１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

前記試料が血液、血清、血漿、脊髄液、組織抽出物又は細胞抽出物のいずれかである、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記試験化合物が、試験化合物のライブラリーである、請求項１から１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

前記ライブラリーが、ペプチドライブラリー、タンパク質ライブラリー、抗体ライブラリー、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、又はｓｃＦｖ若しくはＦａｂファージディスプレイライブラリーのいずれかである、請求項２０に記載の方法。

【請求項２３】

前記試験化合物が、ペプチドタグ、核酸タグ、化学物質タグ、蛍光タグ又はＲＦタグのいずれかで標識されている、請求項１から２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記抗体が、親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体に対する抗体であり、前記ＧＰＣＲ変異体が前記親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する、請求項１８に記載の方法。

【請求項２５】

前記抗体が、リンパ球を前記ＧＰＣＲ変異体の免疫原で免疫することによって作製される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記リンパ球がインビボで免疫される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記リンパ球がインビトロで免疫される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２８】

前記ＧＰＣＲ変異体の免疫原が、前記ＧＰＣＲ変異体の全部、その断片又はその融合タンパク質である、請求項２５から２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９】

ＧＰＣＲ変異体の免疫原が、全細胞製剤中若しくは細胞膜断片中で提供されるか、界面活性剤に可溶化されているか、脂質単層中、脂質二重層中、ビーズ結合脂質粒子中、固体支持脂質層中、又はプロテオリポソーム中で提供される、請求項２４から２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

前記免疫原がアジュバントと共に提供される、請求項２４から２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

前記アジュバントがＴｉｔｒｅｍａｘ又はＲｉｂｉアジュバント乳剤である、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

特定の立体構造を備える場合のＧＰＣＲ変異体に結合する前記単離試験化合物を修飾する工程、及び前記修飾した試験化合物が特定の立体構造を備える場合の前記ＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定する工程をさらに含む、請求項１から３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

前記修飾試験化合物が、前記特定の立体構造を備える場合の前記親ＧＰＣＲに結合するか否かを測定する工程をさらに含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

複数のＧＰＣＲ変異体が工程（ａ）で提供され、前記試験化合物が特定の立体構造を備える場合の各々のＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定し、前記特定の立体構造を備える場合の各々のＧＰＣＲ変異体に結合する試験化合物を単離する、請求項１から３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

第一の親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体及び第二の親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体が工程（ａ）で提供され、前記試験化合物が特定の立体構造を備える場合の各々のＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定し、前記特定の立体構造を備える場合の各々のＧＰＣＲ変異体に結合する試験化合物を単離する、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

複数のＧＰＣＲ変異体が工程（ａ）で提供され、第一のＧＰＣＲ変異体に結合するが、少なくとも１つの他のＧＰＣＲ変異体には結合しない又は前記第一のＧＰＣＲ変異体に対するよりも弱く結合する試験化合物を選択する、請求項１から３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３７】

請求項１から３６のいずれか一項に記載の方法であって、

（ｉ）前記単離試験化合物が、それが結合する前記ＧＰＣＲの機能に影響を及ぼすか否かを測定する工程、及び（ｉｉ）それが結合する前記ＧＰＣＲの機能に影響を及ぼす試験化合物を単離する工程、をさらに含む方法。

【請求項３８】

工程（ｉ）において、前記単離試験化合物が、その天然リガンド又はその類似体への前記ＧＰＣＲの結合に影響を及ぼすか否かを測定する、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

工程（ｉｉ）において、前記ＧＰＣＲとその天然リガンド又はその類似体の間の結合を低下させる試験化合物を単離する、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

工程（ｉｉ）において、前記ＧＰＣＲとその天然リガンド又はその類似体の間の結合を上昇させる試験化合物を単離する、請求項３８に記載の方法。

【請求項４１】
工程（ｉ）において、前記単離試験化合物が、それが結合する前記ＧＰＣＲの活性化を調節するか否かを測定する、請求項３７から４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
工程（ｉｉ）において、カルシウム可動化、ｃＡＭＰレベル、キナーゼ経路の活性、試験化合物が結合するＧＰＣＲの制御下でのレポーター遺伝子からの遺伝子転写、β－アレスチンのリクルートメント、Ｇタンパク質の活性化、ＧＴＰアーゼ活性又は［３５Ｓ］ＧＴＰγＳ結合のいずれかを調節する試験化合物を選択する、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
工程（ｉｉ）において、それが結合する前記ＧＰＣＲの活性化を上昇させるアゴニスト試験化合物を単離する、請求項４１又は４２に記載の方法。
【請求項４４】
工程（ｉｉ）において、それが結合する前記ＧＰＣＲの活性化を低下させるアンタゴニスト試験化合物を単離する、請求項４１又は４２に記載の方法。
【請求項４５】
請求項１から４４のいずれか一項に記載の方法であって、ＧＰＣＲ変異体が、
（ａ）親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、
（ｂ）前記ＧＰＣＲが特定の立体構造を備える場合に前記親ＧＰＣＲに結合するリガンドを選択する工程、
（ｃ）前記ＧＰＣＲ変異体又はその各々が、前記選択したリガンドへの結合に関して、そのリガンドへの結合に関する前記親ＧＰＣＲの安定性と比較して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び
（ｄ）前記選択したリガンドへの結合に関して前記親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程
によって提供される方法。
【請求項４６】
工程（ｃ）の前に、前記１つ又は複数の変異体を前記選択したリガンドと接触させる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記１つ又は複数の変異体が可溶化形態で提供される、請求項４５又は４６に記載の方法。
【請求項４８】
請求項４５から４７のいずれか一項に記載の方法であって、工程（ｃ）において前記ＧＰＣＲが備える前記特定の立体構造が、工程（ｂ）で選択したリガンドのクラスに対応する方法。
【請求項４９】
前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択したリガンドがアンタゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアンタゴニスト立体構造である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ、工程（ｃ）において前記ＧＰＣＲが備える前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記選択したリガンドに対する前記変異体の結合親和性が、前記選択したリガンドに対する前記親の結合親和性と実質的に同一であるか又はそれよりも大きい、請求項４５から５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記方法が１回又は複数回反復され、工程（ａ）において増大した安定性を有する前記

選択した変異体が前記方法のその後の回における前記親ＧＰＣＲとなる、請求項４５から５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
熱、界面活性剤、カオトロピック剤、及び極端なｐＨのいずれか１つ又は複数に対して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を選択する、請求項４５から５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
増大した熱安定性を有するＧＰＣＲ変異体を選択する、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記リガンドが、完全アゴニスト、部分的アゴニスト、逆アゴニスト、アンタゴニストのいずれか１つである、請求項４５から５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記リガンドが前記ＧＰＣＲに結合するポリペプチドである、請求項４５から５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記ポリペプチドが、抗体、アンキリン、Ｇタンパク質、ＲＧＳタンパク質、アレスチン、ＧＰＣＲキナーゼ、受容体チロシンキナーゼ、ＲＡＭＰ、ＮＳＦ、ＧＰＣＲ、ＮＭＤＡ受容体サブユニットＮＲ１若しくはＮＲ２ａ、又はカルシオン、フィブロネクチンドメインフレームワーク、又は前記ＧＰＣＲに結合するその断片若しくは誘導体のいずれかである、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
工程（ｂ）において２又はそれ以上のリガンドが選択され、各々の存在が前記ＧＰＣＲに同じ特定の立体構造を備えさせる、請求項４５から５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
親と比較して、工程（ｂ）で選択した前記リガンドとは異なるクラスのリガンドに結合する低下した能力を有するＧＰＣＲ変異体を選択する、請求項４５から５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記ＧＰＣＲが、β－アドレナリン受容体、アデノシン受容体及びニューロテンシン受容体のいずれか１つである、請求項４５から５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
請求項１から４４のいずれか一項に記載の方法であって、前記ＧＰＣＲ変異体が、
（ａ）請求項４５から６０のいずれか一項に記載の方法を実施する工程、
（ｂ）増大した安定性に関して選択した前記１つ又は複数のＧＰＣＲ変異体における１つ又は複数の変異したアミノ酸残基の位置を同定する工程、及び
（ｃ）前記同定した位置の１つ又は複数におけるアミノ酸の置き換えを含むＧＰＣＲ変異体を合成する工程
によって提供される方法。
【請求項６２】
前記ＧＰＣＲ変異体が親ＧＰＣＲと比較して複数の変異を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
請求項１から４４のいずれか一項に記載の方法であって、前記ＧＰＣＲ変異体が、
（ｉ）第一の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体のアミノ酸配列において、１つ又は複数の変異体が前記第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する１つ又は複数の位置を同定する工程、及び
（ｉｉ）対応する１つ又は複数の位置で、第二のＧＰＣＲを規定するアミノ酸配列内に１つ又は複数の変異を作製して、第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第二の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程

によって提供される方法。
【請求項６４】
第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体が、請求項４５から６２のいずれか一項に記載の方法にしたがって提供される、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記第二のＧＰＣＲが、前記第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲクラス又はファミリーのものである、請求項６３又は６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記第二のＧＰＣＲが、前記第一の親ＧＰＣＲと少なくとも２０％の配列同一性を有するＧＰＣＲである、請求項６３から６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を生産する、請求項１から４４のいずれか一項に記載の方法であって、
（ｉ）第一の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、
（ｉｉ）膜タンパク質構造モデルにおいて、１つ又は複数の変異体が前記第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する１つ又は複数の構造モチーフを同定する工程、及び
（ｉｉｉ）第二の親ＧＰＣＲにおいて対応する１つ又は複数の構造モチーフを規定するアミノ酸配列内に１つ又は複数の変異を作製して、前記第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第二の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程
を含む方法。
【請求項６８】
前記膜タンパク質構造モデルが内在性膜タンパク質のモデルである、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記内在性膜タンパク質が、工程（ｉ）の前記第一の親ＧＰＣＲの変異体が前記第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なる前記変異体中のアミノ酸を有するタンパク質ドメインにわたって、前記第一の親ＧＰＣＲの変異体と少なくとも２０％の配列同一性を有する、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記内在性膜タンパク質がＧＰＣＲである、請求項６８又は６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記ＧＰＣＲが、前記第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲクラス又はファミリーのものである、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
前記膜タンパク質構造モデルが、ヒトβ$_2$アドレナリン受容体又はウシロドプシンのモデルである、請求項６７から７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
前記構造モチーフが、ヘリックス界面、ヘリックスの折れ曲がり（キンク）、ヘリックスの折れ曲がり（キンク）の反対側のヘリックス、脂質二重層に向いたヘリックス表面、疎水性－親水性境界層の脂質二重層に向いたヘリックス表面、ループ領域、又はタンパク質結合ポケットのいずれかである、請求項６７から７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
前記第二の親ＧＰＣＲが前記第一の親ＧＰＣＲである、請求項６７から７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記第二の親ＧＰＣＲが前記第一の親ＧＰＣＲではない、請求項６７から７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】

前記第二の親ＧＰＣＲが、前記第一の親ＧＰＣＲと少なくとも２０％の配列同一性を有するＧＰＣＲである、請求項７４又は７５に記載の方法。

【請求項７７】

前記第二のＧＰＣＲが、前記第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲクラス又はファミリーのものである、請求項７４から７６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７８】

請求項６３から７７のいずれか一項に記載の方法であって、

（Ｉ）前記第二の親ＧＰＣＲが特定の立体構造を備える場合に前記第二の親ＧＰＣＲに結合するリガンドを選択する工程、

（ＩＩ）特定の立体構造を備える場合の前記第二の親ＧＰＣＲの前記変異体又はその各々が、前記選択したリガンドへの結合に関して同じ特定の立体構造を備える場合の前記第二の親ＧＰＣＲの安定性と比較して、そのリガンドへの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び

（ＩＩＩ）前記選択したリガンドへの結合に関して、前記第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程

をさらに含む方法。

【請求項７９】

工程（ＩＩ）において前記ＧＰＣＲが備える前記特定の立体構造が、工程（Ｉ）で選択したリガンドのクラスに対応する、請求項７８に記載の方法。

【請求項８０】

前記選択したリガンドがアゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択したリガンドがアンタゴニストクラスのリガンドに由来するものであり、且つ前記特定の立体構造がアンタゴニスト立体構造である、請求項７９に記載の方法。

【請求項８１】

前記リガンドが請求項５５から５７のいずれか一項で規定されるものである、請求項７８から８０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８２】

前記第二のＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体の結合親和性が、前記選択したリガンドについての前記第二の親ＧＰＣＲの結合親和性と実質的に同一であるか又はそれ以上である、請求項７８から８１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８３】

工程（ａ）で提供されるＧＰＣＲ変異体が、β－アドレナリン受容体、アデノシン受容体、ニューロテンシン受容体又はムスカリン受容体のいずれか１つである、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８４】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体が、その親受容体と比較して、以下の位置：（ｉ）図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる：Ｉｌｅ５５，Ｇｌｙ６７，Ａｒｇ６８，Ｖａｌ８９，Ｍｅｔ９０，Ｇｌｙ９８，Ｉｌｅ１２９，Ｓｅｒ１５１，Ｖａｌ１６０，Ｇｌｎ１９４，Ｇｌｙ１９７，Ｌｅｕ２２１，Ｔｙｒ２２７，Ａｒｇ２２９，Ｖａｌ２３０，Ａｌａ２３４，Ａｌａ２８２，Ａｓｐ３２２，Ｐｈｅ３２７，Ａｌａ３３４，Ｐｈｅ３３８、（ｉｉ）図１０に記載のヒトアデノシン$Ａ_{2ａ}$受容体の番号付けによる：Ｇｌｙ１１４，Ｇｌｙ１１８，Ｌｅｕ１６７，Ａｌａ１８４，Ａｒｇ１９９，Ａｌａ２０３，Ｌｅｕ２０８，Ｇｌｎ２１０，Ｓｅｒ２１３，Ｇｌｕ２１９，Ａｒｇ２２０，Ｓｅｒ２２３，Ｔｈｒ２２４，Ｇｌｎ２２６，Ｌｙｓ２２７，Ｈｉｓ２３０，Ｌｅｕ２４１，Ｐｒｏ２６０，Ｓｅｒ２６３，Ｌｅｕ２６７，Ｌｅｕ２７２，Ｔｈｒ２７９，Ａｓｎ２８４，Ｇｌｎ３１１，Ｐｒｏ３１３，Ｌｙｓ３１５、（ｉｉｉ）図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる：Ａｌａ６９，Ｌｅｕ７２，Ａｌａ７３，Ａｌａ８６，Ａｌａ９０，Ｓｅｒ１００，Ｈｉ

ｓ １０３，Ｓｅｒ １０８，Ｌｅｕ １０９，Ｌｅｕ １１１，Ａｓｐ １１３，Ｉｌｅ １１６，Ａｌａ １２０，Ａｓｐ １３９，Ｐｈｅ １４７，Ａｌａ １５５，Ｖａｌ １６５，Ｇｌｕ １６６，Ｌｙｓ １７６，Ａｌａ １７７，Ｔｈｒ １７９，Ｍｅｔ １８１，Ｓｅｒ １８２，Ａｒｇ １８３，Ｐｈｅ １８９，Ｌｅｕ ２０５，Ｔｈｒ ２０７，Ｇｌｙ ２０９，Ｇｌｙ ２１５，Ｖａｌ ２２９，Ｍｅｔ ２５０，Ｉｌｅ ２５３，Ｌｅｕ ２５６，Ｉｌｅ ２６０，Ａｓｎ ２６２，Ｖａｌ ２６８，Ａｓｎ ２７０，Ｔｈｒ ２７９，Ｍｅｔ ２９３，Ｔｈｒ ２９４，Ｇｌｙ ３０６，Ｌｅｕ ３０８，Ｖａｌ ３０９，Ｌｅｕ ３１０，Ｖａｌ ３１３，Ｐｈｅ ３４２，Ａｓｐ ３４５，Ｔｙｒ ３４９，Ｔｙｒ ３５１，Ａｌａ ３５６，Ｐｈｅ ３５８，Ｖａｌ ３６０，Ｓｅｒ ３６２，Ａｓｎ ３７０，Ｓｅｒ ３７３，Ｐｈｅ ３８０，Ａｌａ ３８５，Ｃｙｓ ３８６，Ｐｒｏ ３８９，Ｇｌｙ ３９０，Ｔｒｐ ３９１，Ａｒｇ ３９２，Ｈｉｓ ３９３，Ａｒｇ ３９５，Ｌｙｓ ３９７，Ｐｒｏ ３９９、及び（ｉｖ）図１７に記載のムスカリン受容体の番号付けによる：Ｌｅｕ ６５、Ｍｅｔ １４５、Ｌｅｕ ３９９、Ｉｌｅ ３８３及びＭｅｔ ３８４の任意の１つ又は複数に対応する位置に少なくとも１つの異なるアミノ酸を有する、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８５】

工程（ａ）で提供されるＧＰＣＲ変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ｉｌｅ ５５，Ｇｌｙ ６７，Ａｒｇ ６８，Ｖａｌ ８９，Ｍｅｔ ９０，Ｇｌｙ ９８，Ｉｌｅ １２９，Ｓｅｒ １５１，Ｖａｌ １６０，Ｇｌｎ １９４，Ｇｌｙ １９７，Ｌｅｕ ２２１，Ｔｙｒ ２２７，Ａｒｇ ２２９，Ｖａｌ ２３０，Ａｌａ ２３４，Ａｌａ ２８２，Ａｓｐ ３２２，Ｐｈｅ ３２７，Ａｌａ ３３４，Ｐｈｅ ３３８．の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するβ－アドレナリン受容体変異体である、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８６】

前記β－アドレナリン受容体変異体が、図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の配列と少なくとも２０％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項８６に記載の方法。

【請求項８７】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体がβ－アドレナリン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ｉｌｅ ５５，Ｇｌｙ ６７，Ａｒｇ ６８，Ｖａｌ ８９，Ｍｅｔ ９０，Ｇｌｙ ９８，Ｉｌｅ １２９，Ｓｅｒ １５１，Ｖａｌ １６０，Ｇｌｎ １９４，Ｇｌｙ １９７，Ｌｅｕ ２２１，Ｔｙｒ ２２７，Ａｒｇ ２２９，Ｖａｌ ２３０，Ａｌａ ２３４，Ａｌａ ２８２，Ａｓｐ ３２２，Ｐｈｅ ３２７，Ａｌａ ３３４，Ｐｈｅ ３３８．のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８８】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図１０に記載のヒトアデノシン$Ａ_{２ａ}$受容体の番号付けによる以下の位置：Ｇｌｙ １４，Ｇｌｙ １１８，Ｌｅｕ １６７，Ａｌａ １８４，Ａｒｇ １９９，Ａｌａ ２０３，Ｌｅｕ ２０８，Ｇｌｎ ２１０，Ｓｅｒ ２１３，Ｇｌｕ ２１９，Ａｒｇ ２２０，Ｓｅｒ ２２３，Ｔｈｒ ２２４，Ｇｌｎ ２２６，Ｌｙｓ ２２７，Ｈｉｓ ２３０，Ｌｅｕ ２４１，Ｐｒｏ ２６０，Ｓｅｒ ２６３，Ｌｅｕ ２６７，Ｌｅｕ ２７２，Ｔｈｒ ２７９，Ａｓｎ ２８４，Ｇｌｎ ３１１，Ｐｒｏ ３１３，Ｌｙｓ ３１５．の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するアデノシン受容体変異体である、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８９】

前記アデノシン受容体変異体が、図１０に記載のヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体の配列と少なくとも２０％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項８８に記載の方法。

【請求項９０】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体がアデノシン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図１０に記載のヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体の番号付けによる以下の位置：Ｇｌｙ １１４，Ｇｌｙ １１８，Ｌｅｕ １６７，Ａｌａ １８４，Ａｒｇ １９９，Ａｌａ ２０３，Ｌｅｕ ２０８，Ｇｌｎ ２１０，Ｓｅｒ ２１３，Ｇｌｕ ２１９，Ａｒｇ ２２０，Ｓｅｒ ２２３，Ｔｈｒ ２２４，Ｇｌｎ ２２６，Ｌｙｓ ２２７，Ｈｉｓ ２３０，Ｌｅｕ ２４１，Ｐｒｏ ２６０，Ｓｅｒ ２６３，Ｌｅｕ ２６７，Ｌｅｕ ２７２，Ｔｈｒ ２７９，Ａｓｎ ２８４，Ｇｌｎ ３１１，Ｐｒｏ ３１３，Ｌｙｓ ３１５．のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９１】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体が、その対応する親受容体と比較した場合、図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置：Ａｌａ ６９，Ｌｅｕ ７２，Ａｌａ ７３，Ａｌａ ８６，Ａｌａ ９０，Ｓｅｒ １００，Ｈｉｓ １０３，Ｓｅｒ １０８，Ｌｅｕ １０９，Ｌｅｕ １１１，Ａｓｐ １１３，Ｉｌｅ １１６，Ａｌａ １２０，Ａｓｐ １３９，Ｐｈｅ １４７，Ａｌａ １５５，Ｖａｌ １６５，Ｇｌｕ １６６，Ｌｙｓ １７６，Ａｌａ １７７，Ｔｈｒ １７９，Ｍｅｔ １８１，Ｓｅｒ １８２，Ａｒｇ １８３，Ｐｈｅ １８９，Ｌｅｕ ２０５，Ｔｈｒ ２０７，Ｇｌｙ ２０９，Ｇｌｙ ２１５，Ｖａｌ ２２９，Ｍｅｔ ２５０，Ｉｌｅ ２５３，Ｌｅｕ ２５６，Ｉｌｅ ２６０，Ａｓｎ ２６２，Ｖａｌ ２６８，Ａｓｎ ２７０，Ｔｈｒ ２７９，Ｍｅｔ ２９３，Ｔｈｒ ２９４，Ｇｌｙ ３０６，Ｌｅｕ ３０８，Ｖａｌ ３０９，Ｌｅｕ ３１０，Ｖａｌ ３１３，Ｐｈｅ ３４２，Ａｓｐ ３４５，Ｔｙｒ ３４９，Ｔｙｒ ３５１，Ａｌａ ３５６，Ｐｈｅ ３５８，Ｖａｌ ３６０，Ｓｅｒ ３６２，Ａｓｎ ３７０，Ｓｅｒ ３７３，Ｐｈｅ ３８０，Ａｌａ ３８５，Ｃｙｓ ３８６，Ｐｒｏ ３８９，Ｇｌｙ ３９０，Ｔｒｐ ３９１，Ａｒｇ ３９２，Ｈｉｓ ３９３，Ａｒｇ ３９５，Ｌｙｓ ３９７，Ｐｒｏ ３９９．の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するニューロテンシン受容体変異体である、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９２】

前記ニューロテンシン受容体変異体が、図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の配列と少なくとも２０％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項９１に記載の方法。

【請求項９３】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体がニューロテンシン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置：Ａｌａ ６９，Ｌｅｕ ７２，Ａｌａ ７３，Ａｌａ ８６，Ａｌａ ９０，Ｓｅｒ １００，Ｈｉｓ １０３，Ｓｅｒ １０８，Ｌｅｕ １０９，Ｌｅｕ １１１，Ａｓｐ １１３，Ｉｌｅ １１６，Ａｌａ １２０，Ａｓｐ １３９，Ｐｈｅ １４７，Ａｌａ １５５，Ｖａｌ １６５，Ｇｌｕ １６６，Ｌｙｓ １７６，Ａｌａ １７７，Ｔｈｒ １７９，Ｍｅｔ １８１，Ｓｅｒ １８２，Ａｒｇ １８３，Ｐｈｅ １８９，Ｌｅｕ ２０５，Ｔｈｒ ２０７，Ｇｌｙ ２０９，Ｇｌｙ ２１５，Ｖａｌ ２２９，Ｍｅｔ ２５０，Ｉｌｅ ２５３，Ｌｅｕ ２５６，Ｉｌｅ ２６０，Ａｓｎ ２６２，Ｖａｌ ２６８，Ａｓｎ ２７０，Ｔｈｒ ２７９，Ｍｅｔ ２９３，Ｔｈｒ ２９４，Ｇｌｙ ３０６，Ｌｅｕ ３０８，Ｖａｌ ３０９，Ｌｅｕ ３１０，Ｖａｌ ３１３，Ｐｈｅ ３４２，Ａｓｐ ３４５，Ｔｙｒ ３４９，Ｔｙｒ ３５１，Ａｌａ ３５６，Ｐｈｅ ３５８，Ｖａｌ ３６０，Ｓｅｒ ３６２，Ａｓｎ ３７０，Ｓｅｒ ３７３，Ｐｈｅ ３８０，Ａｌａ ３８５，Ｃｙｓ ３８６，Ｐｒｏ ３８９，Ｇｌｙ ３９０，Ｔｒｐ ３９１，Ａｒｇ ３９２，Ｈｉｓ ３９３，Ａｒｇ

３９５，Ｌｙｓ　３９７，Ｐｒｏ　３９９．のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項１から８２のいずれか一項に記載のＧＰＣＲ変異体。

【請求項９４】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体が、対応する野生型ムスカリン受容体と比較した場合、図１７に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ｌｅｕ　６５，Ｍｅｔ　１４５，Ｌｅｕ　３９９，Ｉｌｅ　３８３及びＭｅｔ　３８４の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有するムスカリン受容体変異体である、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５】

前記ムスカリン受容体変異体が、図１７に記載のラットニューロテンシン受容体の配列と少なくとも２０％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項９４に記載の方法。

【請求項９６】

工程（ａ）で提供される前記ＧＰＣＲ変異体がムスカリン受容体変異体であって、前記受容体変異体が、その親受容体と比較して、図１７に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ｌｅｕ　６５，Ｍｅｔ　１４５，Ｌｅｕ　３９９，Ｉｌｅ　３８３及びＭｅｔ　３８４のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する構造モチーフ内に少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、請求項１から８２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９７】

ＧＰＣＲの結合パートナーを生産する方法であって、請求項１から９６のいずれか一項に記載の方法を実施することによって同定可能な結合パートナーを合成する工程を含む方法。

【請求項９８】

請求項１から９７に記載の方法のいずれかによって得られる結合パートナー。

【請求項９９】

前記結合パートナーが立体構造特異的である、請求項９８に記載の結合パートナー。

【請求項１００】

前記結合パートナーが、ポリペプチド；アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アプタマー；ダルピン；Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ若しくはｄＡｂ抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質；又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトγクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質のいずれかである、請求項９８又は９９に記載の結合パートナー。

【請求項１０１】

前記結合パートナーが抗体である、請求項１００に記載の結合パートナー。

【請求項１０２】

前記結合パートナーに対する前記ＧＰＣＲ変異体の結合親和性が、前記結合パートナーに対する前記親ＧＰＣＲの結合親和性と実質的に同一であるか又はそれよりも大きい、請求項９８から１０１のいずれか一項に記載の結合パートナー。

【請求項１０３】

親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を含むバイオセンサーであって、前記ＧＰＣＲ変異体が親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有し、且つ、標的物質が前記ＧＰＣＲ変異体に結合した際に検出可能なシグナルが生成される、バイオセンサー。

【請求項１０４】

前記ＧＰＣＲ変異体が、請求項４５から８２のいずれか一項で規定されるように提供される、請求項１０３に記載のバイオセンサー。

【請求項１０５】
前記ＧＰＣＲ変異体が、請求項８３から９６のいずれか一項で規定されるものである、請求項１０３又は１０４に記載のバイオセンサー。
【請求項１０６】
前記検出可能なシグナルが、色の変化；蛍光；エバネッセンス；表面プラズモン共鳴；電気伝導度若しくは電荷分離；紫外、可視若しくは赤外吸収；発光；化学発光；電気化学発光；蛍光異方性；蛍光強度；蛍光寿命；蛍光偏光；蛍光エネルギー移動；分子量；電子スピン共鳴；核磁気共鳴；流体力学的容積若しくは半径；比重；シンチレーション；電界効果抵抗；電気インピーダンス；音響インピーダンス；量子消失；共鳴散乱；蛍光クエンチング；蛍光相関分光法；音響負荷；音響せん断波速度；結合力；又は界面応力のいずれかである、請求項１０３から１０５のいずれか一項に記載のバイオセンサー。
【請求項１０７】
前記バイオセンサーが、水晶膜厚計バイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、プレーナー導波路バイオセンサー、表面ラマンセンサー、又は表面プラズモン共鳴バイオセンサーなどのフローベースのバイオセンサーである、請求項１０３から１０６のいずれか一項に記載のバイオセンサー。
【請求項１０８】
前記標的物質が、分子、生体分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、ＧＰＣＲリガンド、合成分子、薬剤、薬剤代謝産物又は疾患バイオマーカーのいずれかである、請求項１０３から１０７のいずれか一項に記載のバイオセンサー。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）の結合パートナーのスクリーニング、特にＧＰＣＲの立体構造特異的な結合パートナーに関する。
【背景技術】
【０００２】
本明細書に記載の明らかに過去に公開された文献の記載又は議論は、必ずしも、その文献が従来技術の一部であるか又は一般的な技術常識であると認めるものと解されるべきではない。
【０００３】
ＧＰＣＲは、多数の生理プロセスを調節する非常に大きなタンパク質ファミリーを構成し、多数の効果的な薬剤の標的である。かくして、それらは、非常に薬理学的に重要なものである。ＧＰＣＲの一覧は、参照によって本明細書に取り込むFoord et al (2005) Pharmacol Rev. 57, 279-288に挙げられている。ＧＰＣＲは一般的には単離した際に不安定であり、多大の努力が為されたにもかかわらず、例外的に天然に安定であるウシロドプシン、及び融合タンパク質として又は抗体断片との複合体として結晶化されたβ２アドレナリン受容体だけが結晶化可能であった。
【０００４】
ＧＰＣＲは新薬の開発につながるような標的であり、現在の薬剤の四分の一超がＧＰＣＲを標的とすることを示すOverington et al (2006) Nature Rev. Drug Discovery 5, 993-996 が特に参照される。
【０００５】
ＧＰＣＲは、アゴニスト及びアンタゴニストなどの各種の薬理学的な種類のリガンドと結合する多数の異なる立体構造で存在し、機能するためにこれらの立体構造の間で循環すると解されている（Kenakin T. (1997) Ann N Y Acad Sci 812, 116-125）。立体構造の間での切り替えが受容体の結晶構造を得ることの困難さに寄与する。
【０００６】
ＧＰＣＲに対する立体構造特異的結合パートナーの作製はいくつかの因子によって妨げられる。例えば、ＧＰＣＲは一般的にそれらの天然の膜環境から切り離した際に乏しい安

定性を有し、それらが即時に変性又は沈殿せずに試験することが可能な条件の範囲を厳しく制限する。精製ＧＰＣＲをそれらの天然立体構造で生産できないことは、精製受容体の使用に依存する広い範囲のスクリーニングパラダイムにおけるそれらの使用を妨げる。故に、ＧＰＣＲスクリーニングは伝統的に、受容体が細胞膜又は全細胞中に存在するアッセイに依存してきた。

【０００７】

多くのＧＰＣＲは、抗体などのバイオセラピューティックによって利用され得る重要な治療標的である。ＧＰＣＲに対する治療用抗体の作製は、一部には適切な免疫原の欠如の故に極めて困難であった。通常の経路は、受容体の小さなペプチド断片を免疫のために採取することであるが、これらはその天然の立体構造を保持せず、多くの場合に、受容体に結合して受容体を標識することは可能であるが、機能的なアゴニスト又はアンタゴニスト活性を有さない、結合パートナーを生じさせる。ＧＰＣＲの特有の物理的立体構造の故に、抗体などのバイオセラピューティックは、ペプチド断片が単離において使用された際に失われる特徴である、ポリペプチド「ループ」の組み合わせを認識することも知られている。ＧＰＣＲの局所的な膜環境がタンパク質の三次構造を維持し、いずれのエピトープが細胞外表面に存在するかを支配することはよく知られている。これらのエピトープは、理論的にはバイオセラピューティックによって認識されることが可能であるが、標的ＧＰＣＲを含む膜又は膜断片に対する抗体などのバイオセラピューティックを産生することは簡単ではなく、というのはこれらの製剤は不可避的に、他の非標的ＧＰＣＲ及び膜結合タンパク質、並びにバイオセラピューティックの選択及び生産工程において望ましくない抗原として作用し得るリポタンパク質、アポリポタンパク質、脂質、ホスホインソシトール脂質及びリポ多糖類などの他の膜成分を含むからである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明者らは、特に生物学的に有意義な形態でＧＰＣＲを安定化するための方法を開発した。その様な受容体は、免疫原として及び／又は結合パートナーの作製のための選択及びスクリーニング試薬として多くの利点を有する。特に、それらは、多くの場合機能的特性を有し、これまで作製が非常に困難であることが証明されてきた立体構造特異的な結合パートナーの作製のために有用である。

【０００９】

例えば、発現、可溶化及び精製工程を通じて天然の正しく折りたたまれた受容体の安定性は、精製ＧＰＣＲの高い収率（実験室規模の細胞培養からのミリグラム量）を促進する。さらに、機能の変化を伴わない、一連の界面活性剤及び可溶化緩衝剤及び添加剤中での折りたたまれたタンパク質の安定性は、免疫のため、変性を伴わない固体表面への固定化（例えば、プラスチックプレート、樹脂、ビーズ若しくはスライドガラスに直接若しくはポリヒスチジンタグなどの親和性タグを介して）のため、抗体の作製及びスクリーニングのため、又はライブラリーのスクリーニングのため（アフィボディ、抗体、ファージ若しくは低分子ライブラリーなど）の条件の最適化を可能にする。ライブラリーのスクリーニングに関しては、膜性物質及び細胞表面の「付着性抗原（ｓｔｉｃｋｙ　ａｎｔｉｇｅｎｓ）」の除去によって非特異的結合を低減することにより、シグナル／ノイズ比の大きな改善が得られる。高度に極性の又は荷電した頭部基を有する短鎖の界面活性剤（ラウリルジメチルアミン－オキシド、オクチルＤ－グルコシド又はオクチルＤ－マルトシドなど）を使用することも可能になり、それにより、ｎ－ドデシルβ－Ｄ－マルトシドなどのより長鎖の界面活性剤によって隠されているＧＰＣＲのより大きな割合の抗原性表面が明らかにされる（Ｂａｍｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　１０３（２００６）１６２２４－１６２２９）。受容体の特定の機能的立体構造を捕捉することも、立体構造特異的な機能的結合パートナーを作製する可能性を高める。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

したがって、本発明の第一の態様は、ＧＰＣＲの結合パートナーを生産する方法であって、
ａ）親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する、該親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を提供する工程、
ｂ）１つ又は複数の試験化合物を提供する工程、
ｃ）前記１つ又は複数の試験化合物の各々が、特定の立体構造を備えた前記ＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定する工程、及び
ｄ）前記特定の立体構造を備えた前記ＧＰＣＲ変異体に結合する試験化合物を単離する工程
を含む方法を提供する。

【００１１】
「結合パートナー」によって、本願では、特定ＧＰＣＲに結合する分子が意味される。好ましくは、前記分子はＧＰＣＲに選択的に結合する。例えば、前記結合パートナーは、少なくとも１つの他のＧＰＣＲに対するよりも少なくとも５倍又は１０倍低い（すなわち、より高い親和性）、好ましくは１００倍又は５００倍以上低いK_d値（解離定数）を有することが好ましい。より好ましくは、ＧＰＣＲの結合パートナーは少なくとも１つの他のＧＰＣＲに対するよりも１０００倍又は５０００倍以上低いK_d値を有する。しかしながら、限界値は結合パートナーの性質に依存して変化すると解されるであろう。かくして、典型的には、低分子結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には少なくとも１つの他のＧＰＣＲに対するよりも少なくとも５０倍又は１００倍低いK_d値を有する。典型的には、抗体結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には少なくとも１つの他のＧＰＣＲに対するよりも少なくとも５００倍又は１０００倍低いK_d値を有する。

【００１２】
特定の立体構造に捕捉された安定化ＧＰＣＲの使用により、立体構造特異的結合パートナーが生産される可能性が増大する。したがって、当該方法はＧＰＣＲの立体構造特異的結合パートナーを生産するために使用してよいと解される。かくして、前記方法は、ＧＰＣＲが安定化された立体構造によって決定されるアゴニスト又はアンタゴニスト（又は他の薬理学的分類）などの機能的活性を有する結合パートナーを同定するためにも使用してよい。

【００１３】
「立体構造特異的」によって、本願では、ＧＰＣＲの結合パートナーがＧＰＣＲの特定構造に選択的に結合し、したがって、同じＧＰＣＲの他の立体構造についてのK_d値よりも低いその立体構造についてのK_d値を有することが意味される。かくして、立体構造特異的結合パートナーは、ＧＰＣＲの１つの立体構造に結合する（そしてＧＰＣＲにこの立体構造を採用させ得る）が、ＧＰＣＲが採用することが可能な他の立体構造に対しては強く結合しない。したがって、２つの立体構造と立体構造特異的結合パートナーの間の親和性の差は小さくてもよいが、典型的には、立体構造状態の間の平衡を変化させ、ＧＰＣＲが特定の立体構造をとることを促進するのに十分であると解されるであろう。かくして、立体構造特異的結合パートナーは、ＧＰＣＲを生物学的に有意義な立体構造（例えば、リガンド結合状態）に捕捉するものであると解されてよい。典型的には、立体構造特異的結合パートナーは、ＧＰＣＲ立体構造の少なくとも１つの他の立体構造に対するよりも少なくとも５倍又は１０倍低い（すなわち、より高い親和性）、好ましくは１００から１０００倍低いK_d値（解離定数）を有する。

【００１４】
典型的には、立体構造特異的結合パートナーは、ｍＭからｐＭ又はｍＭからｆＭ、例えばμＭからｎＭの範囲又はｎＭからｐＭの範囲のK_dでＧＰＣＲに結合する。

【００１５】
K_d値は、当該技術分野でよく知られた方法を用いて及び、例えば以下に記載するように、容易に測定することが可能である。　平衡時のK_d＝［Ｒ］［Ｌ］／［ＲＬ］

［式中、角括弧内の用語は、
・受容体－リガンド複合体［ＲＬ］
・未結合受容体［Ｒ］、及び
・未結合（「遊離」）リガンド［Ｌ］
の濃度を表す］。

【００１６】

K_dを測定するためにはこれらの用語の値が既知でなければならない。受容体の濃度は通常既知ではないので、その場合はＨｉｌｌ－Ｌａｎｇｍｕｉｒの式：

部分占有率＝［Ｌ］／［Ｌ］＋K_d

が使用される。

【００１７】

実験的にK_dを測定するためには、平衡時の遊離リガンドと結合リガンドの濃度が既知でなければならない。典型的には、これは、放射標識又は蛍光標識リガンドを使用して、それを平衡に達するまで受容体（全細胞中又はホモジナイズされた膜中に存在する）と共にインキュベートすることによって実施されてよい。結合リガンドと遊離リガンドからのシグナルを分離することによって遊離リガンドと結合リガンドの量が測定できなければならない。放射性リガンドの場合、これは、溶液中の遊離リガンドから全細胞又は膜上に存在する結合リガンドを分離するための遠心分離又はろ過によって実施されてよい。代替的には、シンチレーション近接アッセイが使用される。このアッセイでは、受容体（膜中の）はシンチラントを含むビーズに結合されており、ビーズに固定化された受容体に結合した放射性リガンドが近接することによってのみシグナルが検出される。

【００１８】

親和性定数も機能的アッセイ（K_B）において測定してよい。この場合、全細胞中又は膜中の受容体は、アゴニストリガンド及び測定される応答（例えば、細胞内カルシウムの可動化、Ｇタンパク質の活性化、アデニル酸シクリーゼ若しくはｃＡＭＰの増加若しくは減少、ＭＡＰ－キナーゼ経路などのシグナル伝達経路の活性化又は遺伝子転写の活性化）によって活性化される。アゴニスト活性を阻害するアンタゴニストの能力を測定してもよく、競争的アンタゴニストに関しては、この能力は親和性定数に等しい。

【００１９】

一連の洗浄剤、界面活性剤及び可溶化剤緩衝液中のＧＰＣＲ変異体の安定性は、それらの通常の膜環境の外でそれらを精製することを可能にする。したがって、ＧＰＣＲは、非標的ＧＰＣＲなどの望ましくない抗原、膜結合タンパク質、並びにリポタンパク質、アポリポタンパク質、脂質、ホスホイノシトール脂質及びリポ多糖類などの他の膜成分から取り出された単離形態で提供されてよい。かくして、本発明の方法は、その様な望ましくない抗原の非存在下でＧＰＣＲの結合パートナーを選択することを可能にする。かくして本発明は、他の膜成分に比べてＧＰＣＲに対して高い選択性を有する結合パートナーを生産する。

【００２０】

特定の立体構造における安定性を付与する親ＧＰＣＲの変異は、特定の立体構造を備える親ＧＰＣＲの特定結合パートナーへの結合には影響を及ぼさないと予想される。しかしながら、一度結合パートナーが、特定の立体構造を備えるＧＰＣＲ変異体への結合を評価することによって単離されれば、同じ特定の立体構造を備える親ＧＰＣＲへのその結合パートナーの結合も評価されてよいと解される。

【００２１】

かくして、１つの実施態様では本発明の方法は、
（ｅ）各々の試験化合物が前記特定立体構造を備える場合の親ＧＰＣＲに結合するか否かを測定する工程、及び
（ｆ）前記特定立体構造を備える場合の親ＧＰＣＲにも結合する前記試験化合物を単離する工程
をさらに含む。

【００２２】
典型的には、前記選択した結合パートナーは、同じ特定の立体構造を備える場合の親ＧＰＣＲに対する結合と同様の作用強度で特定の立体構造を備える場合のＧＰＣＲ変異体に結合する。典型的には、ＧＰＣＲ変異体と親ＧＰＣＲに結合する特定の結合パートナーについてのK_d値は、互いに５から１０倍以内、例えば２から３倍以内である。典型的には、親ＧＰＣＲと比較してＧＰＣＲ変異体に対する結合パートナーの結合は、最大で５倍弱く、最大で１０倍強いであろう。
【００２３】
典型的には、前記選択した結合パートナーは、同じ立体構造を備える場合の親受容体とほぼ等しい親和性（すなわち、典型的には２から３倍以内）又はより高い親和性でＧＰＣＲ変異体に結合する。アゴニスト立体構造変異体に関しては、当該変異体は、典型的には親ＧＰＣＲと同じか又はより高い親和性でアゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合し、典型的には親ＧＰＣＲと同じか又はより低い親和性でアンタゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合する。アンタゴニスト立体構造変異体についても同様に、当該変異体は、典型的には親ＧＰＣＲと同じか又はより高い親和性でアンタゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合し、典型的には親ＧＰＣＲと同じか又はより低い親和性でアゴニスト立体構造特異的結合パートナーに結合する。
【００２４】
ＧＰＣＲの特定の立体構造に対する又は特定のＧＰＣＲに対する結合パートナーの選択性及びK_dの計算は、当該技術分野でよく知られた結合アッセイを用いて及び、例えば、以下に記載するように決定してよい。典型的には、K_d値は、各種の化合物濃度での結合親和性を測定する、膜における従来のＧＰＣＲアッセイを使用して計算される。適切なアッセイの例は、表面プラズモン共鳴アッセイ、及び当該技術分野でよく知られており、以下に記載する競合アッセイを含む。
【００２５】
典型的には、本態様において使用するＧＰＣＲ変異体は、以下に記載する方法のいずれかを使用して選択され、調製される。
【００２６】
親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を提供する工程

親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体は、以下に記載する方法によって、並びにＰＣＴ出願ＷＯ　２００８／１１４０２０号及びＰＣＴ／ＧＢ２００８／００４０３２号に開示されている方法の任意のものによって提供されてよい。
【００２７】
方法１

増大した安定性を有するＧタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）変異体を選択するための方法は、

（ａ）親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、
（ｂ）親ＧＰＣＲが特定の立体構造を備えている際に前記ＧＰＣＲに結合するリガンドを選択する工程、
（ｃ）前記選択したリガンドの結合に関する親ＧＰＣＲの安定性と比較して、前記ＧＰＣＲ変異体又はその各々が前記リガンド結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、並びに
（ｄ）前記選択したリガンドの結合に関して、親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程
を含む。
【００２８】
本発明者は、生物学的に有意義な形態（すなわち、薬理学的に有用な形態）におけるＧ

ＰＣＲの結晶化可能性を改善するために、前記タンパク質の安定性を増大するだけではなく、前記タンパク質が特定の立体構造にある際に増大した安定性を有することが望ましいと解している。前記立体構造は、選択したリガンドによって決定され、生物学的に有意義な立体構造、特に薬理学的に有意義な立体構造である。かくして、前記選択方法は、特定の立体構造の増大した安定性を有するＧＰＣＲの変異体を選択するための方法であると解されてよく、例えば、それらは増大した熱安定性の立体構造を有してもよい。前記方法を使用して、安定な立体構造が固定されたＧＰＣＲを変異誘発によって作製してよい。選択されたＧＰＣＲ変異体は、より高い割合のものが特定の立体構造の状態である点で、親分子よりも純度が高い形態である。したがって、この立体構造に選択的に結合する１つ又は複数のリガンドを使用することによって他の立体構造から分離される当該受容体立体構造の慎重な選択は、前記選択方法の重要な特徴である。前記方法は、より結晶化に供しやすいＧＰＣＲ変異体を選択するための方法であると解されてもよい。これは、分子の集団内での低い均一性又は高い多面作用が結晶化にとって好ましくなく、さらに、特定分子の立体構造の数が多いことも結晶化には不利に働くことがよく知られているからである。

【００２９】

かくして、増大した安定性を有するＧタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）変異体を選択するための更なる方法は、

（ａ）親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、

（ｂ）親ＧＰＣＲが特定の立体構造を備えている際に前記ＧＰＣＲに結合するリガンドを選択する工程、

（ｃ）前記選択したリガンドの結合に関する同じ特定の立体構造を備えた親ＧＰＣＲの安定性と比較して、前記ＧＰＣＲ変異体又はその各々が、特定の立体構造を備えている際に、前記リガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、並びに

（ｄ）前記選択したリガンドの結合に関して、親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程

を含む。

【００３０】

Hopkins &Groom (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1, 727-730 による新薬の開発につながるようなゲノムのレヴューにおいて、表１には、その多数がＧＰＣＲであるタンパク質ファミリーの一覧が含まれている。Overington et al (2006) Nature Rev. Drug Discovery 5, 993-996 は、薬剤標的のより詳細な記載を提供しており、図１は、四分の一超の現在の薬剤がＧＰＣＲを標的とすることを示している。経口薬の１８６種の全標的のうち、５２種のＧＰＣＲ標的が存在する。

【００３１】

本発明において使用するのに適切なＧＰＣＲは、β－アドレナリン受容体、アデノシン受容体、特に、アデノシンA_{2a}受容体、及びニューロテンシン受容体（ＮＴＲ）を含むが、それらに限らない。他の適切なＧＰＣＲは当該技術分野においてよく知られており、上述のHopkins & Groom (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1, 727-730に挙げられているものを含む。加えて、International Union of Pharmacologyは、ＧＰＣＲの一覧を作成しており（参照によって本明細書に取り込むFoord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288、当該一覧は、http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForwardにおいて定期的に更新されている）。ＧＰＣＲは、それらのアミノ酸配列の類似性に基づいて、各種の異なる種類に分類されることに注意されるであろう。それらは、それらが結合する天然のリガンドによるファミリーにも分類される。全てのＧＰＣＲが本発明の範囲に含まれる。

【００３２】

多数のＧＰＣＲのアミノ酸配列（及びそれらをコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列）は、例えばＧｅｎＢａｎｋを参照することによって、容易に利用可能である。特に、Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288は、Entrez Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)に由来するヒトの遺伝子記号並びにヒト、マウス、及びラットの遺伝子

ＩＤを挙げている。ヒトゲノムの配列は実質的に完全であるため、ヒトＧＰＣＲのアミノ酸配列は、そこから推定し得ることに注意すべきである。

【００３３】

ＧＰＣＲは任意の起源に由来してよいが、真核生物起源に由来することが特に好ましい。哺乳類又は鳥類などの脊椎動物に由来することは特に好ましい。ＧＰＣＲがラット、マス、ウサギ、若しくはイヌ、又はヒトを除く霊長類若しくはヒト、又はニワトリ若しくはシチメンチョウに由来することが特に好ましい。誤解を避けるために、「由来する」の意味には、ｃＤＮＡ又は遺伝子がその起源に由来する遺伝子材料を用いて元々得られたが、タンパク質がその後に任意の宿主細胞において発現されてよいことを含める。かくして、真核生物のＧＰＣＲ（鳥類又は哺乳類のＧＰＣＲ）が、大腸菌などの原核生物の宿主細胞で発現されてよいが、場合によって、鳥類又は哺乳類由来であると解されることは明らかである。

【００３４】

ある場合においては、ＧＰＣＲは、２以上の異なるサブユニットからなってよい。例えば、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体は、その生理学的なリガンド結合特性を獲得するために、一回膜貫通ヘリックスタンパク質（ＲＡＭＰ１）の結合を必要とする。ＧＰＣＲと結合して機能的な複合体を形成又は調節するエフェクタータンパク質、付属タンパク質、補助タンパク質、又はＧＰＣＲ相互作用タンパク質は当該技術分野においてよく知られており、例えば、受容体キナーゼ、Ｇタンパク質、及びアレスチンを含む（Bockaert et al (2004) Curr Opinion Drug Discov and Dev 7, 649-657）。

【００３５】

親ＧＰＣＲの変異体は、任意の適切な方法で生産されてよく、任意の適切な形態で提供されてよい。かくして、例えば、親タンパク質の全て又は一部における各アミノ酸残基が独立に他のアミノ酸残基に変換された、親タンパク質の一連の特定の変異体が作製されてよい。例えば、膜を貫通していると予測されるタンパク質の部分に変異を作製することが好都合であってよい。ロドプシンの三次元構造は既知であり（Li et al (2004) J Mol Biol 343, 1409-1438; Palczewski et al (2000) Science 289, 739-745）、当該構造を使用してあるＧＰＣＲのモデルを作製することが可能である。かくして、簡便には、ＧＰＣＲの変異させる部分は、モデルに基づくものであってよい。同様に、疎水性に基づいてＧＰＣＲの膜貫通領域のモデルを作製するコンピュータープログラムを利用することも可能であり（Kyle & Dolittle (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132）、タンパク質の変異させる部分を選択する際にその様なモデルを使用してよい。従来の部位指向性変異導入を使用してよく、又は当該技術分野においてよく知られたポリメラーゼ連鎖反応に基づく手法を使用してよい。望ましいものではないが、タンパク質変異体の選択にリボソームディスプレイ法が使用されてもよい。

【００３６】

典型的には、選択された各アミノ酸をＡｌａに置き換える（すなわち、Ａｌａスキャニング変異誘発）が、任意の他のアミノ酸に置き換えてもよい。選択したアミノ酸がＡｌａである場合は、好都合には、Ｌｅｕによって置き換えてもよい。代替的には、前記アミノ酸はＧｌｙに置き換えてもよく（すなわち、Ｇｌｙスキャニング変異誘発）、これは、特定の立体構造にあるタンパク質を固定化してよい隣接するヘリックスのより近接したパッキングを可能にする。選択されたアミノ酸がＧｌｙである場合は、好都合には、Ａｌａによって置き換えてよい。

【００３７】

特定の位置における所定のアミノ酸を置き換えるのに使用されるアミノ酸は、典型的には天然のアミノ酸、特に「コード可能な」アミノ酸であるが、非天然アミノ酸（この場合、典型的には、タンパク質は、化学合成又は非天然アミノ酸アシルｔＲＮＡを使用して作製される）であってよい。「コード可能な」アミノ酸は、ｍＲＮＡの翻訳によってポリペプチドに取り込まれるものである。非天然アミノ酸を作製し、又は、例えば、タンパク質の翻訳後修飾若しくは半合成によって共有結合性の化学修飾によって所定の位置に非ペプ

チド結合を導入することが可能である。これらの翻訳後修飾は、リン酸化、糖鎖付加、又はパルミトイル化などの天然のものであるか又は合成若しくは生合成によるものであってよい。

【００３８】

代替的には、前記変異体は、タンパク質全体又はその選択した一部に対するものであってよいランダム変異誘発法によって生産されてよい。ランダム変異誘発法は当該技術分野でよく知られている。

【００３９】

好都合には、前記ＧＰＣＲ変異体は、親タンパク質と比較して、１つの置き換わったアミノ酸を有する（すなわち、１つのアミノ酸部位において変異を有する）。このように、単独のアミノ酸を置き換えることによる安定性に対する寄与が評価されてよい。しかしながら、安定性について評価されるＧＰＣＲ変異体は、親タンパク質と比較して２以上、例えば、２、３、４、５、又は６つの置き換わったアミノ酸を有してもよい。

【００４０】

以下により詳細に議論しているように、変異の組み合わせが、本発明の選択方法の結果に基づいて為されてよい。幾つかの特定の態様では、１つの変異を有するタンパク質における変異の組み合わせが、安定性における更なる向上を誘導することが認められた。かくして、前記選択方法は、例えば、当該方法を実施して安定性を増大する単一の変異を同定し、当該方法の工程（ａ）において提供される１つのＧＰＣＲ変異体においてそれらの同定した変異を組み合わせることによって、繰り返し使用してよいと解されるであろう。かくして、多数の変異を有するタンパク質変異体が、本発明の方法を使用して選択されてよい。

【００４１】

親ＧＰＣＲは、天然のタンパク質である必要はない。好都合には、大腸菌などの適切な宿主生物中で発現することが可能な遺伝子操作を受けたものであってよい。例えば、実施例１に記載の、好都合に操作したシチメンチョウβ－アドレナリン受容体は、切断されており、アミノ酸配列の１～３３残基を欠失している（すなわち、βAR_{34-424}）。親ＧＰＣＲは、天然のタンパク質の切断型であるか（一方又は両方の末端が切断されている）、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよい。代替的又は付加的に、親ＧＰＣＲは、天然のＧＰＣＲと比較して、例えば、可溶性、タンパク質分解安定性を改善するために修飾されてよい（例えば、切断、ループの欠失、グリコシル化部位の変異、又はシステインなどの反応性アミノ酸側鎖の変異）。いずれにしても、親ＧＰＣＲは、天然のＧＰＣＲに結合することが既知のものである、選択したリガンドに結合することが可能なタンパク質である。好都合には、親ＧＰＣＲは、適当なリガンドを加えて、Ｇタンパク質活性化によって影響を受けることが一般的に知られている１つ又は複数の下流の活性の任意のものに作用してよい。

【００４２】

しかしながら、前記変異体の安定性は、安定性における増大を評価できるため、親と比較されると解されるであろう。

【００４３】

特定の立体構造を備えている親ＧＰＣＲに結合するリガンドが選択される。典型的には、前記リガンドは、親ＧＰＣＲの１つの立体構造に結合する（そして、前記ＧＰＣＲに当該立体構造をとらせる）が、ＧＰＣＲが採用し得ない他の立体構造に強力に結合することはない。かくして、前記リガンドの存在は、ＧＰＣＲが特定の立体構造をとらせることを促進すると解されてよい。かくして、本発明の方法は、生物学的に有意義な立体構造（例えば、リガンド結合状態）に捕らわれ、当該立体構造でより安定であるＧＰＣＲ変異体を選択する方法であると解されてよい。

【００４４】

好ましくは、ＧＰＣＲが工程（ｃ）で備える特定の立体構造が、工程（ｂ）で選択されるリガンドの種類と対応する。

【００４５】
好ましくは、前記選択されるリガンドはアゴニストに分類されるリガンド由来のものであり、前記特定の立体構造はアゴニスト立体構造であるか、又は前記選択されるリガンドはアンタゴニストに分類されるリガンド由来のものであり、前記特定の立体構造はアンタゴニスト立体構造である。
【００４６】
好ましくは、前記選択されるリガンドはアゴニストに分類されるリガンドに由来し、ＧＰＣＲが工程（ｃ）で備える特定の立体構造がアゴニスト立体構造である。
【００４７】
好ましくは、受容体変異体に対する前記選択されるリガンドの結合親和性は、野生型の受容体に対するもの以上であり、選択されるリガンドに対して顕著に低減した結合を示す変異体は、典型的には、除外される。
【００４８】
「リガンド」によって、本願では、ＧＰＣＲに結合し、且つ、ＧＰＣＲに特定の立体構造をとらせる任意の分子が含まれる。好ましくは、前記リガンドは、ＧＰＣＲ分子全体の半分超に特定の立体構造をとらせるものである。
【００４９】
多数の適切なリガンドが既知である。
【００５０】
典型的には、前記リガンドは完全なアゴニストであり、ＧＰＣＲに結合することが可能であり、例えば、Ｇ－タンパク質結合、下流のシグナル伝達現象、又は血管拡張などの生理学的なアウトプットによって測定される、完全な（１００％の）生物学的応答を誘導することが可能である。かくして、典型的には、前記生物学的応答は、関連するエフェクター経路の刺激後のＧ－タンパク質におけるＧＤＰ／ＧＴＰ交換である。前記測定は、典型的には、ＧＤＰ／ＧＴＰ交換又はその経路の最終産物（例えば、ｃＡＭＰ、ｃＧＭＰ、又はリン酸イノシトール）のレベルにおける変化である。前記リガンドは、部分的アゴニストであり、ＧＰＣＲに結合することが可能であり、部分的（＜１００％）な生物学的応答を誘導することが可能である。
【００５１】
前記リガンドは、受容体に結合する分子であり、その基礎的な（すなわち、アゴニストによって刺激されていない）活性を場合によっては０にまでも低減する逆アゴニストであってもよい。
【００５２】
前記リガンドは、受容体に結合し、アゴニストの結合を阻害して、生物学的応答を妨げるアンタゴニストであってもよい。逆アゴニスト及び部分的アゴニストは、あるアッセイ条件下では、アンタゴニストとなり得る。
【００５３】
上記リガンドは、オルトステリック（orthosteric）であってよく、これは、それらが内在性アゴニストと同じ部位に結合するという意味を含む。または、それらはアロステリック（allosteric）又はアロトピック（allotopic）であってよく、これは、それらがオルトステリック部位と異なる部位に結合するという意味を含む。上記リガンドはシントピック（syntopic）であってよく、これは、それらが同じ又は重複する部位で他のリガンドと相互作用するという意味を含む。それらは、可逆的又は非可逆的であってよい。
【００５４】
アンタゴニストに関しては、サーマウンタブル（surmountable）であってよく、これは、アゴニストの最大の効果が、アンタゴニストを用いた事前処理又は同時処理によって低減されないという意味を含み；或いは、それらはインサーマウンタブル（insurmountable）であってよく、これは、アゴニストの最大の効果が、アンタゴニストの事前処理又は同時処理のいずれかによって低減されるという意味をふくみ；或いは、それらはニュートラル（neutral）であってよく、これは、アンタゴニストが逆アゴニスト又は部分的アゴニ

スト活性を有しないものであるという意味を含む。典型的には、アンタゴニストは、逆アゴニストでもある。

【００５５】

前記選択方法に使用するリガンドは、ポジティブアロステリックモジュレータ、ポテンシエーター、ネガティブアロステリックモジュレータ、及びインヒビターなどのアロステリックモジュレータであってもよい。それらは、それら自体でアゴニスト又は逆アゴニストとしての活性を有してよく、又はそれらはアゴニスト又は逆アゴニストの存在下でのみ活性を有してよく、その場合には、ＧＰＣＲと結合するためにその様な分子と組み合わせて使用される。

【００５６】

参照によって本明細書に取り込むNeubig et al (2003) Pharmacol. Rev. 55, 597-606は、各種のリガンドを開示している。

【００５７】

好ましくは、上述のリガンドは、低分子の有機又は無機成分であるが、ペプチド又はポリペプチドであってよい。典型的には、前記リガンドが低分子の有機又は無機成分である際は、５０から２０００、１００から１０００など、例えば、１００から５００のM_rを有する。

【００５８】

典型的には、前記リガンドは、ｍＭからｐＭ、例えばμＭ（マイクロモーラー）からｎＭの範囲のK_dでＧＰＣＲに結合する。一般的には、最も低いK_dを有するリガンドが好ましい。

【００５９】

有機低分子のリガンドは、当該技術分野においてよく知られており、例えば、以下の実施例を参照のこと。他の低分子のリガンドは、５ＨＴ１Ａ受容体において完全なアゴニストである５ＨＴ；５ＨＴ１Ａ受容体に部分的なアゴニストであるエルトプラジン（Newman-Tancredi et al (1997) Neurophamacology 36, 451-459参照）；ドーパミンＤ２受容体アゴニストである（＋）－ブタクラモール及びスピペロン（Roberts & Strange (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 34-42参照）；並びにＣＢ２のニュートラルアゴニストであるＷＩＮ５５２１２－３（Savinainen et al (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 636-645 ）を含む。

【００６０】

前記リガンドは、ペプチドミメティック、核酸、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、又はアプタマーであってよい。Na^+又はZn^{2+}などのイオン、オレアミドなどの脂質、又はヘパリンなどの炭水化物であってもよい。

【００６１】

前記リガンドは、ＧＰＣＲに結合するポリペプチドであってよい。そのようなポリペプチド（オリゴペプチド含む）は、典型的には、M_r５００からM_r５０，０００のであるが、それより大きいものであってもよい。前記ポリペプチドは、天然のＧＰＣＲ相互作用タンパク質又はＧＰＣＲと相互作用する他のタンパク質又はその誘導体若しくは断片であってよいが、特定の立体構造にあるＧＰＣＲに選択的に結合するものである。ＧＰＣＲ相互作用タンパク質は、シグナル伝達と関連するもの及び輸送に関連するものを含み、多くの場合においては、ＧＰＣＲのＣ末端部分のＰＤＺドメインを介して作用する。

【００６２】

あるＧＰＣＲに結合することが既知のポリペプチドは、Ｇタンパク質、アレスチン、ＲＧＳタンパク質、Ｇタンパク質受容体キナーゼ、ＲＡＭＰ、１４－３－３タンパク質、ＮＳＦ、ペリプラキン、スピノフィリン、ＧＰＣＲキナーゼ、レセプターチロシンキナーゼ、イオンチャンネル又はそのサブユニット、アンキリン、並びにＳｈａｎｋｓ又はＨｏｍｅｒタンパク質の任意のものを含む。他のポリペプチドは、ＮＭＤＡ受容体サブユニットＮＲ１又はＮＲ２ａ、カルシオン、又はフィブロネクチンドメインフレームワークを含む。前記ポリペプチドは、フィブリン－１などのＧＰＣＲの細胞外ドメインに結合するもの

であってよい。前記ポリペプチドは、ヘテロオリゴマーにおいて選択したＧＰＣＲを結合する他のＧＰＣＲであってよい。ＧＰＣＲにおけるタンパク質－タンパク質相互作用のレヴューは、参照によって本明細書に取り込むMilligan & White (2001) Trends Pharmacol. Sci. 22, 513-518 又はBockaert et al (2004) Curr. Opinion Drug Discov. Dev. 7, 649-657 において認められる。

【００６３】

ポリペプチドリガンドは、好都合には、ＧＰＣＲに結合する抗体であってよい。用語「抗体」によって、本願では、天然であるか又は部分的に若しくは完全に合成によって生成されたかにかかわらず、免疫グロブリンが含まれる。例としては、免疫グロブリンアイソタイプ及びそれらのアイソタイプサブクラス、並びにモノクローナル抗体及びＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）及びダイアボディ（diabody）などの抗原結合ドメインを含むそれらの断片が含まれる。ラクダ科の動物の抗体及びラクダ科の抗体であって遺伝子操作したものも挙げられてよい。ＧＰＣＲに結合するその様な分子は当該技術分野において既知であり、任意に、既知の技術を使用して作製されてよい。適切な抗体は、立体構造エピトープを認識する傾向があるため、ＧＰＣＲに対するラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）で現在使用されているものである。

【００６４】

前記ポリペプチドは、アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラトリオペプチドリピートタンパク質、又は設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰ）などのモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質、或いはリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトγクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールド（affilin scaffold）であってもよい。

【００６５】

前記選択方法の１つの実施態様では、前記リガンドはＧＰＣＲに共有結合し、例えば、Ｇタンパク質又はアレスチン融合タンパク質などである。幾つかのＧＰＣＲ（例えば、トロンビン受容体）は、プロテアーゼによってＮ末端で切断され、新しいＮ末端はアゴニスト部位と結合する。かくして、その様なＧＰＣＲは天然のＧＰＣＲ－リガンド融合体である。

【００６６】

抗体又は他の「ユニバーサルな」結合ポリペプチド（例えば、多数の異なるＧＰＣＲに結合することが既知のＧタンパク質）の使用は、天然のリガンド及び低分子リガンドが未知の「オーファン」ＧＰＣＲに対する本発明の方法の使用において特に有利であり得ると解されるであろう。

【００６７】

一度リガンドが選択されると、当該選択したリガンドの結合に関して親ＧＰＣＲと比較して、前記ＧＰＣＲ変異体又はその各々が、前記リガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かが測定される。当該工程（ｃ）は、選択したリガンドによって決定される特定の立体構造について、前記ＧＰＣＲ変異体又はその各々が（親と比較して）増大した安定性を有するか否かを測定するものである。かくして、前記ＧＰＣＲ変異体は、選択したリガンド結合の間に測定されるか又はリガンド結合によって測定される、選択したリガンドの結合の結合に関して増大した安定性を有する。以下に記載するように、増大した安定性が、選択したリガンドの結合の間に評価されることが好ましい。

【００６８】

増大した安定性は、好都合には、不安定にする可能性がある曝露条件下（例えば、熱、強力な界面活性剤条件、及びカオトロピック剤など）における、前記変異体の寿命の延長によって測定される。前記曝露条件下における不安定化は、典型的には、変性又は構造の損失の測定によって測定される。以下に記載するように、これは、リガンド結合能の損失又は二次若しくは三次構造の指標の損失によって現れる。

【００６９】

以下の図１２（特に好ましい実施態様を記載する）に関して記載するように、ＧＰＣＲ変異体の安定性を測定するために使用してよい各種のアッセイ形式が存在する。

【００７０】

１つの実施態様では、前記ＧＰＣＲ変異体を、当該変異体の安定性を測定する方法に供する前にリガンドと接触させる（前記ＧＰＣＲ変異体及びリガンドは、試験の間に接触した状態のままである）。かくして、例えば、本発明の方法が、１つの立体構造においてリガンドと結合し、且つ、改善された熱安定性を有するＧＰＣＲ変異体を選択するために使用される際は、前記受容体を、加熱される前に前記リガンドと接触させ、次いで、加熱後に前記受容体に結合しているリガンドの量を使用して、親受容体との比較における熱安定性を表わしてよい。これによって、変性条件（例えば、熱）に曝露した後にリガンド結合能を保持しているＧＰＣＲの量の測定が提供され、これが安定性の指標である。

【００７１】

代替的（であるが上記のものよりは好ましいものではない）実施態様では、前記ＧＰＣＲ変異体を、前記リガンドと接触させる前に、前記変異体の安定性を測定する手法に供する。かくして、例えば、本発明の方法が、１つの立体構造においてリガンドと結合し、且つ、改善された熱安定性を有する膜受容体変異体を選択するために使用される際は、前記リガンドと接触させる前に、まず前記受容体を加熱し、次いで、前記受容体に結合したリガンドの量を使用して熱安定性を表わしてよい。そして、これによって、変性条件に曝露した後にリガンド結合能を保持しているＧＰＣＲの量の測定が提供される。

【００７２】

双方の実施態様において、前記変異体の安定性の比較が、同一の条件下における親分子を参照することによって為されると解されるであろう。

【００７３】

これらの実施態様の双方において、選択された変異体は、親タンパク質と比較して、特定の立体構造を備える際に増大した安定性を有するものである。

【００７４】

好ましい経路は、特定のＧＰＣＲに依存し、リガンドの非存在下におけるタンパク質のとり得る立体構造の数に依存するであろう。図１２に記載の実施態様では、所望の立体構造が選択される可能性を増大するため、リガンドが加熱工程の間に存在することが好ましい。

【００７５】

したがって、前記選択方法は、増大した熱安定性を有するＧＰＣＲ変異体を選択するための方法であって、（ａ）親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、（ｂ）前記親ＧＰＣＲに結合するアンタゴニスト又はアゴニストを選択する工程、（ｃ）前記アンタゴニスト又はアゴニストの存在下において、特定の温度で特定の時間の後にＧＰＣＲ変異体の前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストへの結合能を測定することによって、前記変異体又はその各々が親ＧＰＣＲと比較して増大した熱安定性を有するか否かを測定する工程、及び（ｄ）同一の条件下における親ＧＰＣＲよりも、特定の温度で特定の時間の後に前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストのより多くと結合するＧＰＣＲ変異体を選択する工程を含む方法を包含すると解されるであろう。工程（ｃ）では、特定の温度における一定の期間が、典型的には、前記選択したアンタゴニスト又はアゴニストと結合するＧＰＣＲ変異体の能力の測定において使用される。工程（ｃ）では、典型的には、選択した前記アンタゴニスト又はアゴニストの結合が当該温度で一定期間の間に５０％低減する（５０％の受容体が不活化されていることを示す：「見かけ上の」Ｔｍ）温度及び時間が選択される。

【００７６】

好都合には、前記リガンドを使用してＧＰＣＲをアッセイする（すなわち、前記アッセイを使用して非変性状態であるか否かを測定する）際は、前記リガンドは可視的に標識、例えば、放射標識又は蛍光標識される。他の実施態様では、リガンド結合は、二次検出系、例えば、抗体又は検出部位に共有結合する他の高親和性結合パートナー、例えば、比色

分析において使用されてよい酵素（例えば、アルカリホスファターゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ）を使用して、未結合のリガンドの量を測定することによって評価されてよい。ＦＲＥＴ法が使用されてもよい。その安定性の測定においてＧＰＣＲ変異体をアッセイするために使用するリガンドは、前記方法の工程（ｂ）において選択されるものと同じリガンドである必要はないと解されるであろう。

【００７７】

リガンド結合能を非変性タンパク質の存在の指標として使用して、親ＧＰＣＲ及びＧＰＣＲ変異体の安定性を測定することが好都合であるが、他の方法が当該技術分野で知られている。例えば、内在するトリプトファン蛍光の使用又は１－アニリノ－８－ナフタレンスルホネート（ＡＮＳ）などの外来性の蛍光プローブの使用のいずれかによる、蛍光スペクトルにおける変化が、アンフォールディングの感度の良好な指標であってよく、例えば、Ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ（商標）法（Mezzasalma et al, J Biomol Screening, 2007, Apr;12(3):418-428）において説明されている。タンパク質分解に対する安定性、質量分析器によって測定される重水素／水素交換、Ｂｌｕｅ Ｎａｔｉｖｅ Ｇｅｌ、キャピラリーゾーン電気泳動、円偏光二色性（ＣＤ）分光法、及び光散乱を使用して、二次又は三次構造と関連するシグナルの損失によってアンフォールディングを測定してよい。しかしながら、これらの方法の全てが、それらを使用する前に、適度な量（例えば、高いｐｍｏｌ／ｎｍｏｌ量）で精製されたタンパク質を必要とするが、実施例に記載の方法は、ｐｍｏｌ量の本質的に未精製のＧＰＣＲを使用する。

【００７８】

好ましい実施態様では、工程（ｂ）において、各々の存在がＧＰＣＲに同一の特定の立体構造を備えさせる、２又はそれ以上の同じ種類のリガンドを選択する。かくして、当該実施態様において、同じ種類の１つ又は複数の（天然又は非天然）リガンド（例えば、完全なアゴニスト又は部分的アゴニスト又はアンタゴニスト又は逆アゴニスト）が使用されてよい。平行して又は連続的に当該方法に同じ種類の多数のリガンドを含めることによって、例えば結合部位において親と実質的に異なるが、代償的変化によって依然としてリガンドに結合することが可能な多数の変性を有する受容体の立体構造を、思わず遺伝子操作及び選択する理論的なリスクが最小化される。以下：

１．例えば結合分析、機能分析、又は分光分析によって根拠付けられる共通の薬理学的分類を有する、化学的に異なるリガンドのセット（例えば、ｎ＝２から５）を選択する工程（これらのリガンドは、例えば野生型受容体及び／又は変異型受容体を使用する競争結合試験並びに／或いはそれらが共通のファーマコフォアを表わす必要は無いが分子モデリングによって根拠付けられるように、受容体の共通の空間的領域に結合すると解されるべきである）；

２．安定性を増大することが意図される１つ又は複数の受容体変異体を作製し、リガンドセットの全てを使用してタイト結合についてアッセイする工程（前記アッセイは、平行、多重、又は連続的に為されてよい）；

３．例えば、各リガンドについての結合等温線の測定によって、及びリガンドを用いた安定性のシフトの測定によって（典型的には、野生型と比較してウィンドウが狭い）、安定化された受容体変異体の確実性を確認する工程を使用して当該リスクを軽減してよい。

【００７９】

変異による結合部位に対する影響によって生じる見掛けの親和性における変化に対する監視のために、好ましくは、同じ薬理学的分類を有するが、異なる化学的分類を有するリガンドを使用して、受容体をプロファイルするべきである。典型的には、これらによって、異なる分子認識特性を有するが、同様の親和性におけるシフト（変異体ｖｓ親、例えば野生型）が示されるべきである。結合実験は、好ましくは、同じ薬理学的分類内の標識リガンドを使用して実施するべきである。

【００８０】

それにもかかわらず、同じ薬理学的分類内のリガンドの複数の化学的分類に特異的な立体構造基質が存在する可能性があり、これらは、その手法において、選択したリガンドの

化学的分類に依存して特異的に安定化される可能性があることが認識されるべきである。

【００８１】

典型的には、前記選択したリガンドは、親ＧＰＣＲに対する結合と同様の作用強度でＧＰＣＲ変異体に結合する。典型的には、ＧＰＣＲ変異体及び親ＧＰＣＲに対する特定のリガンド結合についてのK_d値は、互いに５から１０倍、例えば、２から３倍の範囲である。典型的には、親ＧＰＣＲと比較してＧＰＣＲ変異体に対するリガンドの結合は、最大で５倍弱く、最大で１０倍強いであろう。

【００８２】

典型的には、選択された立体構造で安定化された受容体変異体は、親受容体と同程度（典型的には、２から３倍以内）又はそれ以上の親和性で選択したリガンドに結合するはずである。アゴニスト－立体構造変異体について、前記変異体は、典型的には、親ＧＰＣＲと同じ又はそれ以上の親和性で前記アゴニストと結合し、典型的には、親ＧＰＣＲと同定又はそれ以下の親和性でアンタゴニストと結合する。同様に、アンタゴニスト－立体構造変異体について、前記変異体は、典型的には、親ＧＰＣＲと同じ又はそれ以上の親和性でアンタゴニストと結合し、典型的には、親ＧＰＣＲと同じ又はそれ以下の親和性でアゴニストと結合する。

【００８３】

選択するリガンドについての親和性における顕著な低減（典型的には２から３倍超）を示す変異体は、典型的には除外する。

【００８４】

典型的には、同じ分類を有する一連のリガンドの結合の序列は同程度であるが、当該序列において１つ又は２つの逆転が存在する可能性があり、あるいは一連のリガンドに異常値が存在する可能性がある。

【００８５】

更なる実施態様では、同じ立体構造の受容体に結合する２つ又はそれ以上のリガンド、例えば、アロステリックモジュレータ及びオルトステリックアゴニストを使用してよい。

【００８６】

誤解を避けるために、また、実施例から明らかなように、効果的な方法に多数のリガンドを使用することが必要なわけではない。

【００８７】

更なる実施態様では、選択したリガンドに結合することが可能であるが、第一のリガンドとは異なる分類のものである第二の選択したリガンドには結合できないか又は親ＧＰＣＲより弱く結合するＧＰＣＲ変異体を選択することも有利であってよい。かくして、例えば、ＧＰＣＲ変異体は、選択したアンタゴニストの結合に関して増大した安定性を有するものであることに基づいて選択されるものであってよいが、その様に選択されたＧＰＣＲ変異体を更に試験して、完全なアゴニストに結合するか（又は親ＧＰＣＲよりも弱く完全なアゴニストに結合するか）否かを測定する。完全なアゴニストに結合しない（又は結合が低減する）変異体が選択される。このように、１つの特定の立体構造に固定化されているＧＰＣＲを更に選択する。

【００８８】

選択されたリガンド（本発明の方法の工程（ｂ）で選択したもの）及び上述の更なる（第二の）リガンドが、リガンドの種類の任意のペア、例えば、完全なアゴニストとアンタゴニスト；アンタゴニストと逆アゴニスト；逆アゴニストとアンタゴニスト；逆アゴニストと完全なアゴニスト；及び完全なアゴニストと逆アゴニストなどであってよい。

【００８９】

前記受容体変異体が、更なる（第二の）リガンドに対する親受容体の親和性の５０％未満の親和性、より好ましくは１０％未満、更に好ましくは１％未満又は０．１％未満又は０．０１％未満の親和性で更なる（第二の）リガンドに結合することが好ましい。かくして、前記受容体変異体と第二のリガンドとの相互作用のK_dは、親受容体よりも高い。実施例１に示すように、βアドレナリン受容体変異体であるβＡＲ－ｍ２３（アンタゴニス

トを使用して当該選択方法によって選択される）は、その親よりも３桁弱くアゴニストに結合する（すなわち、K_dが１０００倍以上）。同様に、実施例２では、アデノシンＡ２ａ受容体変異体であるＲａｎｔ２１が、親よりも２から４桁弱くアゴニストに結合する。

【００９０】

このタイプの対抗選択を使用して、より特異的（及び、そのため、より迅速且つより効率的）に変異誘発法を、リガンドによって決まる純粋な立体構造に対する経路に沿って管理することが可能であるため有用である。

【００９１】

好ましくは、ＧＰＣＲ変異体は、構造の完全性を維持している適切な可溶化形態で提供され、機能的形態である（例えば、リガンドに結合することが可能である）。特定のタンパク質について有効な当業者に選択されてよい適当な可溶化系、例えば、適切な界面活性剤（又は他の両親媒性剤）及び緩衝液系を使用する。典型的には、使用してよい界面活性剤は、例えば、ドデシルマルトシド（ＤＤＭ）又はＣＨＡＰＳ又はオクチルグルコシド（ＯＧ）又は他の多数の界面活性剤を含む。コレステロールヘミスクシネート若しくはコレステロール自体又はヘプタン－１，２，３－トリオールなどの他の化合物を含めることも好都合であってよい。グリセロール又はプロリン又はベタインの存在は有用であってよい。ＧＰＣＲは、一度膜から可溶化されると、アッセイするために十分に安定である必要があることは重要である。幾つかのＧＰＣＲについては、ＤＤＭは十分であるが、望ましい場合には、グリセロール又は他のポリオールを添加して、アッセイのための安定性を増大させてよい。さらなるアッセイのための安定性は、任意にグリセロールの存在下において、例えば、ＤＤＭ、ＣＨＡＰＳ、及びコレステロールヘミスクシネートの混合物に可溶化することによって達成されてよい。特に不安定なＧＰＣＲについては、ジギトニン又はアンフィポール（amphipol）或いは従来の界面活性剤の非存在下において膜から直接ＧＰＣＲを可溶化することが可能であり、顕著な数の脂質をＧＰＣＲに結合させた状態のままとすることによって典型的に安定性を維持する他のポリマーを使用して可溶することが望ましい。機能的な形態の非常に不安定な膜タンパク質を可溶化するために、ナノディスク（nanodisc）を使用してもよい。

【００９２】

典型的には、ＧＰＣＲ変異体は、（例えば、大腸菌などの前記変異体を発現させた宿主細胞由来の膜画分の）粗抽出物で提供される。タンパク質変異体が、典型的には少なくとも７５％、より典型的には少なくとも８０％、又は８５％、又は９０％、又は９５％、又は９８％、又は９９％のサンプル中に存在するタンパク質を占める形態で提供されてよい。言うまでもなく、典型的には、上述のように可溶化され、多くの場合にＧＰＣＲ変異体は界面活性剤及び／又は脂質分子と相互作用する。

【００９３】

任意の変性又は変性条件に対して、例えば、熱、界面活性剤、カオトロピック剤、又は極端なｐＨのいずれか１つ又は複数に対して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体が選択される。

【００９４】

熱に対する安定性（すなわち、熱安定性）に関して、これは、リガンド結合を測定することによって、或いは特定の温度における蛍光、ＣＤ、又は光散乱などの分光学的方法によって容易に測定することが可能である。典型的には、ＧＰＣＲがリガンドに結合する際は、特定の温度においてリガンドに結合するＧＰＣＲの能力を使用して、前記変異体の熱安定性を測定してよい。「見かけのT_m」、すなわち、５０％の受容体が所定の条件下で所定の時間（例えば、３０分）に亘ってインキュベートした後に、不活化される温度を測定することも好都合であり得る。より高い熱安定性のＧＰＣＲ変異体は、それらの親と比較してより大きな見かけのT_mを有する。

【００９５】

界面活性剤又はカオトロピックに対する増大した安定性に関しては、典型的には、前記ＧＰＣＲを、試験界面活性剤又は試験カオトロピック剤の存在下において所定の時間に亘

ってインキュベートして、例えば、リガンド結合又は上述の分光学的方法を使用して安定性を測定する。

【００９６】

極端なｐＨに関しては、典型的な試験ｐＨは、例えば、４．５から５．５（低ｐＨ）の範囲又は８．５から９．５（高ｐＨ）の範囲で選択されるであろう。

【００９７】

比較的強力な界面活性剤を結晶化の段階で使用するため、ＧＰＣＲ変異体がその様な界面活性剤の存在下において安定であることが好ましい。ある界面活性剤の「強力」さは、ＤＤＭ、C_{11}→C_{10}→C_9→C_8マルトシド又はグルコシド、ラウリルジメチルアミンオキシド（ＬＤＡＯ）及びＳＤＳの順である。ＧＰＣＲ変異体がC_9マルトシド又はグルコシド、C_8マルトシド又はグルコシド、ＬＤＡＯ、及びＳＤＳのいずれかに対して良い安定であることが特に好ましく、そのため、これらの界面活性剤を安定性試験に使用することが好ましい。

【００９８】

測定の容易性のため、熱安定性を測定することが好ましく、所定の条件に関して親タンパク質と比較して増大した熱安定性を有する変異体を選択する。熱は変性剤としての作用を有し、サンプルを冷却すること、例えば、氷上に置くことで容易に取り除くことが可能であると解されるであろう。熱安定性は、他の変性剤又は変性条件に対する安定性の指針でもある可能性がある。かくして、増大した熱安定性は、変性界面活性剤、特にＤＤＭよりも変成作用が強いもの、例えば、より小さな頭部基及びより短いアルキル鎖並びに／又は荷電した頭部基を有する界面活性剤中の安定性に置き換えられる可能性がある。本発明者は、熱安定性を有するＧＰＣＲが強力な界面活性剤に対してもより安定であることを発見した。

【００９９】

変性条件として極端なｐＨを使用する際は、中和剤を添加することによって迅速にこれを取り除くことができると解されるであろう。同様に、カオトロピック剤を変性剤として使用する際は、カオトロピック剤がカオトロピック効果を奏する濃度未満にサンプルを希釈することによって、変性効果を除去し得る。

【０１００】

当該選択方法の特定実施態様では、ＧＰＣＲはβ－アドレナリン受容体（例えば、シチメンチョウ由来）であり、リガンドは、アンタゴニストであるジヒドロアルプレノロール（ＤＨＡ）である。

【０１０１】

当該選択方法の更なる好ましい実施態様では、ＧＰＣＲがアデノシンA_{2a}受容体（A_{2a}Ｒ）（例えば、ヒト由来）であり、リガンドが、アンタゴニストであるＺＭ２４１３８５（４－［２－［［７－アミノ－２－（２－フリル）［１，２，４］－トリアゾロ［２，３－α］［１，３，５］トリアジン－５－イル］アミノ］エチル］フェノール）又はアゴニストであるＮＥＣＡ（５’－Ｎ－エチルカルボキサミドアデノシン）である。

【０１０２】

当該選択方法のさらに好ましい実施態様では、ＧＰＣＲはニューロテンシン受容体（ＮＴＲ）（例えば、ラット由来）であり、リガンドが、アゴニストであるニューロテンシンである。

【０１０３】

方法２

上記のように選択したＧＰＣＲ変異体を調製するための方法は、

（ａ）上述したＧＰＣＲ変異体を選択する方法を実施する工程、

（ｂ）増大した安定性について選択された１つ又は複数のＧＰＣＲ変異体中の１つ又は複数の変異したアミノ酸残基の位置を同定する工程、及び

（ｃ）同定した位置の１つ又は複数に変異を含むＧＰＣＲ変異体を合成する工程

を含む。

【０１０４】

実施例において認められるように、驚くべきことに、ＧＰＣＲの内部の単独のアミノ酸に対する変化が、前記タンパク質が特定の立体構造を備える条件下おいて、親タンパク質と比較して前記タンパク質の安定性を増大させる。かくして、本発明の第二の態様に係る方法の第一の実施態様では、親タンパク質の１つのアミノ酸残基がタンパク質変異体では変化している。典型的には、前記アミノ酸残基は、本発明の第一の態様に係る方法において試験した変異体において認められるアミノ酸残基に変化される。しかしながら、任意の他のアミノ酸残基、例えば、任意の天然アミノ酸残基（特に、「コード可能な」アミノ酸残基）又は非天然アミノ酸に置き換えられてよい。一般的には、簡便にするために、アミノ酸残基は、１９の他のコード可能なアミノ酸の１つに置き換えられる。好ましくは、上述の選択方法において選択した変異体に存在する置き換えられたアミノ酸残基である。

【０１０５】

実施例で認められるように、安定性における更なる増大が、親タンパク質のアミノ酸の２つ以上を置き換えることによって得られてよい。典型的には、置き換えられたアミノ酸の各々が、上述の選択方法を使用して同定されたものである。典型的には、同定された各アミノ酸は、タンパク質変異体に存在するアミノ酸に置き換えられてよいが、上述のように、それは任意の他のアミノ酸で置き換えられてもよい。

【０１０６】

典型的には、ＧＰＣＲ変異体は、親タンパク質と比較して、１から１０の置き換えられたアミノ酸、好ましくは１から８、典型的には２から６、例えば、２、３、４、５、又は６の置き換えられたアミノ酸を含む。

【０１０７】

多数の変異体が、本発明の第一の態様に係る選択方法に供されてよいと解されるであろう。換言すると、多数の変異体が当該選択の工程（ａ）で提供されてよい。その立体構造が非常に安定な多重点変異タンパク質を作製するために選択された、多数の変異誘発されたＧＰＣＲが作製されてよいと解されるであろう。

【０１０８】

ＧＰＣＲ変異体は任意の適切な方法によって調製されてよい。好都合には、前記タンパク質変異体は、適切な核酸分子にコードされ、適切な宿主細胞において発現される。前記ＧＰＣＲ変異体をコードする適切な核酸分子は、当該技術分野でよく知られている標準的なクローニング技術、部位特異的突然変異誘発法、及びＰＣＲを用いて作製されてよい。適切な発現系は、細菌又は酵母における構成的又は誘導性の発現系、バキュロウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、及びレンチウイルスなどのウイルス発現系、又は昆虫若しくは哺乳動物細胞における一過性トランスフェクションを含む。適切な宿主細胞は、大腸菌、乳酸連鎖球菌、サッカロミセスセレビシアエ、スキゾサッカロミセスポンベ、ピチアパストリス、スポドプテラフルギペルダ、及びトリコプルシアニ細胞を含む。適切な動物宿主細胞は、ＨＥＫ２９３、ＣＯＳ、Ｓ２、ＣＨＯ、ＮＳＯ、及びＤＴ４０などを含む。幾つかのＧＰＣＲは、機能するために特定の脂質（例えば、コレステロール）を必要とする。その場合には、脂質を含む宿主細胞を選択することが望ましい。加えて又は代替的に、前記脂質は、前記タンパク質変異体の単離及び精製の間に添加してもよい。これらの発現系及び宿主細胞は、当該選択方法の工程（ａ）におけるＧＰＣＲ変異体について使用してもよいと解されるであろう。

【０１０９】

遺伝子及びｃＤＮＡのクローニング及び操作のため、ＤＮＡを変異させるため、及び宿主細胞においてポリヌクレオチドからポリペプチドを発現させるための分子生物学的方法が、参照によって本明細書に取り込む「Molecular cloning, a laboratory manual”, third edition, Sambrook, J. &Russell, D.W. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 」に例示されているように、当該技術分野においてよく知られている。

【０１１０】
本発明の第一又は第二の態様の更なる実施態様では、選択又は調製したＧＰＣＲ変異体がＧタンパク質に結合することが可能であるか否かを測定してもよいと解される。前記選択又は調製したＧＰＣＲ変異体が、親ＧＰＣＲと同程度の広がり及び／又は親和性の順位で、選択したリガンドと同じ分類の複数のリガンドに結合することが可能であるか否かを測定することも好ましい。
【０１１１】
方法３
実施例１から３に示し、且つ上述したように、熱安定化変異は、シチメンチョウβ１アドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、ラットニューロテンシン受容体、及びヒトムスカリン受容体の配列全体に広く分布する。図１７は、ヒトβ－２ＡＲの配列を有するこれらの配列のアラインメントを提供し、熱安定化変異が前記配列に位置する際に、全部で７０のうち１１例において、２つの配列が同じ位置に変異を含有している（図１７において星印で示す）。かくして、１つ又は複数の安定化変異が１つのＧＰＣＲで同定されると、増大した安定性を有する更なるＧＰＣＲを、ＧＰＣＲのアミノ酸配列アラインメント及び対応する１つ又は複数の位置で１つ又は複数の変異を作製することによって産生されてよい。この概念は、シチメンチョウβ１－ｍ２３の６つの熱安定化変異がヒトβ２受容体に直接転用した図２６に明確に例示されている。結果として得られた変異体であるβ２－ｍ２３は、ヒトβ２受容体よりも１２℃高いＴｍを有していた。
【０１１２】
従って、親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を製造するための更なる方法は、
（ｉ）第一の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異のアミノ酸配列において、１つ又は複数の変異体が第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、１つ又は複数の位置を同定する工程、及び
（ｉｉ）対応する１つ又は複数の位置において、第二のＧＰＣＲを規定するアミノ酸配列に１つ又は複数の変異を作製し、第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第二の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程
を含む。
【０１１３】
第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体は、上述した選択又は調製方法に従って選択又は調製されてよい。したがって、この方法を、変異誘発により安定で立体構造が固定されたＧＰＣＲを作製するために使用してもよい。例えば、特定の立体構造における増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体の選択の後に、安定化変異を同定し、第二のＧＰＣＲの対応する位置のアミノ酸が置き換えられ、第二の親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を製造することが可能である。
【０１１４】
誤解を避けるために言及すると、第一の親ＧＰＣＲは、天然の配列を有するＧＰＣＲであってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。
【０１１５】
典型的には、１つ又は複数の変異体が第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、１つ又は複数の位置を同定することは、例えば、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗプログラム（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４）を使用して、それらのアミノ酸配列を親ＧＰＣＲの配列とアラインメントすることを伴う。
【０１１６】
「対応する１つ又は複数の位置」によって、例えば、ＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣｌｕｓｔａｌ Ｗを使用して、第一の及び第二のＧＰＣＲがアラインメントによって比較される

際に、第一のＧＰＣＲのアミノ酸配列における位置に整列（アライン）する第二のＧＰＣＲのアミノ酸配列における位置を含む。例えば、図１７におけるアラインメントで示すように、シチメンチョウβ１－ｍ２３における６つの安定化変異であるR68S，M90V，Y227A，A282L，F327A 、及びF338Mが、ヒトβ２受容体における残基であるK60，M82，Y219，C265，L310 、及びF321の各々に対応する位置である。

【０１１７】

第二のＧＰＣＲのアミノ酸配列における対応する１つ又は複数の位置を同定して、それらの位置のアミノ酸を他のアミノ酸で置き換える。典型的には、前記アミノ酸は、第一の親ＧＰＣＲの変異体における対応する位置のアミノ酸を置き換えたものと同じアミノ酸で置き換えられる（但し、それらのアミノ酸が既にその残基に存在する場合を除く）。例えば、シチメンチョウβ１－ｍ２３の６８位では（Ｒ６８Ｓ）、アルギニン残基がセリン残基で置き換えられている。したがって、ヒトβ２受容体の対応する位置である６０位（Ｋ６０）において、リジン残基が好ましくはセリン残基で置き換えられる。

【０１１８】

変異は、例えば、上述のように、且つ、当該技術分野においてよく確立された技術を使用して、アミノ酸配列において作製されてよい。

【０１１９】

第二のＧＰＣＲは任意の他のＧＰＣＲであってよいと解されるであろう。例えば、１つの種に由来するＧＰＣＲにおける安定化変異は、他の種に由来する第二のＧＰＣＲに転用してよい。同様に、１つの特定のＧＰＣＲアイソフォームにおける安定化変異は、異なるアイソフォームである第二のＧＰＣＲに転用してよい。好ましくは、第二の親ＧＰＣＲは、第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲの分類又はファミリーのものである。系統発生解析は、タンパク質配列の類似性に基づいて、ＧＰＣＲを３つの主な分類、すなわち、クラス１、２、及び３に分けており、それらのフェノタイプはロドプシン、セレクチンレセプター、及びメタボトロピックグルタメート受容体の各々である（Foord et al (2005)Pharmacol. Rev. 57, 279-288）。かくして、第二のＧＰＣＲは、第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲの分類のＧＰＣＲであってよい。同様に、ＧＰＣＲは、グルタメート及びＧＡＢＡなどの天然のリガンドによってファミリーに分類されている。かくして、第二のＧＰＣＲは、第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲファミリーのものであってよい。ＧＰＣＲの分類及びファミリーの一覧は、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｏｎ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ（Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288）によって作成されており、その一覧はhttp://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForwardで定期的に更新されている。

【０１２０】

第二の親ＧＰＣＲは、第一のＧＰＣＲにおける変異の対応する位置を第二のＧＰＣＲにおいて決定し得るように、第一の親ＧＰＣＲと整列（アライン）することが可能でなくてはならないと解されるであろう。かくして、典型的には、第二の親ＧＰＣＲは、前記第一の親ＧＰＣＲに対して少なくとも２０％の配列同一性を有し、より好ましくは第一の親ＧＰＣＲに対して少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％の配列同一性を有する。しかしながら、幾つかのＧＰＣＲは、低い配列同一性を有しており（例えば、ファミリーＢ及びＣのＧＰＣＲ）、同時に構造においては非常に似ている。かくして、２０％の配列同一性のしきい値は絶対的なものではない。

【０１２１】

方法４

本発明者は、増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体における１つ又は複数の変異が存在する構造モチーフの同定が、増大した安定性を有する更なるＧＰＣＲ変異体を製造するのに有用であろうと考えた。

【０１２２】

したがって、親Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）と比較して増大した安定性を有

するＧＰＣＲ変異体を製造するための更なる方法は、
ａ．第一の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供する工程、
ｂ．１つ又は複数の変異体が第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有する、１つ又は複数の構造モチーフを構造膜タンパク質モデルにおいて同定する工程、及び
ｃ．第二の親ＧＰＣＲにおける１つ又は複数の対応する構造モチーフを規定するアミノ酸配列における１つ又は複数の変異を作製し、第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第二の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異を提供する工程
を含む。

【０１２３】
１つ又は複数の既知の構造モデルにおいて安定化変異をマッピングすることを使用して、その様な安定化変異を有する特定の構造モチーフを同定してよい。本発明者は、その様なモチーフを同定するために、β２－アドレナリン受容体の構造モデルに対してβ１アドレナリン受容体の安定化変異をマッピングした（Rasmussen et al (2007) Nature 450, 383-387; Cherezov et al (2007) Science 318:1258-65; Rosenbaum et al (2007) Science 318:1266-1273）。例えば、表（ｖｉ）は、本発明者がヒトβ２－アドレナリン受容体に対してマッピングしたシチメンチョウβ１－アドレナリン受容体変異体を挙げており、それらが存在する対応する構造モチーフを記載している。実施例４に記載のように、Ｙ２２７Ａ変異（ヒトβ_2受容体のＹ２１９に対応する）のヒトβ_2アドレナリン受容体に対するマッピングは、変異がヘリックス界面におけるパッキングを改善し得るように、ヘリックス間の界面に位置することを明らかにする（実施例１５、１６、及び２３参照）。同様に、Ｍ９０Ｖ変異（ヒトβ_2受容体におけるＭ８２に対応する）のヒトβ_2－受容体に対するマッピングは、ヘリックスが折れ曲がる（キンク）部分でヘリックス２に変異が存在することを明らかにする（図１５、１６、及び２０参照）。他の変異は、脂質二重膜、疎水性－親水性境界領域、タンパク質結合ポケット、及びループ領域に向いている膜貫通ヘリックス表面を含む更なる構造モチーフに存在することが認められた（表（ｖｉ）及び図１８－１９、２１－２２、及び２４－２５）。

【０１２４】
その様な構造モチーフは、安定化変異を含有することによって、タンパク質の安定性の決定に重要である。したがって、これらのモチーフを変異の標的とすることは、安定化ＧＰＣＲ変異体の産生を容易にするであろう。事実、同じ構造モチーフに２以上の変異がマップされた複数の例が存在する。例えば、シチメンチョウβ１アドレナリン受容体Ｙ２２７Ａ、Ｖ２３０Ａ、及びＡ２３４Ｌ変異は、同じヘリックス界面にマップされ、Ｖ８９Ｌ及びＭ９０Ｖ変異は同じヘリックスの折れ曲がり（キンク）にマップされ、Ｆ３２７Ａ及びＡ３３４Ｌ変異は脂質二重膜に向いた同じヘリックス表面にマップされた（表（ｖｉ））。かくして、１つの安定化変異が同定された際は、変異が存在する構造モチーフの決定は、更なる安定化変異の同定を可能にするであろう。

【０１２５】
第一の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体は、上述した方法の任意のものに従って選択又は調製されてよい。したがって、この方法を、変異誘発により安定で立体構造が固定されたＧＰＣＲを作製するために使用してもよい。例えば、特定の立体構造における増大された安定性を有するＧＰＣＲ変異体の選択の後に、その様な安定化変異が存在する構造モチーフを同定してよい。他のＧＰＣＲにおいて、対応する構造モチーフを規定するアミノ酸配列における１つ又は複数の変異を作製することが、次いで、親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大された安定性を有するＧＰＣＲ変異体を製造するために使用されてよい。

【０１２６】
本発明者は、ヒトβ－２ＡＲ、ラットＮＴＲ１、シチメンチョウβ－１ＡＲ、ヒトアデノシンＡ２ａＲ、及びヒトムスカリンＭ１受容体のアミノ酸配列（図１７）の多重配列ア

ラインメントを実施し、同定された熱安定化変異（実施例１から３）が前記配列に存在する際は、全部で７０のうち１１例において、２つの配列が同じ位置で変異を有していることが示されている（図１７において星印で示す）。いずれかの理論につなげることを意図しないが、本発明者は、これらの位置の熱安定化変異は、構造膜タンパク質モデルにマッピングするための促進された転用可能性を有するものであるはずである。かくして、１つの実施態様では、第一の親ＧＰＣＲの変異体は、対応する親受容体と比較した際に、図１７に記載のヒトβ２ＡＲの番号付けした以下の位置：Ala 59, Val 81, Ser 143, Lys147, Val 152, Glu 180, Val 222, Ala 226, Ala 271, Leu 275 及びVal 317の任意の１つ又は複数に対応する位置で異なるアミノ酸を有する、ヒトβ－２ＡＲ、ラットＮＴＲ１、シチメンチョウβ－１ＡＲ、ヒトアデノシンＡ２ａＲ、又はヒトムスカリンＭ１受容体である。

【０１２７】

１つ又は複数の構造モチーフを同定するために、安定化変異を膜タンパク質の既知の構造にマッピングする。

【０１２８】

「膜タンパク質」によって、細胞又はオルガネラの膜に結合又は接合するタンパク質を意味する。好ましくは、前記膜タンパク質は、膜に持続的に組み込まれ、脂質二重層を物理的に破壊する界面活性剤、非極性溶媒、又は変性剤を用いてのみ除去され得る内在性膜タンパク質である。

【０１２９】

膜タンパク質の構造モデルは任意の適切な構造モデルであってよい。例えば、前記モデルは、既知の結晶構造であってよい。ＧＰＣＲ結晶構造の例は、ウシロドプシン（Palczewski, K. et al., Science289, 739-745. (2000)）及びヒトβ２アドレナリン受容体（Rasmussen et al, Nature 450, 383-7 (2007); Cherezov et al (2007) Science 318:1258-65; Rosenbaum et al (2007) Science 318:1266-1273）を含む。ヒトβ２アドレナリン受容体構造の座標は、RCSB Protein Data Bankにおいて2rh1, 2r4r 及び2r4sの登録番号で認められる。代替的には、構造モデルは、ホモロジーに基づくか又はｄｅ ｎｏｖｏ構造予測法を使用して、コンピューターによって生成されるモデルであってよい（Qian et al Nature (2007) 450: 259-64）。

【０１３０】

所定のＧＰＣＲ変異体の安定化変異は、ＧＰＣＲに対して十分な構造類似性を有する任意の膜タンパク質の構造モデルにマッピングされてよい。特に、膜タンパク質のドメインは、転用可能な所定の変異について、安定化変異が存在するＧＰＣＲドメインに対して十分な構造類似性を有する。

【０１３１】

タンパク質ドメインは、典型的には、単独のタンパク質として単独で存在するか又は他のドメインとの組み合わせにおける大きなタンパク質の一部であってよい二次構造要素の個別的に折りたたまれた集合として規定される。一般的には、機能的な進化単位である。

【０１３２】

ＧＰＣＲは本質的には大きなＮ末端ドメインを有するものを除く単独のドメインタンパク質である。したがって、典型的には、その構造モデルは、ＧＰＣＲに対して十分な類似性を有する少なくとも１つのドメインを含む膜タンパク質のものである。

【０１３３】

構造類似性は、配列同一性の分析によって間接的に又は構造の比較によって直接的に決定されてよい。

【０１３４】

配列同一性に関しては、変異体が第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有するＧＰＣＲドメインをコードするアミノ酸配列を、構造モデルが利用可能な膜タンパク質のドメインをコードするアミノ酸配列と整列（アライン）する。これらの配列の１つ又は複数は、主要保存ドメインに加えて、挿入配列又はＮ末端若しくはＣ

末端伸長を含有してよい。最適なアラインメントのために、その様な配列は、分析を歪めないように除外する。問題のドメインに亘る十分な配列同一性を有する膜タンパク質を、次いで、変異をマッピングするための構造モデルとして使用してよい。可溶性タンパク質ドメインについては、それらの３Ｄ構造は、配列同一性が増大すると１００％まで増大する構造保存のレベルとともに、約２０％の配列同一性で広範に保存されており、良好には３０％超の同一性で保存されていることが示されている（Ginalski,K. Curr Op Struc Biol (2006) 16, 172-177）。かくして、構造膜タンパク質モデルが、第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を含有するＧＰＣＲドメイン変異体と少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％、さらに好ましくは少なくとも９５％又は９９％の配列同一性を共有するドメインを含有する膜タンパク質のモデルである。

【０１３５】

配列同一性は、ＢＬＡＳＴ又はＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ（Altschul et al, NAR (1997), 25, 3389-3402）などのアルゴリズム又はHidden Markov Models (Eddy S et al, J Comput Biol (1995) Spring 2 (1)9-23)に基づく方法を使用して測定してよい。典型的には、２つのポリペプチドの間の配列同一性の％は、任意の適切なコンピュータープログラム、例えば、University of Wisconsin Genetic Computing GroupのＧＡＰプログラムを使用して測定してよく、配列が最適に整列（アライン）されたポリペプチドに関して同一性の％を計算すると解されるであろう。そのアラインメントは、代替的には、ＣｌｕｓｔａｌＷプログラムを使用して実施されてよい（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４）。使用するパラメータは、以下：Fast pairwise alignment parameters: K-tuple(word) size; 1, window size; 5, gap penalty; 3, number of top diagonals; 5. Scoring method: x percent. Multiple alignment parameters: gap open penalty; 10, gap extension penalty; 0.05. Scoring matrix: BLOSUMのものであってよい。

【０１３６】

配列同一性に加えて、構造類似性が、構造モデルの比較によって直接的に決定されてよい。構造モデルを使用して、配列中で連続的であるか又はそうでなくてよい、配列分析のみからは明らかでない構造類似領域を検出してよい。例えば、ファミリーＢ及びＣのＧＰＣＲは類似した構造を共有すると解されているが、それらの配列同一性は非常に低い。同様に、水輸送アクアポリンであるホウレンソウＳｏＰｉｐ２、大腸菌ＡｑｐＺ、メタノコッカスＡｑｐＭ、ラットＡｑｐ４、ヒトＡｑｐ１、及びヒツジＡｑｐ０は、低い配列同一性を共有しているが、それら全ては類似した構造を有する。

【０１３７】

高い忠実性の構造モデルが、構造が相同的なタンパク質の既知の構造に基づいてモデルを作製するＭＯＤＥＬＬＥＲ（Sali A and Blundell T, J Mol Biol (1993) 234(3) 779-815 ）などの標準的なソフトウェアパッケージを使用して未知の構造のタンパク質について作製されてよい。その様なモデリングは、配列同一性の増大とともに改善する。典型的には、未知の構造の配列と既知の３Ｄ構造の配列との間の配列同一性は、３０％超である（Ginalski,K. Curr Op Struc Biol (2006) 16, 172-177）。加えて、配列のみに基づくｄｅ ｎｏｖｏ構造予測法を使用して、未知の構造のタンパク質のモデルを作製してよい（Qian et al, (2007) Nature 450:259-64）。構造を実験的に測定又はモデリングによって導き出すと、構造類似領域が、２以上の３Ｄ構造の直接的な比較によって検出されてよい。それらは、例えば、ＤＡＬＩ（Holm, L and Sander, C (1996) Science 273, 595-603）などのソフトウェアを使用して検出可能な特定の構造及びトポロジーといった二次的な構造要素を含んでよい。それらは、アミノ酸側鎖及びポリペプチド主鎖の局所的な配列、特定の空間配置における原子の特定のセット若しくは原子のグループを含んでよく、例えば、グラフ理論的表現を使用して検出されてもよい(Artymiuk,P et al, (2005) J Amer Soc Info Sci Tech 56 (5) 518-528)。この手法において、比較するタンパク質又はタンパク質の領域内の原子又は原子のグループが、典型的には、ノードの間の角度及び間隔を表示するグラフのエッジとともにグラフのノードとして表わされる。これらのグラフにお

ける共通のパターンは、共通の構造モチーフを示す。この手法が拡張されて、水素結合ドナー若しくはアクセプター、疎水性、形状、電荷、又は芳香性などの原子又は原子のグループの任意の記述子を含んでよく、例えば、ＧＲＩＤ及び類似性調査のための基礎として使用される当該表示を使用して、その様な記述子にしたがってタンパク質が空間的にマッピングされてよい。前記方法、ソフトウェアの利用可能性、及び使用者の規定するパラメータ、しきい値、及び許容値の選択のためのガイドラインの説明は上述の参考文献に記載している。

【０１３８】

好ましい実施態様では、構造膜タンパク質モデルは構造ＧＰＣＲモデルである。ＧＰＣＲの構造モデルは、第一の親ＧＰＣＲのモデルであってよいと解されるであろう。例えば、増大された安定性を有するＧＰＣＲ変異体内の安定化変異は、第一の親ＧＰＣＲ構造及びその様な変異が存在する構造モチーフに直接マッピングされてよい。第一の親ＧＰＣＲの構造が未知である場合は、他のＧＰＣＲの構造モデルを使用してよい。例えば、１つの種に由来するＧＰＣＲの安定化変異は、他の種に由来する同じＧＰＣＲの既知の構造モデルにマッピングされてよい。同様に、１つの特定のＧＰＣＲアイソフォームにおける安定化変異は、他のＧＰＣＲアイソフォームの既知の構造モデルにマッピングされてよい。さらに、１つのＧＰＣＲに由来する安定化変異は、同じ分類又はファミリーの他のＧＰＣＲにマッピングしてよい。ＧＰＣＲの分類及びファミリーの一覧は、International Unionof Pharmacology (Foord et al (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288) によって作成されており、当該一覧は、http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForwardで定期的に更新されている。

【０１３９】

上述のように、構造モデルが、ＧＰＣＲ変異体が第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸を有するドメインに亘って十分な構造類似性を有する任意のＧＰＣＲのものであってよいと解されるであろう。かくして、ＧＰＣＲが、第一の親ＧＰＣＲと比較して少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を含有するタンパク質ドメインに亘って、第一の親ＧＰＣＲの変異体と少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％、さらに好ましくは少なくとも９５％又は９９％の配列同一性を共有することが好ましい。しかしながら、発明者は、２０％の配列同一性のしきい値は絶対的なものではないと認識している。第一の親ＧＰＣＲに対して２０％未満の配列同一性を有するＧＰＣＲは、低い配列同一性が他の類似性、例えば、第一の親ＧＰＣＲと比較して同じ配列モチーフの存在、同じG－タンパク質に対する結合、又は同じ機能を有すること、或いは同じ疎水性親水性指標のプロットを有することによって相殺される場合に、安定化変異が転用される構造モデルとしても役に立ち得る。

【０１４０】

構造モデルに対する安定化変異のマッピングは、当該技術分野において既知の適切な任意の方法を使用して実施されてよい。例えば、典型的には、構造モデルが利用可能なＧＰＣＲのアミノ酸配列を、第一の親ＧＰＣＲの変異体のアミノ酸配列と整列（アライン）する。第一の親ＧＰＣＲと関係する、ＧＰＣＲ変異体の少なくとも１つの異なるアミノ酸残基の１つ又は複数の位置は、構造モデルが利用可能なＧＰＣＲのアミノ酸配列に存在してよい。

【０１４１】

「構造モチーフ」によって、熱安定化変異のＧＰＣＲ構造モデルにおける位置の三次元的記載を含める。例えば、構造モチーフは、ＧＰＣＲの内部の任意の二次又は三次構造モチーフであってよい。「三次構造モチーフ」によって、水素結合ドナー若しくはアクセプター、疎水性、形状、電荷、又は芳香性などの原子又は原子のグループの任意の記述子を含める。例えば、タンパク質は、ＧＲＩＤ及び構造モチーフを規定するための基礎として使用される当該表示を使用してその様な記述子にしたがって空間的にマッピングされてよい（Baroni et al (2007) J Chem Inf Mod 47, 279-294）。

【０１４２】

表（ｖｉ）は、安定化変異が存在することが認められるシチメンチョウβ１アドレナリン受容体の構造モチーフを挙げている。表から認められるように、変異は多数の異なる位置に存在している。３つの変異が、水性溶媒に接近可能であることが予測されるループ領域に存在する。８つの変異が、膜貫通α－ヘリックスに存在し、脂質二重層に向いており；これらの変異のうち３つが、ヘリックスの末端近辺であり、疎水性－親水性境界層にあると解されてよい。８つの変異は、膜貫通α－ヘリックスの間にあり、そのうち３つはヘリックスの折れ曲げられた（キンクされた）又は歪められた領域のいずれかに存在し、他の２つの変異は１つのヘリックスに存在するが、変異残基に対する空間に近接した折れ曲がり（キンク）を含む１つ又は複数の他のヘリックスと近接していると認められる。これらの後者の変異は、折れ曲がり（キンク）領域内のアミノ酸のパッキングに作用し、熱安定性を生じさせ得る。他の変異は基質結合ポケットに存在する。

【０１４３】

したがって、１つの実施態様では、構造モチーフは、ヘリックス界面、ヘリックス折れ曲がり（キンク）、ヘリックス折れ曲がり（キンク）の逆のヘリックス、脂質二重層に向いたヘリックス表面、疎水性－親水性境界層における脂質二重層に向いたヘリックス表面、ループ領域、又はタンパク質結合ポケットのいずれかである。

【０１４４】

安定化変異が存在する構造モチーフの同定は、タンパク質安定性におけるモチーフの重要性を示唆する。したがって、対応する１つ又は複数の構造モチーフを規定するアミノ酸配列における１つ又は複数の変異の作製は、第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する第二の親ＧＰＣＲの１つ又は複数の変異体を提供するはずである。

【０１４５】

構造モチーフを規定するアミノ酸配列は、タンパク質の二次又は三次構造において結合して構造モチーフを形成する、アミノ酸残基の一次アミノ酸配列である。その様な一次アミノ酸配列が連続的又は非連続的なアミノ酸残基を含んでよいと解されるであろう。かくして、構造モチーフを規定するアミノ酸配列の同定は、関与する残基を決定し、配列を実質的に規定することを伴うであろう。変異は、例えば、上述のように、当該技術分野においてよく確立された技術を使用して、アミノ酸配列において作製されてよい。

【０１４６】

「対応する１つ又は複数の構造モチーフ」によって、第二の親ＧＰＣＲに存在する構造モデルにおいて同定される一つ又は複数の類似構造モチーフを意味する。例えば、ヘリックス界面を同定する場合には、第二の親ＧＰＣＲにおける対応するヘリックス界面は、構造モデルに存在するヘリックスに類似するヘリックスの間の界面であろう。ヘリックスの折れ曲がり（キンク）を同定した場合には、対応するヘリックスの折れ曲がり（キンク）は、構造モデルに存在する折れ曲がった（キンク）ヘリックスに類似するヘリックスにおける折れ曲がり（キンク）であろう。第二の親ＧＰＣＲにおける１つ又は複数の類似する構造モチーフは、例えば配列アラインメントによって、構造モデルにおける１つ又は複数のモチーフを規定する第二の親ＧＰＣＲの配列中の類似のアミノ酸配列を検索することによって同定されてよい。さらに、コンピューターに基づくアルゴリズムは、当該技術分野において広く利用可能であり、アミノ酸配列に基づくタンパク質モチーフの存在の予測に使用されてよい。かくして、アミノ酸配列内の特定のモチーフの相対的な位置及び他のモチーフに関連する位置に基づいて、類似する構造モチーフが容易に同定されてよい。第二の親ＧＰＣＲの構造モデルが利用可能である場合に、類似する１つ又は複数の構造モチーフがタンパク質の構造に対して直接マッピングされてよいと解されるであろう。典型的には、類似する構造モチーフを規定するアミノ酸配列は、構造モデルにおいてモチーフを規定する配列と少なくとも２０％、より好ましくは３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、及び９０％、並びにさらに好ましくは９５％及び９９％の配列同一性を有する。

【０１４７】

１つの実施態様では、第二の親ＧＰＣＲは第一の親ＧＰＣＲである。誤解を避けるため

に言及すると、第二の親ＧＰＣＲは、第一の親ＧＰＣＲの天然の配列を有してよく、又は切断型であってよく、又は天然タンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

【０１４８】

代替的な態様において、第二の親ＧＰＣＲは、第一の親ＧＰＣＲではない。例えば、増大した安定性を有する第一の親ＧＰＣＲの変異体が同定されてよいが、増大した安定性を有する異なるＧＰＣＲの変異体を産生することが望ましい。好ましくは、第二の親ＧＰＣＲは、上述の第一の親ＧＰＣＲと同じＧＰＣＲの分類又はファミリーのものである。しかしながら、第二の親ＧＰＣＲが任意の既知のＧＰＣＲであってよいが、第一の親ＧＰＣＲの変異体の安定化変異が存在する対応する構造モチーフを含有するように、第一の親ＧＰＣＲと顕著な構造類似性を共有すると解されるであろう。かくして、典型的には、第二の親ＧＰＣＲが、第一の親ＧＰＣＲと少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％の配列同一性を有する。しかしながら、上述のように、幾つかのＧＰＣＲは、低い配列同一性を有するが（例えば、ファミリーＢ及びＣのＧＰＣＲ）、構造において類似する。かくして、２０％の配列同一性のしきい値は絶対的なものではない。

【０１４９】

増大された安定性についてＧＰＣＲにおいてスクリーニングされ得る数千の変異体が潜在的に存在するため、安定性に対する寄与において重要であることが既知の特定の変異を標的とすることが有利である。したがって、方法３及び４は、増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を選択する方法において使用してよいと解されるであろう。特に、方法３及び４を実施して、安定性の決定に重要な構造モチーフを規定する特定のアミノ酸残基又はアミノ酸配列に対する変異を標的としてよい。

【０１５０】

したがって、１つの実施態様では、方法３及び４は、

（Ｉ）特定の立体構造を備えた第二の親ＧＰＣＲに結合するものであるリガンドを選択する工程、

（ＩＩ）第二の親ＧＰＣＲの変異体又はその各々が、特定の立体構造を備える際に、同じ特定の立体構造を備えている第二の親ＧＰＣＲのリガンド結合についての安定性と比較して、選択したリガンドの結合に関して増大した安定性を有するか否かを測定する工程、及び

（ＩＩＩ）選択したリガンドの結合に関して第二の親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する変異体を選択する工程

をさらに含む。

【０１５１】

工程（Ｉ）、（ＩＩ）、及び（ＩＩＩ）は、上述の方法１の工程（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）に対応することに留意されたい。したがって、リガンド及び安定性を評価する方法は、好ましくは方法１に関して上述しているものである。

【０１５２】

親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有する任意のＧＰＣＲ変異体、例えば、上述した方法１～４のいずれかによって提供されるものを本発明において使用してよい。例えば、親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体、特に増大した熱安定性を有するものを使用してよい。本発明における使用に適したＧＰＣＲ変異体の特定例は以下で提供される。

【０１５３】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、親受容体と比較して、以下の位置:（ｉ）図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる：Ｉｌｅ　５５，Ｇｌｙ　６７，Ａｒｇ　６８，Ｖａｌ　８９，Ｍｅｔ　９０，Ｇｌｙ　６７，Ａｌａ　１８４，Ａｒｇ　１９９，Ａｌａ　２０３，Ｌｅｕ　２０８，Ｇｌｎ　２１０，Ｓｅｒ　２１３，Ｇｌｕ　２１９，Ａｒｇ　２２０，Ｓｅｒ　２２３，Ｔｈｒ　２２４，Ｇｌｎ

２２６，Ｌｙｓ ２２７，Ｈｉｓ ２３０，Ｌｅｕ ２４１，Ｐｒｏ ２６０，Ｓｅｒ ２６３，Ｌｅｕ ２６７，Ｌｅｕ ２７２，Ｔｈｒ ２７９，Ａｓｎ ２８４，Ｇｌｎ ３１１，Ｐｒｏ ３１３，Ｌｙｓ ３１５、（ｉｉｉ）図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる：Ａｌａ ６９，Ｌｅｕ ７２，Ａｌａ ７３，Ａｌａ ８６，Ａｌａ ９０，Ｓｅｒ １００，Ｈｉｓ １０３，Ｓｅｒ １０８，Ｌｅｕ １０９，Ｌｅｕ １１１，Ａｓｐ １１３，Ｉｌｅ １１６，Ａｌａ １２０，Ａｓｐ １３９，Ｐｈｅ １４７，Ａｌａ １５５，Ｖａｌ １６５，Ｇｌｕ １６６，Ｌｙｓ １７６，Ａｌａ １７７，Ｔｈｒ １７９，Ｍｅｔ １８１，Ｓｅｒ １８２，Ａｒｇ １８３，Ｐｈｅ １８９，Ｌｅｕ ２０５，Ｔｈｒ ２０７，Ｇｌｙ ２０９，Ｇｌｙ ２１５，Ｖａｌ ２２９，Ｍｅｔ ２５０，Ｉｌｅ ２５３，Ｌｅｕ ２５６，Ｉｌｅ ２６０，Ａｓｎ ２６２，Ｖａｌ ２６８，Ａｓｎ ２７０，Ｔｈｒ ２７９，Ｍｅｔ ２９３，Ｔｈｒ ２９４，Ｇｌｙ ３０６，Ｌｅｕ ３０８，Ｖａｌ ３０９，Ｌｅｕ ３１０，Ｖａｌ ３１３，Ｐｈｅ ３４２，Ａｓｐ ３４５，Ｔｙｒ ３４９，Ｔｙｒ ３５１，Ａｌａ ３５６，Ｐｈｅ ３５８，Ｖａｌ ３６０，Ｓｅｒ ３６２，Ａｓｎ ３７０，Ｓｅｒ ３７３，Ｐｈｅ ３８０，Ａｌａ ３８５，Ｃｙｓ ３８６，Ｐｒｏ ３８９，Ｇｌｙ ３９０，Ｔｒｐ ３９１，Ａｒｇ ３９２，Ｈｉｓ ３９３，Ａｒｇ ３９５，Ｌｙｓ ３９７，Ｐｒｏ ３９９、及び（ｉｖ）図１７に記載のムスカリン受容体の番号付けによる：Ｌｅｕ ６５、Ｍｅｔ １４５、Ｌｅｕ ３９９、Ｉｌｅ ３８３及びＭｅｔ ３８４の任意の１つ又は複数に対応する位置に、少なくとも１つの異なるアミノ酸を有するＧＰＣＲ変異体である。

【０１５４】

図１７に示すシチメンチョウβ１ＡＲ、ヒトアデノシン受容体、ラットニューロテンシン受容体、及びヒトムスカリン受容体アミノ酸配列のアラインメントは、７０のうちの１１例において、２つの配列が同じ位置、すなわち、図１７に記載のヒトβ２ＡＲの番号付けした以下の位置：Ala 59, Val 81, Ser 143, Lys 147, Val 152, Glu 180, Val 222, Ala 226, Ala 271, Leu 275 及びVal 317に変異を含有することを示す。従って、更なる実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、親受容体と比較して、これらの位置の任意の１つに異なるアミノ酸を有するものである。

【０１５５】

β－アドレナリン受容体変異体

β－アドレナリン受容体は当該技術分野においてよく知られている。それらは互いに配列相同性を共有し、アドレナリンに結合する。

【０１５６】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、対応する野生型のβ－アドレナリン受容体と比較した際に、図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置:Ｉｌｅ ５５，Ｇｌｙ ６７，Ａｒｇ ６８，Ｖａｌ ８９，Ｍｅｔ ９０，Ｇｌｙ ９８，Ｉｌｅ １２９，Ｓｅｒ １５１，Ｖａｌ １６０，Ｇｌｎ １９４，Ｇｌｙ １９７，Ｌｅｕ ２２１，Ｔｙｒ ２２７，Ａｒｇ ２２９，Ｖａｌ ２３０，Ａｌａ ２３４，Ａｌａ ２８２，Ａｓｐ ３２２，Ｐｈｅ ３２７，Ａｌａ ３３４，Ｐｈｅ ３３８の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、β－アドレナリン受容体変異体である。

【０１５７】

β－アドレナリン受容体変異体は、任意のβ－アドレナリン受容体変異体であってよいが、所定のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体アミノ酸配列に参照されるアミノ酸の位置の１つ又は複数において変異されている。

【０１５８】

ＧＰＣＲ変異体が、ＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷ（Thompson et al (1994) Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680）を使用して測定すると、前記所定のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体配列と比較した際に少なくとも２０％アミノ酸配列同一性を有する者であることが特に好ましい。より好ましくは、前記受容体変異体は、少なくとも３０

％、少なくとも４０％、又は少なくとも５０％のアミノ酸配列同一性を有する。一般的に、より高い程度のアミノ酸同一性が、天然のリガンドが結合するオルトステリック（「活性」）部位の付近では保存されている。

【０１５９】

以下の実施例１及び図１に記載のように、親シチメンチョウβ－アドレナリン配列（図９に示す）における以下のアミノ酸残基：Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151,Val 160, Gln 194, Gly 197, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338の個々の置換は、熱安定性の増大を引き起こす。

【０１６０】

かくして、親と比較した際に、これらのアミノ酸残基の１つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているシチメンチョウβ－アドレナリン受容体変異体を使用してよい。親受容体における１つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するβ－アドレナリン受容体変異体も使用してよい。

【０１６１】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、構造モチーフに少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有するβ－アドレナリン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図９に記載のシチメンチョウβ－アドレナリン受容体の番号付けによる以下の位置:Ｉｌｅ　５５，Ｇｌｙ　６７，Ａｒｇ　６８，Ｖａｌ　８９，Ｍｅｔ　９０，Ｇｌｙ　９８，Ｉｌｅ　１２９，Ｓｅｒ　１５１，Ｖａｌ　１６０，Ｇｌｎ　１９４，Ｇｌｙ　１９７，Ｌｅｕ　２２１，Ｔｙｒ　２２７，Ａｒｇ　２２９，Ｖａｌ　２３０，Ａｌａ　２３４，Ａｌａ　２８２，Ａｓｐ　３２２，Ｐｈｅ　３２７，Ａｌａ　３３４，Ｐｈｅ　３３８．のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

【０１６２】

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するβ－アドレナリン受容体であってよく、又はその切断型であってよく、又は天然のタンパク質又はその断片との融合体であってよく、又はリガンド結合能を保持している天然配列と比較して変異を含有してよい。

【０１６３】

「対応するアミノ酸残基」によって、シチメンチョウβ－アドレナリン受容体と他のβ－アドレナリン受容体をＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを使用して比較する際に、シチメンチョウβ－アドレナリン受容体中の所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他のβ－アドレナリン受容体のアミノ酸残基が含まれる。

【０１６４】

図９は、シチメンチョウβ－アドレナリン受容体とヒトβ１、β２、及びβ３－アドレアなリン受容体との間のアラインメントを示す。

【０１６５】

ヒトβ１のＩｌｅ７２はシチメンチョウβ－アドレナリン受容体のＩｌｅ５５と対応し；ヒトβ２のＩｌｅ４７はシチメンチョウβ－アドレナリン受容体のＩｌｅ５５と対応し；ヒトβ３のＴｈｒ５１がシチメンチョウβ－アドレナリン受容体のＩｌｅ５５と対応していることが認められる。ヒトβ１、β２、及びβ３における他の対応するアミノ酸残基は図９を参照して容易に同定することが可能である。

【０１６６】

特定のアミノ酸がＡｌａに置き換えられることが好ましい。しかしながら、特定のアミノ酸残基がＡｌａである際は、Ｌｅｕで置きかえられることが好ましい（例えば、図１におけるシチメンチョウβ－アドレナリン受容体のAla 234、Ala 282、及びAla 334）。

【０１６７】

さらに大きい安定性が与えられる可能性があるため、β－アドレナリン受容体は、２以上のアミノ酸の位置において、親と比較して異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒトβ１受容体変異体は、以下のアミノ酸残基：K85, M107, Y244, A316, F36

1及びF372の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する残基である場合を除く）。

【０１６８】

上述の３又は４又は５又は６の変異の組み合わせを有するヒトβ１受容体変異体を調製する。

【０１６９】

特に好ましいヒトβ２受容体変異体は、以下のアミノ酸：K60，M82，Y219，C265，L310及びF321の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０１７０】

上述の３又は４又は５又は６の変異の組み合わせを有するヒトβ２受容体変異体が好ましい。

【０１７１】

図２６は、β１－ｍ２３における６の熱安定化変異（R68S，M90V，Y227A，A282L，F327A，F338M）は、ヒトβ２受容体に転用して（対応する変異K60S，M82V，Y219A，C265L，L310A，F321M）、ヒトβ２－ｍ２３を作製した際の熱安定性に対する効果を示す。ヒトβ２及びβ２－ｍ２３のＴｍは、２９℃及び４１℃の各々であり、かくして、熱安定化変異を１つの受容体から他の受容体に転用可能であることが例示される。したがって、特に好ましいヒトβ２受容体変異体は、K60S，M82V，Y219A，C265L，L310A，F321Mの変異を含むものである。

【０１７２】

特に好ましいヒトβ３受容体変異体は、以下のアミノ酸：W64，M86，Y224，P284，A330及びF341の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられたものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０１７３】

上述の３又は４又は５又は６の変異の組み合わせを有するヒトβ３受容体変異体が、好ましい。

【０１７４】

特に好ましい変異の組み合わせは、実施例１の表１及び２に詳細に記載しており、適切な変異体は、シチメンチョウβ－アドレナリン受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例１の表１及び２に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている、β－アドレナリン受容体変異体も含む。

【０１７５】

特に好ましい変異体は、シチメンチョウβ－アドレナリン受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸に変異を含有するものである(R68S，Y227A，A282L，A334L)（下記の表２のm6-10参照)；(M90V，Y227A，F338M)（下記の表２のm7-7参照)；(R68S，M90V，V230A，F327A，A334L)（下記の表２のm10-8参照)；及び（R68S，M90V，Y227A，A282L，F327A，F338M)（下記の表２のm23参照)。

【０１７６】

アデノシン受容体変異体

アデノシン受容体は当該技術分野においてよく知られている。それらは互いに配列相同性を共有し、アデノシンに結合する。

【０１７７】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、対応する野生型アデノシンと比較した際に、図１０に記載のヒトアデノシンA_{2a}受容体の番号付けによる以下の位置:Ｇｌｙ１１４，Ｇｌｙ １１８，Ｌｅｕ １６７，Ａｌａ １８４，Ａｒｇ １９９，Ａｌａ

２０３，Ｌｅｕ ２０８，Ｇｌｎ ２１０，Ｓｅｒ ２１３，Ｇｌｕ ２１９，Ａｒｇ ２２０，Ｓｅｒ ２２３，Ｔｈｒ ２２４，Ｇｌｎ ２２６，Ｌｙｓ ２２７，Ｈｉｓ ２３０，Ｌｅｕ ２４１，Ｐｒｏ ２６０，Ｓｅｒ ２６３，Ｌｅｕ ２６７，Ｌｅｕ ２７２，Ｔｈｒ ２７９，Ａｓｎ ２８４，Ｇｌｎ ３１１，Ｐｒｏ ３１３，Ｌｙｓ ３１５，Ａｌａ ５４，Ｖａｌ ５７，Ｈｉｓ ７５，Ｔｈｒ ８８，Ｇｌｙ １１４，Ｇｌｙ １１８，Ｔｈｒ １１９，Ｌｙｓ １２２，Ｇｌｙ １２３，Ｐｒｏ １４９，Ｇｌｕ １５１，Ｇｌｙ １５２，Ａｌａ ２０３，Ａｌａ ２０４，Ａｌａ ２３１，Ｌｅｕ ２３５，Ｖａｌ ２３９の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、アデノシン受容体変異体である。

【０１７８】

アデノシン受容体変異体は任意のアデノシン受容体の変異体であってよいが、所定のヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体アミノ酸配列を参照して記載されるアミノ酸位置の１つ又は複数において変異されている。

【０１７９】

ＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを使用して測定すると、ＧＰＣＲ変異体が所定のヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体配列を比較した際に、少なくとも２０％の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、ＧＰＣＲ変異体は、少なくとも３０％又は少なくとも４０％又は少なくとも５０％又は少なくとも６０％の配列同一性を有する。典型的には、より高い程度の配列保存がアデノシン結合部位に存在する。

【０１８０】

以下の実施例２に記載するように、（図１０に示す）ヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体配列の以下のアミノ酸残基：Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315の個々の置き換えは、アゴニストである５’－Ｎ－エチルカルボキサミドアデノシン（ＮＥＣＡ）を使用して測定した際の熱安定性における増大を引き起こす。

【０１８１】

（図１０に示す）ヒトＡ$_{2a}$受容体配列における以下のアミノ酸残基：Ala 54, Val 57, His 75, Thr88, Gly 114, Gly 118, Thr 119, Lys 122, Gly 123, Pro 149, Glu 151,Gly 152, Ala 203, Ala 204, Ala 231, Leu 235, Val 239の置き換えは、アンタゴニストであるＺＭ ２４１３８５（4-[2-[[7-アミノ-2-(2-フリル) [1,2,4]-トリアゾロ[2,3-α][1,3,5]トリアジン-5-イル]アミノ]エチル]フェノール）を使用して測定した際の熱安定性の増大を引き起こす。

【０１８２】

かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の１つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体変異体を使用してよい。親受容体における１つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するアデノシン受容体変異体も使用してよい。

【０１８３】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、構造モチーフに少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有するアデノシン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図１０に記載のヒトアデノシンＡ$_{2a}$受容体の番号付けによる以下の位置:Ｇｌｙ １１４，Ｇｌｙ １１８，Ｌｅｕ １６７，Ａｌａ １８４，Ａｒｇ １９９，Ａｌａ ２０３，Ｌｅｕ ２０８，Ｇｌｎ ２１０，Ｓｅｒ ２１３，Ｇｌｕ ２１９，Ａｒｇ ２２０，Ｓｅｒ ２２３，Ｔｈｒ ２２４，Ｇｌｎ ２２６，Ｌｙｓ ２２７，Ｈｉｓ ２３０，Ｌｅｕ ２４１，Ｐｒｏ ２６０，Ｓｅｒ ２６３，Ｌｅｕ ２６７，Ｌｅｕ ２７２，Ｔｈｒ ２７９，Ａｓｎ ２８４，Ｇｌｎ ３１１，Ｐｒｏ ３１３，Ｌｙｓ ３１５．のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

【０１８４】

誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するアデノシン受容体であ

ってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。

【０１８５】

「対応するアミノ酸残基」によって、ヒトアデノシン受容体A_{2a}受容体及び他のアデノシン受容体をＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを用いて比較する際に、ヒトアデノシンA_{2a}受容体における所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他のアデノシン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。

【０１８６】

図１０は、ヒトアデノシンA_{2a}受容体及び３種の他のヒトアデノシン受容体（Ａ２ｂ、Ａ３、及びＡ１）の間のアラインメントを示す。

【０１８７】

例えば、A_{2b}受容体（ＡＡ２ＢＲと示されている）におけるＳｅｒ１１５がA_{2a}受容体のＧｌｙ１１４と対応することが認められる。同様に、A_3受容体（ＡＡ３Ｒと示されている）におけるＡｌａ６０がA_{2a}受容体におけるＡｌａ５４に対応することなどが認められる。ヒトアデノシン受容体A_{2b}、A_3、及びA_1における他の対応するアミノ酸残基は、図１０を参照して容易に同定することが可能である。

【０１８８】

親の特定のアミノ酸がＡｌａに置き換わることが好ましい。しかしながら、親の特定のアミノ酸残基がＡｌａである際は、Ｌｅｕで置き換えることが好ましい。

【０１８９】

アデノシン受容体変異体が、２以上のアミノ酸の位置において親と比較して異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒトアデノシンＡ２ｂ受容体は、以下のアミノ酸残基：A55, T89, R123, L236 及びV240の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換わっているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０１９０】

３又は４又は５の上述の変異を有するヒトアデノシンＡ２ｂ受容体変異体が好ましい。

【０１９１】

特に好ましいヒトアデノシンＡ３受容体は、以下のアミノ酸残基：A60, T94, W128, L232 及びL236の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０１９２】

３又は４又は５の上述の変異を有するヒトアデノシンＡ３受容体変異体が好ましい。

【０１９３】

特に好ましいヒトアデノシンＡ１受容体は、以下のアミノ酸残基：A57, T91, A125, L236, 及びL240の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基が、Ala又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０１９４】

変異の特に好ましい組み合わせは実施例２に詳細に記載している。適切な変異体は、これらのヒトアデノシンA_{2a}受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例２に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている他のアデノシン受容体変異体も含む。

【０１９５】

特に好ましいアデノシン受容体変異体は、ヒトアデノシンＡ２ａ受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸に変異を含有するものである(A54L, K122A, L235A) (Rant 17); (A54L,T88A, V239A, A204L) (Rant 19); 及び(A54L, T88A, V239A, K122A) (Rant 21)。

【０１９６】
ニューロテンシン受容体変異体

ニューロテンシン受容体は当該技術分野において知られている。それらは配列相同性を共有し、ニューロテンシンに結合する。

【０１９７】
１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、対応する野生型のニューロテンシン受容体と比較した際に、図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置:Ａｌａ　６９，Ｌｅｕ　７２，Ａｌａ　７３，Ａｌａ　８６，Ａｌａ　９０，Ｓｅｒ　１００，Ｈｉｓ　１０３，Ｓｅｒ　１０８，Ｌｅｕ　１０９，Ｌｅｕ　１１１，Ａｓｐ　１１３，Ｉｌｅ　１１６，Ａｌａ　１２０，Ａｓｐ　１３９，Ｐｈｅ　１４７，Ａｌａ　１５５，Ｖａｌ　１６５，Ｇｌｕ　１６６，Ｌｙｓ　１７６，Ａｌａ　１７７，Ｔｈｒ　１７９，Ｍｅｔ　１８１，Ｓｅｒ　１８２，Ａｒｇ　１８３，Ｐｈｅ　１８９，Ｌｅｕ　２０５，Ｔｈｒ　２０７，Ｇｌｙ　２０９，Ｇｌｙ　２１５，Ｖａｌ　２２９，Ｍｅｔ　２５０，Ｉｌｅ　２５３，Ｌｅｕ　２５６，Ｉｌｅ　２６０，Ａｓｎ　２６２，Ｖａｌ　２６８，Ａｓｎ　２７０，Ｔｈｒ　２７９，Ｍｅｔ　２９３，Ｔｈｒ　２９４，Ｇｌｙ　３０６，Ｌｅｕ　３０８，Ｖａｌ　３０９，Ｌｅｕ　３１０，Ｖａｌ　３１３，Ｐｈｅ　３４２，Ａｓｐ　３４５，Ｔｙｒ　３４９，Ｔｙｒ　３５１，Ａｌａ　３５６，Ｐｈｅ　３５８，Ｖａｌ　３６０，Ｓｅｒ　３６２，Ａｓｎ　３７０，Ｓｅｒ　３７３，Ｐｈｅ　３８０，Ａｌａ　３８５，Ｃｙｓ　３８６，Ｐｒｏ　３８９，Ｇｌｙ　３９０，Ｔｒｐ　３９１，Ａｒｇ　３９２，Ｈｉｓ　３９３，Ａｒｇ　３９５，Ｌｙｓ　３９７，Ｐｒｏ　３９９の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、ニューロテンシン受容体変異体である。

【０１９８】
ＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを使用して測定すると、ＧＰＣＲ変異体が所定のラットニューロテンシン受容体配列を比較した際に、少なくとも２０％の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、ＧＰＣＲ変異体は、少なくとも３０％又は少なくとも４０％又は少なくとも５０％又は少なくとも６０％の配列同一性を有する。

【０１９９】
ニューロテンシン受容体変異体は任意のニューロテンシン受容体変異体であってよいが、所定のラットニューロテンシン受容体アミノ酸配列を参照して言及されるアミノ酸位置の１つ又は複数で変異している。

【０２００】
以下の実施例３に記載しているように、（図１１及び２８に示す）ラットニューロテンシン受容体配列の以下のアミノ酸残基：Leu 72, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111,Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Lys 176, Thr 179, Met 181, Ser 182, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Leu 256, Asn 262, Val 268, Met 293, Asp 345, Tyr349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358,Ser 362, Ala 385, Cys 386, Trp 391, Arg 392, His 393, Lys 397, Pro 399 の個々の置き換えは、ニューロテンシンの不在下について考えた際に熱安定性における増大を引き起こす。

【０２０１】
以下の実施例３に記載のように、（図１１及び２８に記載の）ラットニューロテンシン受容体配列における以下のアミノ酸残基：Ala 69, Ala 73, Ala 86, Ala 90, His 103, Val 165, Glu 166, Ala 177, Arg 183, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Ile 260, Thr 279, Thr 294, Gly 306, Leu 308,Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Phe 358,Val 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Pro 389, Gly 390, Arg 395 の個々の置き換えは、ニューロテンシンの存在下について考えると、熱安定性における増大を引き起こす。

【０２０２】
かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の１つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているラットニューロテンシン受容体変異体を使用してよい。親受容体における１つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するニューロテンシン受容体変異体も使用してよい。
【０２０３】
１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、構造モチーフに少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有するニューロテンシン受容体変異体であり、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図１１に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けによる以下の位置:Ａｌａ　６９，Ｌｅｕ　７２，Ａｌａ　７３，Ａｌａ　８６，Ａｌａ　９０，Ｓｅｒ　１００，Ｈｉｓ　１０３，Ｓｅｒ　１０８，Ｌｅｕ　１０９，Ｌｅｕ　１１１，Ａｓｐ　１１３，Ｉｌｅ　１１６，Ａｌａ　１２０，Ａｓｐ　１３９，Ｐｈｅ　１４７，Ａｌａ　１５５，Ｖａｌ　１６５，Ｇｌｕ　１６６，Ｌｙｓ　１７６，Ａｌａ　１７７，Ｔｈｒ　１７９，Ｍｅｔ　１８１，Ｓｅｒ　１８２，Ａｒｇ　１８３，Ｐｈｅ　１８９，Ｌｅｕ　２０５，Ｔｈｒ　２０７，Ｇｌｙ　２０９，Ｇｌｙ　２１５，Ｖａｌ　２２９，Ｍｅｔ　２５０，Ｉｌｅ　２５３，Ｌｅｕ　２５６，Ｉｌｅ　２６０，Ａｓｎ　２６２，Ｖａｌ　２６８，Ａｓｎ　２７０，Ｔｈｒ　２７９，Ｍｅｔ　２９３，Ｔｈｒ　２９４，Ｇｌｙ　３０６，Ｌｅｕ　３０８，Ｖａｌ　３０９，Ｌｅｕ　３１０，Ｖａｌ　３１３，Ｐｈｅ　３４２，Ａｓｐ　３４５，Ｔｙｒ　３４９，Ｔｙｒ　３５１，Ａｌａ　３５６，Ｐｈｅ　３５８，Ｖａｌ　３６０，Ｓｅｒ　３６２，Ａｓｎ　３７０，Ｓｅｒ　３７３，Ｐｈｅ　３８０，Ａｌａ　３８５，Ｃｙｓ　３８６，Ｐｒｏ　３８９，Ｇｌｙ　３９０，Ｔｒｐ　３９１，Ａｒｇ　３９２，Ｈｉｓ　３９３，Ａｒｇ　３９５，Ｌｙｓ　３９７，Ｐｒｏ　３９９のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。
【０２０４】
誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するニューロテンシン受容体であってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質若しくはその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してもよいが、リガンド結合能を保持する。
【０２０５】
「対応するアミノ酸残基」によって、ラットニューロテンシン受容体と他のニューロテンシン受容体とをＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷとを使用して比較する際に、ラットニューロテンシン受容体における所定のアミノ酸残基に対して整列（アライン）する他のニューロテンシン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。
【０２０６】
図１１は、ラットニューロテンシン受容体と２つのヒトニューロテンシン受容体１及び２との間のアラインメントを示す。例えば、ヒトニューロテンシン受容体１のＡｌａ８５がラットニューロテンシン受容体のＡｌａ８６が対応し；ヒトニューロテンシン受容体１のＰｈｅ３５３がラットニューロテンシン受容体のＰｈｅ３５８に対応することなどが認められる。ヒトニューロテンシン受容体１及び２における他の対応するアミノ酸残基は、図１１を参照して容易に同定可能である。
【０２０７】
親の特定のアミノ酸残基がＡｌａに置き換えられることが好ましい。しかしながら、親の特定のアミノ酸残基がＡｌａである際は、Ｌｅｕで置き換えられることが好ましい。
【０２０８】
ニューロテンシン受容体変異体は、２以上のアミノ酸の位置において、親と比較すると異なるアミノ酸を有することが好ましい。特に好ましいヒトニューロテンシン受容体（ＮＴＲ１）は、以下のアミノ酸残基：Ala 85, His 102, Ile 259, Phe 337 及びPhe 353の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基がAla又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。

【０２０９】
３又は４又は５の上述の変異を有するヒトニューロテンシン受容体（ＮＴＲ１）が好ましい。
【０２１０】
特に好ましいヒトニューロテンシン受容体（ＮＴＲ２）は、以下のアミノ酸残基：V54, R69, T229, P331 及びF347の１つ又は複数が他のアミノ酸残基で置き換えられているものである。典型的には、所定のアミノ酸残基がAla又はVal又はMet又はLeu又はIleで置きかえられる（ただし、それらが既に存在する場合を除く）。３又は４又は５の上述の変異を有するヒトニューロテンシン受容体（ＮＴＲ２）が好ましい。
【０２１１】
特に好ましい変異の組み合わせは、実施例３に詳細に記載している。適切な変異体は、これらのラットニューロテンシン受容体変異体を含み、さらに、対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸、典型的には実施例３に示すものと同じアミノ酸に置き換えられている、他のニューロテンシン受容体変異体も含む。
【０２１２】
特に好ましいニューロテンシン受容体変異得体は、ラットニューロテンシン受容体を参照して挙げられているアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基における変異を含有するものである(F358A, A86L, I260A, F342A) (Nag7m); (F358A, H103A, I260A, F342A) (Nag7n)。
【０２１３】
ムスカリン受容体変異体

ムスカリン受容体は当該技術分野において知られている。それらは配列相同性を共有し、ムスカリンに結合する。
【０２１４】
１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体は、対応する野生型のムスカリン受容体と比較した際に、図１７に記載のヒトムスカリン受容体Ｍ１の番号付けによる以下の位置：Ｌｅｕ　６５、Ｍｅｔ　１４５、Ｌｅｕ　３９９、Ｉｌｅ　３８３及びＭｅｔ　３８４の任意の１つ又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有する、ムスカリン受容体変異体である。
【０２１５】
ＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを使用して測定すると、ＧＰＣＲ変異体が所定のヒトムスカリン受容体配列を比較した際に、少なくとも２０％の配列同一性を有するものであることが特に好ましい。好ましくは、ＧＰＣＲ変異体は、少なくとも３０％又は少なくとも４０％又は少なくとも５０％の配列同一性を有する。
【０２１６】
ムスカリン受容体変異体は、任意のムスカリン受容体の変異体であってよいが、所定のムスカリン受容体アミノ酸配列を参照して挙げられているアミノ酸の位置の１つ又は複数で変異されている。
【０２１７】
かくして、親と比較すると、これらのアミノ酸残基の１つ又は複数が他のアミノ酸残基によって置き換えられているヒトムスカリン受容体変異体を使用してよい。親受容体における１つ又は複数の対応するアミノ酸が他のアミノ酸残基に置き換えられている、他の起源に由来するムスカリン受容体変異体も使用してよい。
【０２１８】
誤解を避けるために言及すると、前記親は、天然の配列を有するムスカリン受容体であってよく、又は切断型であってよく、又は天然のタンパク質又はその断片に対する融合体であってよく、又は天然の配列と比較して変異を含有してよいが、リガンド結合能を保持する。
【０２１９】

１つの実施態様では、当該ＧＰＣＲ変異体はムスカリン受容体変異体である。例えば、ムスカリン受容体変異体は、構造モチーフに少なくとも１つの異なるアミノ酸残基を有してよく、前記受容体変異体は、親受容体と比較して、図１７に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けによる以下の位置：Ｌｅｕ　６５、Ｍｅｔ　１４５、Ｌｅｕ　３９９、Ｉｌｅ　３８３及びＭｅｔ　３８４のいずれかに対応する位置に異なるアミノ酸を有する。

【０２２０】

「対応するアミノ酸残基」によって、ヒトムスカリン受容体と他のムスカリン受容体とをＭａｃＶｅｃｔｏｒ及びＣＬＵＳＴＡＬＷを使用して比較した際に、ヒトムスカリン受容体における所定のアミノ酸に対して整列（アライン）する他のムスカリン受容体におけるアミノ酸残基が含まれる。

【０２２１】

特定のアミノ酸残基がＡｌａで置き換えられることが好ましい。しかしながら、特定のアミノ酸残基がＡｌａである際は、Ｌｅｕで置き換えられることが好ましい。

【０２２２】

本発明で使用するＧＰＣＲ変異体は、熱、界面活性剤、カオトロピック剤、及び極端なｐＨのいずれか１つに対する増大した安定性を有することが好ましい。

【０２２３】

本発明で使用するＧＰＣＲ変異体は増大した熱安定性を有することが好ましい。

【０２２４】

βアドレナリン受容体変異体、アデノシン受容体変異体、及びニューロテンシン受容体変異体を含む本発明で使用するＧＰＣＲ変異体が、それらのリガンドの存在下又は不在下で、親と比較して増大した熱安定性を有することが好ましい。

典型的には、リガンドは、アンタゴニスト、完全なアゴニスト、部分的アゴニスト、又は逆アゴニストであり、オルトステリック又はアロステリックのいずれかである。上述のように、リガンドは、抗体などのポリペプチドであってよい。

【０２２５】

本発明で使用するＧＰＣＲ変異体、例えば、βアドレナリン受容体変異体又はアデノシン受容体変異体又はニューロテンシン受容体変異体又はムスカリン受容体変異体は、親よりも少なくとも２℃、好ましくは少なくとも５℃、より好ましくは少なくとも８℃、さらに好ましくは少なくとも１０℃又は１５℃又は２０℃安定であることが好ましい。

典型的には、親受容体及び受容体変異体の熱安定性は、同じ条件下で測定される。典型的には、熱安定性は、ＧＰＣＲが特定の立体構造を備えている条件下でアッセイされる。典型的には、当該選択される条件は、ＧＰＣＲに結合するリガンドの存在下である。

【０２２６】

本発明で使用するＧＰＣＲ変異体は、適切な界面活性剤において可溶化及び精製された場合、ドデシルマルトシド中で精製されたウシロドプシンに類似した熱安定性を有することが好ましい。ＧＰＣＲ変異体が、３０分間に亘る４０℃の加熱後に少なくとも５０％のリガンド結合活性を保持することが、特に好ましい。ＧＰＣＲ変異体が、３０分間に亘る５５℃の加熱後に少なくとも５０％のリガンド結合活性を保持することが、さらに好ましい。

【０２２７】

誤解を避けるために、本発明の第一の態様に係る方法の工程（ａ）で提供されるＧＰＣＲ変異体は、例えば、翻訳後修飾、例えばグリコシル化又はリン酸化又は脂肪アシル化のための部位の導入又は欠失によって、伸長又は切断されてよく、内部欠失又は挿入を含んでよく、又はさもなければ安定化変異の導入を越えて変化していてもよい。前記ＧＰＣＲ変異体は、合成的に、例えばペプチド半合成又は架橋又はアルキル化によって、化学修飾されてもよい。いずれにしても、提供されるＧＰＣＲ変異体は、親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する。

【０２２８】

結合パートナーの選択

膜タンパク質に対する結合パートナーの選択は困難な課題であることが過去に証明されている。必要とされる純粋な抗原の調製には問題がある。膜タンパク質は多くの場合に界面活性剤で可溶化され、それらはタンパク質－界面活性剤複合体として精製される。界面活性剤の種類及び濃度は、タンパク質をその天然立体構造に保持するために極めて重要である。一部の界面活性剤は、タンパク質が一般的なＥＬＩＳＡ支持体として使用されるプラスチック及びポリスチレン表面に結合するのを妨げることがある。加えて、固相への吸着はタンパク質の部分的な変性を引き起こし得る。

【０２２９】

対照的に、ＧＰＣＲ変異体の増大した安定性は、ＧＰＣＲが免疫原又はスクリーニングのための選択試薬として使用される際にいくつかの利点を付与し、それらが様々な状況において使用されることを可能にする。

【０２３０】

したがって、１つの実施態様では、ＧＰＣＲ変異体は、全細胞製剤中若しくは細胞膜断片に存在するか、界面活性剤に可溶化されてよく、又は脂質単層、脂質二重層、ビーズ結合脂質粒子、他の固体支持脂質層若しくはプロテオリポソームに組み込まれてよい。ＧＰＣＲが固定化される場合、脂質層は、固体支持体の表面上の層として直接支持されてよく、又はＣｏｏｐｅｒ Ｍ．Ａ．Ｊ Ｍｏｌ Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．２００４ Ｊｕｌ－Ａｕｇ；１７（４）：２８６－３１５に記載されるように層又は小胞として固定されてよいと解される。

【０２３１】

本発明者らは、ハイスループット膜受容体スクリーニングが、整列又は多重化され得るビーズ上又は表面上に膜を固定化することによって促進されることを認識する。典型的には、膜タンパク質をプロテオリポソームの形態で脂質と共に表面に沈着させる。プロテオリポソームの形成のために最も一般的に使用される方法は、原核細胞又は真核細胞から出発する。膜タンパク質は、界面活性剤との混合ミセルとして単離するか、有機溶媒に溶解するか又は緩衝液中での超音波処理により膜断片として凝集させてよい。一度単離され、精製されると、膜タンパク質は、ａ）有機溶媒を介した再構成（例えば、逆相蒸発、脂質－タンパク質膜の再水和）、ｂ）機械的手段（例えば、超音波処理、フレンチプレス、凍結融解）、又はｃ）界面活性剤を介した手段（例えば、透析、希釈、又はあらかじめ形成された小胞若しくはバイセルへの直接組込み）によって小胞に再構成してよい。

【０２３２】

ＧＰＣＲ変異体の界面活性剤可溶化形態は、部分的に純粋又は高度に純粋な製剤でよい。改善された安定性と可溶化条件の最適化によって可能となる精製は、外来性の「付着性」抗原及び脂質並びに、例えばファージが付着し得る、炭水化物などの他の細胞表面物質の除去という利点を付与する。このことは、例えば、ファージ粒子は疎水性又は荷電した表面に非特異的に付着することが知られているので、「外来性」物質が荷電している又は疎水性である場合に特に有益である。さらに、あるファージ抗体はそれ自体が無差別に抗原に結合し得る。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価される通常のレベルの純度は８０～９５％である。したがって、好ましくはＧＰＣＲ変異体の界面活性剤可溶化形態は、他のタンパク質から少なくとも８０％、又は少なくとも８５％、さらに好ましくは少なくとも９０％、又は少なくとも９３％、又は少なくとも９５％純粋である。当該技術分野において知られるように、高レベルの、例えば少なくとも９９％の純度が付加的な精製技術を使用して達成され得る。

【０２３３】

可溶化受容体製剤は、典型的には、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ ７．０）、０．１Ｍ（$NH_4)_2SO_4$、１０％グリセロール、０．０７％ＣＨＳ、０．３３％ＤＯＭ、０．３３％Ｃｈａｐｓ、０．３３ｍＭ ＤＯＰＣ／ＤＯＰＳ（７：３）、及び緩衝液５０ｍｌにつき１個のプロテアーゼインヒビター錠の緩衝液中で作製される。可溶化の試みとして、０．５ｍｌのこの可溶化緩衝液を約2×10^6細胞に添加し、これらの細胞懸濁液を、プ

ローブソニケーター（６パルス／秒）を使用して超音波処理し、４℃のロッカー上に置く。２時間後、卓上型遠心分離機を使用して溶液を４℃で２０分間に亘って１４，０００ｒｐｍで遠心分離する。可溶化された受容体を含む上清を新しい管に移し、分析まで－８０℃で凍結保存する。

【０２３４】

膜断片又は膜－界面活性剤抽出物から形成されるＧＰＣＲ変異体の製剤は、参照によって本明細書に取り込むＣｏｏｐｅｒ Ｍ．Ａ．Ｊ Ｍｏｌ Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．２００４ Ｊｕｌ－Ａｕｇ；１７（４）：２８６－３１５において詳細に総説されている。特に興味深いのは、Ｇｒａｈａｍ，Ｊ．Ｍ．；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｊ．Ａ．Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ；Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９７及びＤｉｇｎａｍ，Ｊ．Ｄ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １９９０，１８２，１９４－２０３から適合された方法である。例えば、１つの方法は以下のとおりである：ｉ）５００ｍｌの適切な細胞培養物（例えば、ＣＨＯ、Ｓｆ９）を１０００ｇで１０分間に亘って回転させ、ペレットを、ペレット容積の約２倍の適切な氷冷２０ｍＭ ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ ８、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１ｍＭ ＥＧＴＡ、０．１ｍＭ ＰＭＳＦ、２μｇ／ｍｌアプロチニン、及び１０μｇ／ｍｌロイペプチンに再懸濁する、ｉｉ）Ｄｏｕｎｃｅホモジナイザー（Ａ型）で１０ストロークホモジナイズし、次に３０，０００ｇで２０分間に亘って遠心分離する、ｉｉｉ）ペレットを５０ｍｌの２０ｍＭ ｔｒｉｓ ＨＣｌ ｐＨ ８、３ｍＭ ＭｇＣｌ、１０μｇ／ｍｌ ＤＮＡａｓｅ ＩプラスＰＭＳＦ、２μｇ／ｍｌアプロチニン及び１０μｇ／ｍｌロイペプチン（溶液Ｂ）に再懸濁し、再びホモジナイズする、ｉｖ）３０，０００ｇで２０分間に亘って遠心分離し、ペレットを２０ｍｌの溶液Ｂに再懸濁し、再びホモジナイズする、ｖ）瞬間凍結後、即時使用のために４℃で保存する。

【０２３５】

ＧＰＣＲ変異体は、当該技術分野においてよく知られているように、Ｃ末端又はＮ末端に分子タグを含むように操作してよい。タグは、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、ｃ－Ｍｙｃタグ、ＤＤＤＤＫタグ、ＨＳＶタグ、Ｈａｌｏタグ又はビオチンタグの任意のものでよい。その様なタグは、溶液中でのファージに基づく選択プロトコールを容易にするために使用してよく、また固体支持体への結合を与えるために使用してもよい。さらに、その様なタグは、中でも特に、アフィニティーカラム、アフィニティーフィルター、磁気ビーズ及び選択的な固体支持試薬の他の例、ろ過、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー並びに透析を使用した不純製剤からのＧＰＣＲ変異体の選択と富化を促進するであろう。

【０２３６】

一連の界面活性剤及び可溶化緩衝液及び添加剤中でのＧＰＣＲ変異体の増大した安定性により、それらは固体表面に固定化されるのに特に好適である。かくして、１つの実施態様では、ＧＰＣＲ変異体は固体支持体上に固定化される。各種の支持体が当該技術分野において知られており、例えば、ビーズ、カラム、スライドガラス、チップ又はプレートを含む。固定化は共有結合又は非共有結合相互作用を介してよい。

【０２３７】

固定化が非共有結合相互作用を介する場合、支持体は、アビジン、ストレプトアビジン、金属イオン、親ＧＰＣＲに対する抗体、又はＧＰＣＲ変異体に結合された分子タグに対する抗体の任意のもので被覆されてよい。例えば、タグは、ＦＬＡＧタグなどの抗体によって認識されるものであってよく、又は、例えばＶｅｎｔｕｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １６１０（２００３）４６－５０に記載されている、ニッケル又はコバルトなどの金属イオンへの結合を可能にするポリヒスチジンタグであってよい。代替的には、ＧＰＣＲ変異体は、例えば、アビジン又はストレプトアビジンで被覆された表面に結合され得るビオチンタグで化学修飾されてよい。さらに、ＧＰＣＲ変異体は、天然の受容体配列に対して産生された抗体を介して固定化されてよい。

【０２３８】

固定化が共有結合相互作用を介する場合、支持体は、カルボキシル化デキストランなどのポリマー支持体で被覆されてよい。例えば、ＧＰＣＲ変異体は、アミンカップリングを介してカルボキシル化ポリマーで被覆された表面に共有結合的に固定化されてよい。例えば、デキストラン又はヒアルロン酸などのカルボキシメチル化支持体の水溶性カルボジイミドを介した活性化は、タンパク質の利用可能なアミノ部分を介したＧＰＣＲ変異体の直接の共有結合捕捉を可能にし、安定なアミド結合を形成する。代替的には、ＧＰＣＲは操作されてよく、又は遊離の表面チオール（例えば、天然の遊離Ｃｙｓ、Ｍｅｔ残基又は操作されたＣ末端Ｃｙｓ残基）との反応を可能にするスルフィドリル反応性試薬（例えば、ピリジニルジチオエタンアミン（ＰＤＥＡ）又は３－（２－ピリジニルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＳＰＤＰ））でさらに誘導体化されて、可逆的ジスルフィド結合を形成してよい。同様に、マレイミドカップリング試薬、例えばスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）及びＮ－（γ－マレイミドブチルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）を使用して安定なチオエーテル結合を形成してよい。固体支持体は、シスタミンで誘導化して、ジスルフィド活性化ＧＰＣＲとのカップリングを生じさせてもよい。さらに、ヒドラジンによる処理とそれに続く還元的アミノ化により、アルデヒドとのカップリングが可能となる。アルデヒド基は、受容体に対して天然であってよく、又は固体支持体に存在する（デキストラン、アガロース、セファロース、ヒアルロン酸及びポリアジネートなどの炭水化物の糖残基に存在する）任意のシス－ジオールの穏やかな酸化によって形成されてよい。上記に加えて、アミノ存在表面を市販の二官能価架橋試薬で処理して、Ｅｒｎｓｔ，Ｏ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０００，３１５，４７１－４８９及びＮｕｎｏｍｕｒａ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２０００，２７５，２４５４０－２４５４６によって開示されているように受容体上の遊離アミノ基又はスルフヒドリル基とのカップリングを生じさせてよい。

【０２３９】

ＧＰＣＲ変異体の定位は結合パートナーの同定の所望結果に依存するであろう。例えば、治療用低分子又は抗体の同定に関しては、ＧＰＣＲ変異体は、典型的にはＣ末端又はアッセイにおいて細胞外ドメインが外側を向くことを可能にする他の細胞内ドメインを介して固定化される。天然の細胞内ＧＰＣＲ結合パートナー又はＧＰＣＲ結合に干渉する物質を同定するために、ＧＰＣＲ変異体は、典型的にはＮ末端又は細胞外ドメインによって固定化される。Ｎ末端又は細胞外ドメインによる固定化は、細胞内ドメインに結合する治療用分子も同定してもよい。しかしながら、その様な分子がインビボで活性であるためには、それらが細胞膜を通過することが可能でなければならないと解されるであろう。

【０２４０】

代替的実施態様では、ＧＰＣＲ変異体は固定化されず、例えば、界面活性剤に可溶化されるか又は全細胞製剤中に存在する。この場合には、試験化合物（例えば、試験化合物のライブラリー）がチップ表面などの固体支持体に固定化されてよい。化合物をチップ表面に固定化するための各種の技術が当該技術分野において知られており、任意のものを利用してよい。例えば、適切な技術は、フォトリソグラフィー（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，Ｃａｌｉｆ．）、メカニカルマイクロスポッティング（Ｓｃｈｅｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）ｖｏｌ．２７０，ｐ．４６７－４７０；Ｓｙｎｔｅｎｉ，Ｆｒｅｍｏｎｔ，Ｃａｌｉｆ．）及びインクジェッティング（Ｉｎｃｙｔｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆ．；及びＰｒｏｔｏｇｅｎｅ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆ．）を含む。チップ上の試験化合物／ＧＰＣＲ変異体の対の空間的位置が、試験化合物の同一性を明らかにするために使用される。他の適切な方法は、例えば、全て参照によって本明細書に取り込む、Ｆａｎｇ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｔｏｄａｙ　２００３，８，７５５－７６１、及び参考文献、Ａｌｖｅｓ，Ｉ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔ．＆　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｃｉ．２００５，６，２９３－３１２；Ｂａｒｒｙ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　２００４，４，３７１７－３７２６；Ｂｅｓｅｎｉｃａｒ，Ｍ．ｅｔ

al. Chem. Phys. Lipids 2006, 141, 169－178；Cocklin, S. et al. Prot. Sci. 2004, 13, 194－194；Cooper, M. A. J. of Mol. Recognit. 2004, 17, 286－315；Fang, Y. et al. Drug Discov. Today 2003, 8, 755－761；Ferracci, G. et al. Anal. Biochem. 2004, 334, 367－375；Graneli, A. et al. Anal. Biochem. 2007, 367, 87－94. ；Graneli, A. et al. Biosens. Bioelectron. 2004, 20, 498－504；Groves, J. T. Curr. Op. Drug Discov. Develop. 2002, 5, 606－612；Groves, J. T. et al. J. Immunol. Meth. 2003, 278, 19－32；Harding, P. J. et al. Eur. Biophys. J. Biophys. Let. 2006, 35, 709－712；Komolov, K. E. et al. Anal. Chem. 2006, 78, 1228－1234；Kuroda, K. et al. App. Psychophys. Biofeedback 2006, 31, 127－136；Lang, M. J. et al. Curr. Prot. Peptide Sci. 2006, 7, 335－353；Leifert, W. R. et al. J. Biomol. Screening 2005, 10, 765－779；Martin－Garcia, J. et al. J. Virology 2005, 79, 6703－6713；Minic, J. et al. Biochim. Biophys. Acta－General Subjects 2005, 1724, 324－332；Mozsolits, H. et al. J. Peptide Sci. 2003, 9, 77－89；Navratilova, I. et al. Anal. Biochem. 2006, 355, 132－139；Ott, D. et al. Prot. Eng. Design & Selection 2005, 18, 153－160；Park, P. S. H. et al. Febs Lett. 2004, 567, 344－348. ；Sobek, J. et al. Combinat. Chem. & High Throughput Screening 2006, 9, 365－380；Stenlund, P. et al. Analytical Biochemistry 2003, 316, 243－250；Winter, E. M. et al. Anal. Chem. 2006, 78, 174－180；Yokogawa, M. et al. J. Am. Chem. So. 2005, 127, 12021－12027；Zurawski, J. A. et al. Biopolymers 2003, 71, 388－389に記載されている。

【０２４１】

１つの実施態様では、例えば、ファージディスプレイ選択プロトコールでは、ＧＰＣＲ及び試験化合物のどちらも固定化されず、溶液中に存在する。

【０２４２】

特定の立体構造において安定化された精製ＧＰＣＲのミリグラム量を生産できることは、生体膜に存在する天然ＧＰＣＲに対しては利用できないであろうスクリーニングアプローチを可能にする。かくして、本発明の方法は、天然のリガンドが未知である「オーファン」ＧＰＣＲのリガンドを同定するために使用してよい。オーファンＧＰＣＲのリガンドは、血液若しくは組織抽出物などの生物学的試料から又はリガンドのライブラリーから同定してよい。同様に、ＧＰＣＲ変異体のリガンドも、前記リガンドがアクセサリータンパク質などの相互作用性タンパク質である場合は同定してよい。ペプチド又はタンパク質治療薬も、立体構造特異的抗体と同様に本発明の方法によって同定してよいと解される。例えば、以下に記載するように作製された抗体は、立体構造特異的ＧＰＣＲ結合に関して評価してよい。特に、抗体は、免疫動物から採取したＢ細胞より得た上清から、免疫動物由来のＢ細胞の不死化後に得たハイブリドーマから、又はファージ粒子上で若しくはリボソームディスプレイなどのインビトロ発現系を介して発現され得る組換え抗体ライブラリーから、同定してよい。本発明の方法は、作用機構がこれまで知られていなかった化合物の作用機構を測定するためにも使用してよい。例えば、「ＧＰＣＲｏｍｅ」であるＧＰＣＲ

の混合物又はそのサブセットを化合物に対してスクリーニングして、それらの作用機構がＧＰＣＲへの結合を介するか否かを同定してよい。加えて、本発明は、特定の化合物が化合物の混合物から精製される生化学的アフィニティー精製システムとして使用してよい。

【０２４３】

試験化合物は生物学的試料として提供されてよい。特に、前記試料は、個体から採取した任意の適切な試料でよい。例えば、試料は血液、血清、血漿又は脊髄液などの液体試料であってよい。代替的には、試料は組織又は細胞抽出物であってよい。

【０２４４】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物はポリペプチドである。例えば、試験化合物は、あるＧＰＣＲに結合することが知られるが、立体構造特異的ポリペプチドの同定を所望する場合には特定のタイプのポリペプチドであってよい。代替的には、ポリペプチドは候補治療分子、例えばアンチカリンであってよい（Ｓｋｅｒｒａ　Ｊ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２００１）７４（４）：２５７－７５）。

【０２４５】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物はペプチドである。

【０２４６】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物は、アフィボディ、ペプチドミメティック、核酸、ペプチド核酸（ＰＮＡ）若しくはアプタマー、又は脂質若しくは炭水化物である。

【０２４７】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物は、アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）などのモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質、又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトγクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールドに基づくタンパク質である。

【０２４８】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物は低分子、例えば５０００ダルトン未満の分子であるか、又は１つ若しくは複数の試験化合物は天然生成物である。

【０２４９】

１つの実施態様では、１つ又は複数の試験化合物は抗体である。例えば、試験化合物は、親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体に対して産生された抗体であってよく、前記ＧＰＣＲ変異体は、親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有する。好ましくは、ＧＰＣＲ変異体は、工程（ａ）において提供されるものと同じＧＰＣＲ変異体である。

【０２５０】

本明細書で使用する、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ断片及びＦａｂ発現ライブラリーによって生成される断片を含むが、これらに限定されない。その様な断片は、標的物質に対する結合活性を保持する全長抗体の断片である、Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）及びＦ（ａｂ’）２断片、並びに抗体の遺伝子操作された誘導体、例えば一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、融合タンパク質、ドメイン抗体（ｄＡｂ）及びダイアボディを含む。例えば、組換えＤＮＡ技術を、元の抗体の結合特異性を保持する更なる抗体又はキメラ分子を作製するために使用してよいと解されるであろう。その様な技術は、例えば、欧州特許出願第ＥＰ－Ａ－１８４１８７号、英国特許第ＧＢ　２１８８６３８Ａ号又は欧州特許出願第ＥＰ－Ａ－２３９４００号に記載されているように、抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードするＤＮＡを別の免疫グロブリンの定常領域又は定常領域プラスフレームワーク領域に融合する工程を含んでよい。さらに、ハイブリドーマ又は抗体を産生する他の細胞を、産生される抗体の結合特異性を変化させてもよく又は変化させなくてもよい遺伝子変異又は他の変化に供してよい。かくして、抗体は多くの方法で修飾され得るので、用語「抗体」は、必要と

される特異性を備えた結合ドメインを有する任意の特定結合要素又は物質を包含すると解釈されるべきである。したがってこの用語は、天然であるか又は完全に若しくは部分的に合成であるかにかかわらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む、抗体断片、抗体の誘導体、機能的等価物及びホモログを包含する。したがって、免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、又は他のポリペプチドに融合した等価物が含まれる。さらに、抗体及びその断片は、当該技術分野でよく知られるように、ヒト抗体又はヒト化抗体であってよい。

【０２５１】

当該技術分野において知られる各種の手順を、ＧＰＣＲ変異体、又はその断片若しくは融合体に対する抗体を産生するために使用してよい。

【０２５２】

例えば、親ＧＰＣＲと比較して増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体に対する抗体は、リンパ球をＧＰＣＲ変異体の免疫原で免疫する工程、そのようにして作製された抗体をＧＰＣＲに結合する抗体に関してスクリーニングする工程、及び前記抗体を単離する工程によって生産されてよい。「リンパ球を免疫する工程」によって、動物全体が免疫されるインビボ免疫、及び、例えば米国特許第５，２９０，６８１号に記載されている、リンパ球がインビトロで免疫されるインビトロ免疫の両方が含まれる。

【０２５３】

好ましくは、ＧＰＣＲ変異体の免疫原は一般的にそのＧＰＣＲ変異体全体であるが、ＧＰＣＲ変異体の一部、例えばＧＰＣＲ変異体の断片であってもよい。例えば、安定化されたＧＰＣＲの生産は、標的免疫アプローチから利益を受けるであろう、これまで天然立体構造からは明らかでなかったＧＰＣＲの一部の同定を促進し得る。ＧＰＣＲ変異体の断片は、抗体応答などの免疫応答を惹起することが可能なＧＰＣＲの任意の部分であってよい。わずかに５アミノ酸を有するペプチドが抗体応答を惹起し得ることが知られるが、典型的にはより大きなペプチドが使用される。かくして、免疫原の断片は、少なくとも５アミノ酸、典型的には５～１０００アミノ酸、例えば５～５００、５～２００、５～１００、５～５０、５～４０、５～３０、５～２０、例えば５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０アミノ酸を有してよい。

【０２５４】

さらに、免疫原は、ＧＰＣＲが、リンパ球に対して免疫原性であることが知られる第二のタンパク質に融合しているＧＰＣＲ変異体の融合体であってよい。その様な免疫原性タンパク質の例は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、及びダイズトリプシンインヒビターを含むが、これらに限定されない。免疫原は、インビボで哺乳動物においてＧＰＣＲ変異体に対する免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに含んでもよい。免疫応答を増大するために使用される各種のアジュバントは、フロイントアジュバント（完全及び不完全）、無機ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、ジニトロフェノール等）、カルメット-ゲラン杆菌及びコリネバクテリウム・パルブム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）などのヒトにおいて使用可能なアジュバント、又は同様の免疫刺激剤を含むが、これらに限定されない。使用してよいアジュバントの更なる例は、ＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（モノホスホリル脂質Ａ、合成トレハロースジコリノミコレート）を含む。アジュバントの選択はＧＰＣＲの構造を維持するうえで重要であり得、この理由から、Ｔｉｔｒｅｍａｘ及びＲｉｂｉアジュバント乳剤などの水中油型乳剤が特に好ましい。安定化されたＧＰＣＲ変異体をバックボーン上で共に連結して、抗原性をさらに増大するための多価分子を生成してもよい。

【０２５５】

ＧＰＣＲ変異体の免疫原はＧＰＣＲ変異体の変異形であってよいが、ＧＰＣＲ変異体に対する免疫応答を惹起することが可能であり、ＧＰＣＲ変異体の安定性を有意に低下させないものであると解される。その様な変異形は、ＧＰＣＲ変異体と比較して１つ又は複数のアミノ酸置換を有し、５％もの割合の置換を有するポリペプチドを含む。典型的には、

例えば、「変異形」が、１つ又は複数の位置にアミノ酸の挿入、欠失、又は保存的若しくは非保存的な置換が存在するタンパク質を表すが、その様な変化が、依然としてＧＰＣＲ変異体に対する免疫応答を惹起することが可能であり、ＧＰＣＲ変異体の安定性を有意に低下させないタンパク質を生じるものである場合には、置換は保存的置換である。「保存的置換」によって、Ｇｌｙ、Ａｌａ；Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ；Ａｓｐ、Ｇｌｕ；Ａｓｎ、Ｇｌｎ；Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；Ｌｙｓ、Ａｒｇ；及びＰｈｅ、Ｔｙｒなどの組み合わせが意味される。ＧＰＣＲ変異体のその様な変種は、タンパク質の操作及び部位指定変異誘発の標準的な方法を使用して作製されてよい。

【０２５６】

免疫原は、安定化ＧＰＣＲ又はその断片をコードするポリヌクレオチドであってもよいと解される。例えば、ポリヌクレオチドは、インビボで細胞に取り込まれて、細胞表面で発現されてよく、そこで免疫応答を刺激するであろう。

【０２５７】

ＧＰＣＲ変異体の免疫原は、上述したように、全細胞製剤として、細胞膜断片中で、界面活性剤に可溶化されて、脂質単層中で、脂質二重層中で、ビーズ結合脂質粒子中で、固体に支持された脂質層中で、又はプロテオリポソーム中で提供されてよい。

【０２５８】

ポリクローナル抗体の作製のために、各種の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、マウス又は他の哺乳動物）を免疫原の１回又は複数回の注射によって免疫してよい。免疫原性タンパク質に対するポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血清又は卵黄から）単離してよく、主として免疫血清のＩｇＧ画分を提供する、プロテインＡ又はプロテインＧを使用したアフィニティークロマトグラフィーなどのよく知られている技術によってさらに精製してよい。

【０２５９】

モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって開示されたものなどの、ハイブリドーマ法を使用して作製してよい。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を、典型的には免疫剤で免疫して、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することが可能なリンパ球を誘発する。

【０２６０】

一般的には、ヒト起源の細胞を所望する場合は末梢血リンパ球が使用され、非ヒト哺乳動物起源を所望する場合は脾細胞又はリンパ節細胞が使用される。リンパ球を、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用して不死化細胞株と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）ｐｐ．５９－１０３）。不死化細胞株は、通常は形質転換した哺乳動物細胞、特にげっ歯動物、ウシ及びヒト起源の骨髄腫細胞である。通常は、ラット又はマウス骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の増殖又は生存を阻害する１つ又は複数の物質を含有する適切な培地で培養してよい。例えば、親細胞が酵素、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み（「ＨＡＴ培地」）、前記の物質はＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を防止する。

【０２６１】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル発現を支持し、且つ、ＨＡＴ培地などの培地に感受性であるものである。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫株であり、これは、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．及びｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖａ．より入手可能である。ヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘ

テロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９８７）ｐｐ．５１－６３）。

【０２６２】

代替的には、モノクローナル抗体は、当該技術分野においてよく知られており、例えば、Ｂａｂｃｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３：７８４３－７８４８に記載されている、「選択的リンパ球抗体法」（Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｅｔｈｏｄ）（ＳＬＡＭ）を使用して作製可能である。簡単に説明すると、リンパ系細胞の大きな集団の中で、所望の特異性又は機能を備えた抗体を産生している１個のリンパ球が同定される。通常は、インビボ免疫に由来するリンパ系細胞を、適合させた溶血プラークアッセイ（Ｊｅｒｎｅ ＆ Ｎｏｒｄｉｎ，１９６３，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１４０：４０５）及びその後そのリンパ球から回収される抗体の特異性をコードする遺伝情報を使用して、選択した抗原に結合する抗体を産生するものをスクリーニングする。

【０２６３】

モノクローナル抗体は、米国特許第４，８１６，５６７号に記載されているものなどの、組換えＤＮＡ法によって作製してもよい。増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体に対して産生されるモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離し、配列決定することが可能である。上述のハイブリドーマ細胞はその様なＤＮＡの好ましい起源として役立つ。一度単離されれば、ＤＮＡを発現ベクターに組み込んでよく、それを、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、又は骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。ＤＮＡは、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列で置き換えることによって（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３６８，８１２－１３（１９９４））、又は非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合的に連結することによって、修飾されてもよい。その様な非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインを置換してよく、又はキメラ二価抗体を作製するために本発明の抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインを置換してよい。

【０２６４】

ＧＰＣＲに特異的な一本鎖抗体も作製されてよいと解されるであろう（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号参照）。ＧＰＣＲ変異体に対するイディオタイプを含む抗体断片も、当該技術分野において既知の技術によって作製されてよく、（ｉ）抗体分子のペプシン消化によって生成される$F_{(ab')_2}$断片；（ｉｉ）$F_{(ab')_2}$断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるF_{ab}断片；（ｉｉｉ）抗体分子をパパインと還元剤で処理することによって生成されるF_{ab}断片、及び（ｉｖ）F_v断片を含むが、これらに限定されない。特異的結合部位を保持する抗体断片の合成に関する技術の一般的な総説は、Ｗｉｎｔｅｒ ＆ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３４９，２９３－２９９に認められる。

【０２６５】

二重特異性抗体も作製されてよい。二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる抗原に対して結合特異性を有する抗体、好ましくはヒト又はヒト化モノクローナル抗体である。この場合、結合特異性の１つはＧＰＣＲ変異体に対してである。第二の結合標的は任意の他の抗原であり、好都合には、他のＧＰＣＲ又は受容体サブユニットを含む、細胞表面タンパク質又は受容体である。例えば、二重特異性抗体は、ヘテロ二量体を形成し得るＧＰＣＲの対のために有用であろう（Ｍｉｌｌｉｇａｎ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ

Ａｃｔａ．２００７ Ａｐｒ；１７６８（４）：８２５－３５）。この場合、二重特異性抗体は特異的ヘテロ二量体受容体を選択的に標的してよい。二重特異性抗体は、ウイルス侵入の共受容体に対しても有用であってよく、共受容体の１つはＧＰＣＲ、例えばＣＤ４及びＧＰＣＲ ＣＣＲ５又はＣＸＣＲ４である（Ａｌｋｈａｔｉｂ Ｇ，Ｂｅｒｇｅｒ ＥＡ．Ｅｕｒ Ｊ Ｍｅｄ Ｒｅｓ．２００７ Ｏｃｔ １５；１２（９）：３７５－８４）。二重特異性抗体を作製するための方法は当該技術分野において知られている。伝統的に、二重特異性抗体の組換え生産は２つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の共発現に基づき、前記２つの重鎖は異なる特異性を有する（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３））。免疫グロブリン重鎖と軽鎖のランダムな組み合わせの故に、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は１０種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生し、そのうちの１種だけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常はアフィニティークロマトグラフィー工程によって為される。同様の手順は、１９９３年５月１３日公開の国際公開広報第ＷＯ ９３／０８８２９号、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１ ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５－３６５９に開示されている。

【０２６６】

一部の場合には、試験化合物のハイスループットスクリーニングが好ましく、この方法は、当業者によく知られた用語である、「ライブラリースクリーニング」法として使用してよいと解される。かくして、試験化合物は試験化合物のライブラリーであってよい。例えば、ライブラリーは、例えばインビボ、エクスビボ又はインビトロのいずれかで調製されるリボソームディスプレイ又は抗体ライブラリーによって作製される、ペプチド又はタンパク質ライブラリーであってよい。その様なライブラリーを作製し、スクリーニングするための方法は当該技術分野において知られている。

【０２６７】

かくして、親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造において増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体に対して産生される抗体である試験化合物を、そのＧＰＣＲへの結合に関して試験するよりもむしろ、試験化合物は抗体ライブラリーであってよい。かくして、ＧＰＣＲに特異的な抗体を作製するための他の方法は、細菌、酵母、繊維状ファージ、リボソーム若しくはリボソームサブユニット又は他のディスプレイ系において発現される、免疫グロブリン遺伝子又はその部分をコードする発現ライブラリーをスクリーニングする工程を含む。この方法では、抗体配列又は抗体断片配列の大きなライブラリーが、健常ドナー、患者又は動物（健常又はそうでない）などの多様な起源から得られる。これらの配列をクローニングし、適切な系において発現させて、典型的には、固体表面に固定化された増大した安定性を有するＧＰＣＲに結合させることによって抗体が選択される。

【０２６８】

抗体ライブラリーの特定の例は、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、例えば、ヒトリンパ球に由来するｍＲＮＡから調製したヒトＶＬ及びＶＨ ｃＤＮＡを使用して作製される、ｓｃＦｖ又はＦａｂファージディスプレイライブラリーである（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３４８：５５２－５５３（１９９０））。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子が、Ｍ １３又はｆｄなどの繊維状バクテリオファージの大きな又は小さなコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として提示される。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含むため、増大した安定性を有するＧＰＣＲへの抗体の結合能に基づく選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も生じさせる。ファージディスプレイは各種の形式で実施されてよい；それらの総説については、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｋｅｖｉｎ Ｓ．ａｎｄ Ｃｈｉｓｗｅｌｌ，Ｄａｖｉｄ Ｊ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：５６４－５７１（１９９３）参照。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングする際の使用に特に適した方法及び試薬の例は、例えば、Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第

ＷＯ　９２／１８６１９号；Ｄｏｗｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９１／１７２７１号；Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９２／２０７９１号；　Ｍａｒｋｌａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９２／１５６７９号；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９３／０１２８８号；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９２／０１０４７号；Ｇａｒｒａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ特許公開番号第ＷＯ　９２／０９６９０号；Ｆｕｃｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：１３７０－１３７２；Ｈａｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍ　Ａｎｔｉｂｏｄ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ　３：８１－８５；Ｈｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：１２７５－１２８１；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２－５５４；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯ　Ｊ．１２：７２５－７３４；Ｈａｗｋｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２２６：８８９－８９６；Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８；Ｇｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）ＰＮＡＳ　８９：３５７６－３５８０；Ｇａｒｒａｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：１３７３－１３７７；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｎｕｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ　１９：４１３３－４１３７；及びＢａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）ＰＮＡＳ　８８：７９７８－７９８２に認められる。

【０２６９】

前記方法は、例えばファージディスプレイ法に関して上述したように、ＧＰＣＲのポリペプチド結合パートナーを発現することが可能なポリヌクレオチドを同定するために使用してもよい。適切なベクター中の発現ライブラリーの一定分量を、必要とされる結果を与える能力に関して試験してよい。必要な特性を備えたポリヌクレオチドの１つの種を同定するためには、必要な特性を有するポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを同定する工程及びそれらのポリヌクレオチドを再スクリーニングする工程の数回のサイクルが必要とされ得ると解されるであろう。

【０２７０】

本発明は、疾患又は状態を治療する際に使用する薬剤又はリード化合物を同定するためのスクリーニング方法を含む。ハイスループット操作が可能なスクリーニングアッセイは特に好ましいと解される。

【０２７１】

当業者によく知られる用語である、薬剤スクリーニング法であってよい、本明細書に記載する方法では、試験化合物は、薬剤様化合物又は薬剤様化合物の開発のためのリード化合物であってよいと解される。

【０２７２】

用語「薬剤様化合物」は、当業者によく知られており、化合物を医学における使用、例えば薬剤における有効成分としての使用に適したものにし得る性質を有する化合物という意味を含んでよい。かくして、例えば、薬剤様化合物は、有機化学の技術によって、好ましいものではないが分子生物学又は生化学の技術によって合成され得る分子であってよく、好ましくは、５０００ダルトン未満であってよく、且つ水溶性であってよい低分子である。薬剤様化合物は、付加的に、特定の１つ又は複数のタンパク質との選択的相互作用の特徴を示してよく、また生物学的に利用可能及び／又は標的細胞膜又は血液脳関門を貫通することが可能であってよいが、これらの特徴は重要ではないと解されるであろう。

【０２７３】

用語「リード化合物」は、同様に当業者によく知られており、化合物が、それ自体は薬剤としての使用に適さないが（例えば、意図される標的に対して弱い作用強度しかない、作用が非選択的である、不安定である、溶解度が低い、合成が困難である、又はバイオアベイラビリティーが低いという理由で）、より望ましい性質を有し得る他の化合物の設計のための出発点を提供し得るという意味を含んでよい。

【０２７４】

かくして１つの実施態様では、当該方法は、特定の立体構造を備えるＧＰＣＲ変異体に結合することが示された試験化合物を修飾する工程、及び修飾した試験化合物が特定の立体構造を備えるＧＰＣＲ変異体に結合するか否かを測定する工程をさらに含む。修飾した試験化合物が、特定の立体構造を備える親ＧＰＣＲにも結合するか否かをさらに測定してよいと解されるであろう。

【０２７５】

ＧＰＣＲと試験化合物の結合を測定するには各種の方法を使用してよく、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、表面プラズモン共鳴アッセイ、チップベースのアッセイ、免疫細胞蛍光法、酵母ツーハイブリッド技術、及びファージディスプレイ法を含み、これらは当該技術分野において一般的に実施されており、例えば、Ｐｌａｎｔ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ａｎａｌｙｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２６（２），３４２－３４８及びＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋに記載されている。試験化合物とＧＰＣＲの結合を検出する他の方法は、イオンスプレー質量分析／ＨＰＬＣ法を伴う限外ろ過又は他の物理的及び分析的方法を含む。例えば、当業者によく知られた蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）法も使用してよく、この方法では、２つの蛍光標識実体の結合を、相互に近接した際の蛍光標識の相互作用を測定することによって測定してよい。

【０２７６】

ＧＰＣＲ変異体が全細胞製剤、膜プロトプラスト又はプロテオリポソームとして提供される場合、パッチクランプ法、マジック角スピニングＮＭＲ、蛍光相関分光法、蛍光共鳴エネルギー移動及び超遠心分析法などの生物物理学的技術を、試験化合物に対するＧＰＣＲ変異体の結合を分析するために使用してよい（Ｎｅｗ，Ｒ．Ｃ．，Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ．１ｓｔ ｅｄ．；Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ：Ｏｘｆｏｒｄ，１９９０及びＧｒａｈａｍ，Ｊ．Ｍ．；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｊ．Ａ．，Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９７に記載される）と解されるであろう。その様な相互作用の親和性及び速度論の両方の定量的な非侵襲的測定を可能にする方法は、膜－タンパク質結合の継続的観測を可能にする直接アッセイ、又は一部の場合には、結合相互作用体と遊離相互作用体の超高速分離とそれに続く膜結合分析物と膜遊離分析物の定量を含む。

【０２７７】

結合試験化合物は、ペプチド標識、核酸標識（Ｋｅｒｒ ｅｔ ａｌ．，ＪＡＣＳ（１９９３）ｖｏｌ．１１５，ｐ．２５２９－２５３１；及びＢｒｅｎｎｅｒ ＆ Ｌｅｒｎｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）ｖｏｌ．８９，ｐ．５３８１－５３８３）、化学物質標識（Ｏｈｌｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９３）ｖｏｌ．９０，ｐ．１０９２２－１０９２６；及びＭａｃｌｅａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９７）ｖｏｌ．９４，ｐ．２８０５－２８１０）、蛍光標識（Ｙａｍａｓｈｉｔａ ＆ Ｗｅｉｎｓｔｏｃｋ（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、国際公開広報第ＷＯ９５／３２４２５号（１９９５）；及びＳｅｂｅｓｔｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｃ．Ｅｕｒ．Ｐｅｐｔ．Ｓｙｍｐ．２２ｎｄ １９９２（１９９３），ｐ．６３－６４）、又はＲＦタグ（Ｎｉｃｏｌａｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．（１９９５）ｖｏｌ．３４，ｐ．２２８９－２２９１；及びＭｏｒａｎ ｅｔ ａｌ．，ＪＡＣＳ（１９９５）ｖｏｌ．１１７，ｐ．１０７８７－１０７８８）などの、化合物に関連する独自の標識又はタグを使用して検出してよいと解されるであろう。

【０２７８】

試験化合物が、上述の方法のいずれかを使用して作製された、増大した安定性を有する

ＧＰＣＲ変異体に対する抗体である場合、結合は、好ましくは、免疫沈降法を使用して、又は放射免疫検定法（ＲＩＡ）若しくは酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）などのインビトロ結合アッセイによって検定される。その様な技術及びアッセイは当該技術分野において知られている。例えば、ＥＬＩＳＡでは、典型的には、安定化ＧＰＣＲをマイクロタイタープレート又は他の固体表面に固定化する。最初にプレートをＢＳＡ又は他の類似のタンパク質と共にインキュベートして、非特異的結合部位をブロックする。抗体を含有する試料（血清又は卵黄又はハイブリドーマ細胞の培養上清など）をプレートに添加し、固定化したＧＰＣＲに抗体を結合させる。結合抗体は、第一の抗体に結合し、後程検出してよい反応を触媒する酵素へのその接合を介して検出を可能にする、第二の検出抗体の添加によって検出される。加えて、抗体の結合親和性は、Ｍｕｎｓｏｎ ａｎｄ Ｐｏｌｌａｒｄ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ，１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ解析によって測定してもよい。好ましくは、標的ＧＰＣＲに対して高度の特異性と高い結合親和性を有する抗体を単離する。

【０２７９】

抗体がハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体である場合は、特異的抗体を発現するものとして同定されたハイブリドーマクローンを、その後、限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法を使用して増殖させてよいと解されるであろう。このための適切な培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及びＲＰＭＩ－１６４０培地を含む。代替的には、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水としてインビボで増殖させてよい。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を単離してよく、又は、例えば、プロテインＡ－セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、若しくはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって培地若しくは腹水からさらに精製してよい。

【０２８０】

試験化合物がファージディスプレイ抗体ライブラリーである場合、安定化ＧＰＣＲへの結合は以下のように評価してよい。典型的には、増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体をマイクロタイタープレートのウエルに４℃で一晩被覆する。ウエルをＰＢＳで洗浄し、ＭＰＢＳ（ＰＢＳ中の３％粉乳）において３７℃で１時間ブロックする。例えばヒトｓｃＦｖのレパートリー（１０形質導入単位（ｔｕ））を発現する、ファージミドライブラリーに由来する精製ファージを、１００μｌの最終容量の３％ＭＰＢＳにおいて１時間ブロックする。ブロックしたファージをブロックしたＧＰＣＲのウエルに添加し、１時間インキュベートする。ウエルをＰＢＳＴ（０．１％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ ２０を含むＰＢＳ）で５回洗浄した後、ＰＢＳで５回洗浄する。結合したファージ粒子を溶出し、１０ｍｌの対数増殖期の大腸菌ＴＧ１を感染させるために使用する。感染細胞を２ＴＹブロスにおいて３７℃で１時間増殖させ、２ＴＹＡＧプレートに広げて、３０℃で一晩インキュベートする。この１回目のパニング選択からの培養物をヘルパーファージで重複感染させ、回収して（ｒｅｓｃｕｅｄ）、例えば、２回目のパニングのためのｓｃＦｖ抗体を発現するファージ粒子を与える。

【０２８１】

ファージディスプレイ抗体のための代替的な結合アッセイは、典型的には１００ｎＭの最終濃度のビオチニル化ＧＰＣＲ変異体タンパク質を用いた可溶性選択の使用を含む。この場合は、ｓｃＦｖファージミドライブラリー（上述の）からの精製ｓｃＦｖファージ（１０１２ｔｕ）を１ｍｌの３％ＭＰＢＳに懸濁し、３０分間ブロックする。ビオチニル化ＧＰＣＲを添加し、室温で１時間インキュベートする。その後、ファージ／抗原複合体を、１ｍｌの３％ＭＰＢＳにおいて３７℃で１時間ブロックしておいた２５０μｌのＤｙｎａｌ Ｍ２８０ストレプトアビジン磁気ビーズに添加し、ビーズと共に室温でさらに１５分間インキュベートする。磁気ラックを使用してビーズを捕捉し、１ｍｌの３％ＭＰＢＳ／０．１％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ ２０中で４回、続いてＰＢＳ中で３回洗浄する。最後のＰＢＳ洗浄後、ビーズを１００μｌのＰＢＳに再懸濁し、５ｍｌの対数増殖期の大腸菌を感染させるために使用する。再び、この１回目の可溶性選択からの培養物をヘルパーフ

ァージで重複感染させ、回収して、２回目の可溶性選択のためのｓｃＦｖ抗体を発現するファージ粒子を与える。

【０２８２】

ハイスループット操作が可能なスクリーニングアッセイ、例えばチップベースのアッセイは、ＧＰＣＲ変異体への結合を測定するために特に好ましいと解される。安定化ＧＰＣＲ変異体は、精製した際にこれらの形式において使用するのに十分なほど安定でない親ＧＰＣＲと異なり、その様なアッセイに特に適する。特に、ＶＬＳＩＰＳ（商標）と呼ばれる技術は、数十万又はそれ以上の異なる分子プローブ、すなわち試験化合物を含む極めて小さなチップの生産を可能にした。これらの生物学的チップは、アレイに配置されたプローブを有し、各々のプローブには特定の位置が割り当てられている。各々の位置が例えば１０ミクロンの尺度を有する、生物学的チップが生産されている。前記チップを使用して、標的分子がチップ上のプローブのいずれかと相互作用するか否かを測定してよい。選択した試験条件下でアレイを標的分子に曝露した後、走査装置でアレイの各々の位置を検査し、標的分子がその位置のプローブと相互作用したか否かを測定してよい。

【０２８３】

チップ表面のＧＰＣＲ変異体に対する試験化合物は、チップ表面を放射能又は蛍光に関して走査することによって検出してよい。チップ上の相互作用する対の空間的位置が試験化合物の同一性を明らかにするか、又はチップ上にＧＰＣＲ変異体のアレイが存在する場合は、受容体の同一性を明らかにする（例えば、Ｋｕｉｍｅｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｄｒｅｓｓａｂｌｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｒｒａｙｓ，Ｕ．Ｓ．現在は放棄された、１９９８年４月３日出願の米国特許出願第６０／０８０，６８６号、及び１９９９年３月３１日出願の米国特許出願第０９／２８２，７３４号参照）。後者の場合は、ＧＰＣＲ変異体のアレイを、同じＧＰＣＲの各種の立体構造又は各種のＧＰＣＲのいずれかに対する化合物の選択性のデータを得るための方法として使用してよい。

【０２８４】

試験化合物、例えばＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質及びリン脂質、低分子並びに天然生成物に対するＧＰＣＲ変異体の結合を検出する代替的な方法は、例えばＰｌａｎｔ ｅｔ ａｌ （２００５）Ａｎａｌｙｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２２６（２），３４２－３４８に記載されている、表面プラズモン共鳴アッセイ（ＳＰＡ）を含む。ＳＰＡビーズに固定化されたＧＰＣＲ変異体は、例えば、蛍光基で標識された１つのリガンドと共にインキュベートされてよく、又はリガンドは放射性リガンドであってよい。ＧＰＣＲ変異体への試験化合物の結合能は、蛍光リガンド又は放射性リガンドを置き換えるその能力を介して測定してよい。他の例では、ＧＰＣＲ変異体をチップ表面に固定化し、試験化合物の結合を、表面プラズモン共鳴及びエバネッセント波を使用する関連技術によって検出する。結合化合物の量、相互作用の親和性及び会合解離のキネティクスを測定するには屈折率の変化が使用できる。このアプローチの一例は、長いアルキル基で修飾されたカルボキシル化デキストラン表面に固定化されたロドプシンに関して記述されている。界面活性剤で可溶化された受容体のアミンカップリング後、脂質／界面活性剤混合ミセルが固定化表面に付着した。その後、界面活性剤は緩衝液流に溶出され、残存する脂質はチップ表面で二重層を形成した（Ｋａｒｌｓｓｏｎ ＯＰ，Ｌｏｆａｓ Ｓ．，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００２ Ｊａｎ １５；３００（２）：１３２－８）。

【０２８５】

試験化合物がペプチド又はタンパク質、例えば、オーファン受容体に対するリガンド又は相互作用性タンパク質である場合は、結合リガンドを溶出し、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）又はエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）などの質量分析法によって同定してよい（Ｗｉｌｌｉａｍｓ Ｃ．Ａｄｄｏｎａ ＴＡ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０００ Ｆｅｂ；１８（２）：４５，Ｗｉｌｌｉａｍｓ Ｃ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０００ Ｆｅｂ；１１（１）：４２－６）。ＧＰＣＲ変異体は、カラム若しくはビーズに固定化してよく、又は細胞において標識形態で発現させ、タグに対する直接の試

薬又はＧＰＣＲに対する直接の試薬を使用してその様な複合体混合物からリガンドと共に同時精製してよい（Ｒｉｇａｕｔ Ｇ，Ｓｈｅｖｃｈｅｎｋｏ Ａ，Ｒｕｔｚ Ｂ，Ｗｉｌｍ Ｍ，Ｍａｎｎ Ｍ，Ｓｅｒａｐｈｉｎ Ｂ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９９ Ｏｃｔ；１７（１０）：１０３０－２）。

【０２８６】

ＧＰＣＲに対する高親和性の立体構造特異的結合パートナーを生成できることは、治療用のＧＰＣＲ結合パートナーの生産を促進するであろう。かくして、ＧＰＣＲへの結合を確立することに加えて、ＧＰＣＲに対する結合パートナーの機能的影響を測定することも望ましいと解されるであろう。

【０２８７】

したがって、本発明の１つの実施態様では、前記方法は、結合パートナーが、結合するＧＰＣＲの機能に影響を及ぼすか否かを測定し、そしてＧＰＣＲの機能に影響を及ぼす試験化合物を単離することをさらに含む。

【０２８８】

例えば、１つの実施態様では、結合パートナーがＧＰＣＲのリガンドへの結合を変化させるか否かが測定される。リガンドによって、本願では、ＧＰＣＲに結合し、且つ、上述のようにＧＰＣＲに特定の立体構造を備えさせる任意の分子が含まれる。好ましくは、リガンドは、そのＧＰＣＲの天然リガンド又はその類似体である。リガンドへのＧＰＣＲの結合は、当該技術分野において知られる標準的なリガンド結合法を使用して、例えば上述のようにアッセイしてよい。例えば、リガンドは放射標識又は蛍光標識されてよい。結合アッセイは、安定化ＧＰＣＲ変異体又は親ＧＰＣＲを使用して実施してよい。典型的には、安定化ＧＰＣＲを精製するか又は哺乳動物、細菌若しくは昆虫細胞などの細胞において発現させる。典型的には、親受容体を哺乳動物、細菌又は昆虫細胞などの細胞において発現させる。アッセイは、全細胞に関して又は細胞から得た膜に関して実施してよい。結合パートナーは、標識リガンドの結合を変化させるその能力によって特徴づけられるであろう。

【０２８９】

１つの実施態様では、結合パートナーは、ＧＰＣＲとそのリガンドの間の結合を低下させる。例えば、結合パートナーは、結合を少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍又は１０００倍低下させてよい。好ましくは、結合パートナーは結合を１００から１０００倍、例えば１０から１００倍低下させる。

【０２９０】

１つの実施態様では、結合パートナーは、ＧＰＣＲとそのリガンドとの間の結合を上昇させる。例えば、結合パートナーは、結合を少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍又は１０００倍上昇させてよい。好ましくは、結合パートナーは結合を１００から１０００倍、例えば１０から１００倍上昇させる。

【０２９１】

更なる実施態様では、結合パートナーがＧＰＣＲの活性を調節するか否かが測定される。例えば、アゴニスト立体構造で安定化されたＧＰＣＲ変異体が本発明の方法の工程（ａ）で提供される場合、選択されるパートナーはアゴニスト結合パートナーであり、それゆえＧＰＣＲの活性化を上昇させてよい。アンタゴニスト立体構造で安定化されたＧＰＣＲ変異体が本発明の方法の工程（ａ）で提供される場合、選択される結合パートナーはアンタゴニスト結合パートナーであり、それゆえＧＰＣＲの活性化を低下させてよい。

【０２９２】

このアッセイでは、親ＧＰＣＲ又は安定化ＧＰＣＲ変異体はインビボで、例えば、ＧＰＣＲが、よく知られたＧＰＣＲシグナル伝達経路に結合することが可能である哺乳動物又は昆虫細胞において発現される（Ｅｇｌｅｎ Ｒ．Ｍ．Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇ ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｏｕｐｌｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｓｓａｙｓ ｆｏｒ ｐｒｉｍａｒ

y and secondary screening. Comb Chem High Throughput Screen. 2005 Jun；8（4）：311－8）。その様なアッセイは以下を含む：カルシウム可動化（Gonzalez JE, Maher MP. Cellular fluorescent indicators and voltage／ion probe reader（VIPR）tools for ion channel and receptor drug discovery. Receptors Channels. 2002；8（5－6）：283－95, Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Detheux M. Aequorin－based functional assays for G－protein－coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. Receptors Channels. 2002；8（5－6）：319－30）、cAMPレベルの変化（Weber M, Ferrer M, Zheng W, Inglese J, Strulovici B, Kunapuli P. A 1536－well cAMP assay for Gs－and Gi－coupled receptors using enzyme fragmentation complementation. Assay Drug Dev Technol. 2004 Feb；2（1）：39－49.）、キナーゼ経路の活性化（Leroy D, Missotten M, Waltzinger C, Martin T, Scheer A. G protein－coupled receptor－mediated ERK1／2 phosphorylation：towards a generic sensor of GPCR activation. J Recept Signal Transduct Res. 2007；27（1）：83－97）、例えばレポーター遺伝子の使用を介した、遺伝子転写の調節（Liu B, Wu D. Analysis of the coupling of G12／13 to G protein－coupled receptors using a luciferase reporter assay. Methods Mol Biol. 2004；237：145－9, Kent TC, Thompson KS, Naylor LH. Development of a generic dual－reporter gene assay for screening G－protein－coupled receptors J Biomol Screen. 2005 Aug；10（5）：437－46）、β－アレスチンのレクルートメント（Hudson CC, Oakley RH, Sjaastad MD, Loomis CR. High－content screening of known G protein－coupled receptors by arrestin translocation Methods Enzymol. 2006；414：63－78）、GTPアーゼ活性の測定などのGタンパク質の活性化（Jameson EE, Roof RA, Whorton MR, Mosberg HI, Sunahara RK, Neubig RR, Kennedy RT. Real－time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. J Biol Chem. 2005 Mar 4；280（9）：7712－9）、又は［35S］GTPγS結合の測定（Rodgers G, Hubert C, McKinzie J, Suter T, Statnick M, Emmerson P, Stancato L. Development of displacement binding and GTPgammaS scintillation proximity assays for the identification of antagonists of the micro－opioid receptor. Assay Drug Dev Technol. 2003 Oct；1（5）：627－36）。

【0293】

典型的には、受容体の活性化を調節する結合パートナーが選択される。

【０２９４】

アゴニスト結合パートナーに関しては、結合パートナーは、典型的には受容体の天然リガンドの活性を模倣し、受容体の活性化、Ｇタンパク質の活性化又はシグナル伝達の上昇を生じさせるであろう。これは付加的なアゴニストの不在下で起こる。アゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍、１０００倍又は１００００倍上昇させてよい。

【０２９５】

結合パートナーが受容体の活性化を上昇させ得る２つの方法があると解されるであろう。例えば、結合パートナーは直接アゴニストとして作用してよく、その場合受容体の活性化は、典型的には２から１０００倍高められる。他の方法では、結合パートナーはアゴニストの活性を増幅するように作用してよい。例えば、結合パートナーはアゴニストの作用強度を上昇させてよく、その場合受容体の活性化は、典型的には２から１０００倍、例えば１０から１００倍高められ、又は結合パートナーはアゴニストによってもたらされる最大応答を上昇させてよく、その場合受容体の活性化は、典型的には２から１０倍高められる。内因性リガンドによって既にスイッチが入った受容体の活性を活性化／増幅する工程は、より生理的に特異的であり、脱感作及び望ましくない副作用などの問題を軽減し得るので、全ての利用可能な受容体のスイッチを入れるために好ましいと解されるであろう（Ｃｈｒｉｓｔｏｐｏｕｌｏｓ Ａ（２００２）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ １：１９８－２１０）。

【０２９６】

アンタゴニスト結合パートナーの場合には、結合パートナーは、典型的には受容体の活性又はアゴニストによるその活性化をブロックするように働く。アンタゴニスト結合パートナーは、アゴニストの結合をブロックすることによって又はＧタンパク質に共役することが不可能であるように受容体を不活性形態に固定することによってこれを行ってよい。アンタゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍、１０００倍又は１００００倍低下させてよい。典型的には、アンタゴニスト結合パートナーは、受容体の活性化を検出不能なレベルに低下させるであろう。

【０２９７】

複数のＧＰＣＲに結合する試験化合物又は試験化合物の組み合わせを生成することが望ましい場合があると解されるであろう。例えば、試験化合物は同じクラスのファミリーの複数のＧＰＣＲに結合してよい。ＧＰＣＲのクラス及びファミリーのリストが、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｏｎ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ（Ｆｏｏｒｄ ｅｔ ａｌ（２００５）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５７，２７９－２８８）によって作成されており、このリストはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｕｐｈａｒ－ｄｂ．ｏｒｇ／ＧＰＣＲ／ＲｅｃｅｐｔｏｒＦａｍｉｌｉｅｓＦｏｒｗａｒｄにおいて定期的に更新されている。試験化合物は、１つの標的ＧＰＣＲ及び少なくとも１つの更なるＧＰＣＲに結合してよい。少なくとも１つの更なるＧＰＣＲは、疾患経路に関係があるとされてきたＧＰＣＲ、又は標的ＧＰＣＲと同じシグナル伝達経路、例えば疾患経路を制御する若しくは調節するシグナル伝達経路に関与するＧＰＣＲであってよい。加えて、少なくとも１つの更なるＧＰＣＲは、標的ＧＰＣＲに対する試験化合物の作用を増強する又は抑制するものであってよい。その様な作用の増強又は抑制は、結合アッセイ及び、例えば上述の、機能的アッセイを含む、当該技術分野においてよく知られた方法を使用して測定してよい。

【０２９８】

したがって、１つの実施態様では、複数のＧＰＣＲ変異体が工程（ａ）で提供される。例えば、異なる親ＧＰＣＲの少なくとも２、３、４又は５つのＧＰＣＲ変異体が工程（ａ）で提供されてよい。かくして、この実施態様では、複数のＧＰＣＲに結合する試験化合物が選択される。化合物は、例えば、低分子、アフィボディ、抗体又はダイアボディを含

む交差反応性化合物であってよい。その様なアプローチは結合パートナーの効果又は作用強度の改善をもたらし得ると解されるであろう。

【０２９９】

かくして、第一と第二のＧＰＣＲに結合する試験化合物が選択されてよく、この場合、第一と第二のＧＰＣＲは任意の対のＧＰＣＲであってよい。例えば、前記方法を使用して、ヘテロ二量体を形成するＧＰＣＲに結合する二価パートナーを選択してよく、この場合、二価パートナーは両方の受容体に同時に結合してよい。これに関する適切なＧＰＣＲヘテロ二量体の例は、ドーパミンＤ１及びアデノシンＡ１、オピオイド受容体ヘテロ二量体、カンナビノイドＣＢ１及びオレキシン受容体を含む（Ｍａｒｓｈａｌｌ ＦＨ．Ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇ－ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｏｕｐｌｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ｉｎ ｔｈｅ ＣＮＳ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２００１ Ｆｅｂ；１（１）：４０－４；Ｋｅｎｔ Ｔ，ＭｃＡｌｐｉｎｅ Ｃ，Ｓａｂｅｔｎｉａ Ｓ，Ｐｒｅｓｌａｎｄ Ｊ．Ｇ－ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｏｕｐｌｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ：ａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｄｅｖｅｌ．２００７ Ｓｅｐ；１０（５）：５８０－９）。さらに、増強された治療活性のために２つの独立した受容体に結合して、それらの受容体の活性を調節する結合パートナーが選択されてよい。例えば、ＣＣＫ１／オピオイド受容体ペプチドは、ＣＣＫ１とオポイド受容体の両方に結合する（Ｇａｒｃｉａ－Ｌｏｐｅｚ ＭＴ，Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ｍｕｎｉｚ Ｒ，Ｍａｒｔｉｎ－Ｍａｒｔｉｎｅｚ Ｍ，Ｈｅｒｒａｎｚ Ｒ．Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｎｏｎ ｐｅｐｔｉｄｅ ＣＣＫ１ Ｒ ａｇｏｎｉｓｔ／ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ｌｉｇａｎｄｓ．Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ．２００７；７（１２）：１１８０－９４）。他の適切な例は、β２アゴニストとムスカリンアンタゴニストの組み合わせ；ドーパミンＤ２と５ＨＴ２アンタゴニストの組み合わせ；Ｄ２アンタゴニストと５ＨＴ６アンタゴニストの組み合わせ；及びＭ１アゴニストと５ＨＴ６アンタゴニストの組み合わせを含む。

【０３００】

工程（ａ）で提供される複数のＧＰＣＲは、同じ立体構造を備えてよく又は同じ立体構造を備えなくてもよいと解されるであろう。例えば、ダイアボディ又は同様の二価結合パートナーは、分子の一方の末端でアゴナイズし、他方の末端でアンタゴナイズしてよく、この場合、ＧＰＣＲは同じ立体構造を備える必要はないであろう。

【０３０１】

典型的には、複数のＧＰＣＲに結合する試験化合物が選択される場合、試験化合物は同様の作用強度で各々のＧＰＣＲに結合する。典型的には、それらのＧＰＣＲの各々に結合する特定の結合パートナーのK_d値は、互いの５から１０倍の範囲内、例えば２から３倍の範囲内である。

【０３０２】

本発明の方法は、１つの試験化合物でこの方法を反復すること、この方法の１つのサイクルにおいて複数の試験化合物を提供すること、又はこの方法において試験化合物のライブラリーを使用することのいずれかによって、複数のＧＰＣＲに結合する試験化合物の組み合わせを単離することを可能にすると解されるであろう。

【０３０３】

更なる実施態様では、依然として第一のＧＰＣＲに結合することは可能であるが、少なくとも１つの他のＧＰＣＲ、例えば第二のＧＰＣＲには結合することができない、又は第一のＧＰＣＲよりも弱くしか結合できない試験化合物を選択することは好都合であろう。第一と第二のＧＰＣＲは任意の対のＧＰＣＲであってよいと解されるであろう。かくして、例えば、試験化合物は、第一のＧＰＣＲに結合することに基づいて選択されるものであってよいが、そのようにして選択された試験化合物は、それが第二のＧＰＣＲに結合する（又は第一のＧＰＣＲよりも弱く第二のＧＰＣＲに結合する）か否かを測定するためにさらに試験される。第二のＧＰＣＲに結合しない（又は第二のＧＰＣＲに対して低い結合を

有する）試験化合物が選択される。結合パートナーが治療用分子である場合、その様なアプローチは結合パートナーの毒性を低下させるのに役立ち得る。

【０３０４】

試験化合物は、第一のＧＰＣＲに対して前記化合物が有する親和性の５０％未満、より好ましくは第一のＧＰＣＲに対して前記化合物が有する親和性の１０％未満、さらに好ましくは１％未満又は０．１％未満又は０．０１％未満の親和性で更なる（第二の）ＧＰＣＲに結合する。かくして、第一のＧＰＣＲと試験化合物の相互作用についてのK_dは、第二のＧＰＣＲについてのK_dよりも高い。

【０３０５】

本発明の第二の態様は、ＧＰＣＲの結合パートナーを生成するための方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の態様による方法を実施することによって同定可能な結合パートナーを合成することを含む。

【０３０６】

結合パートナーは、有機化学、分子生物学又は生化学の技術を含む、当該技術分野において知られる任意の適切な方法によって合成してよい。例えば、結合パートナーがポリペプチドである場合、結合パートナーは、当該技術分野において知られるように、結合パートナーをコードする核酸分子を適切な宿主細胞において発現させることによって作製してよい。抗体は、例えば、組換えＤＮＡ技術を含む上述の方法のいずれかを使用して合成してよい。

【０３０７】

本発明の第三の態様は、本発明の第一の態様の方法のいずれかによって得られる結合パートナーを提供する。

【０３０８】

１つの実施態様では、結合パートナーは、上述した立体構造特異的結合パートナーである。

【０３０９】

本発明の第四の態様は、本発明の第一の態様の方法のいずれかによって得ることが可能な結合パートナー、例えば立体構造特異的結合パートナーを提供する。

【０３１０】

結合パートナーは、ポリペプチド：アンチカリン；ペプチド；抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；アプタマー；ダルピン；Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ若しくはｄＡｂ抗体断片；低分子；天然生成物；アフィボディ；ペプチドミメティック；核酸；ペプチド核酸分子；脂質；炭水化物；アンキリンリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラリオペプチドリピートタンパク質若しくは設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）を含むモジュールフレームワークに基づく結合タンパク質；又はリポカリン若しくはフィブロネクチンドメイン又はヒトγクリスタリン若しくはヒトユビキチンのいずれかに基づくアフィリンスカフォールド、に基づくタンパク質の任意のものであってよい。

【０３１１】

好ましい実施態様では、結合パートナーは抗体である。例えば、抗体は、ＧＰＣＲにおける非隣接エピトープに特異的であってよく、又はＧＰＣＲにおける隣接するエピトープに特異的であってよい。好ましくは、抗体によって認識される親ＧＰＣＲ及びＧＰＣＲ変異体における関連エピトープは、それらが隣接しているか又は非隣接であるかにかかわらず、類似する。特に、親ＧＰＣＲ及びＧＰＣＲ変異体のＣ若しくはＮ末端又はポリペプチドループなどの細胞外エピトープは、好ましくは類似する。

【０３１２】

典型的には、結合パートナーは、親ＧＰＣＲに対してと同様の作用強度でＧＰＣＲ変異体に結合。典型的には、ＧＰＣＲ変異体及び親ＧＰＣＲに結合する特定の結合パートナーについてのK_d値は、互いに５から１０倍、例えば２から３倍の範囲である。典型的には、親ＧＰＣＲと比較してＧＰＣＲ変異体に対する結合パートナーの結合は、最大で５倍弱

く、最大で１０倍強いであろう。

【０３１３】

典型的には、選択された立体構造で安定化された受容体変異体は、親受容体と同程度（すなわち、典型的には２から３倍以内）又はそれ以上の親和性で結合パートナーに結合するはずである。アゴニスト立体構造の結合パートナーに関して、前記変異体は、典型的には、親ＧＰＣＲと同程度又はそれよりも高い親和性で前記アゴニストと結合し、典型的には、親ＧＰＣＲと同程度又はそれ未満の親和性でアンタゴニストと結合する。同様に、アンタゴニスト立体構造の結合パートナーに関して、前記変異体は、典型的には、親ＧＰＣＲと同程度又はそれよりも高い親和性でアンタゴニストと結合し、典型的には、親ＧＰＣＲと同程度又はそれ未満の親和性でアゴニストと結合する。

【０３１４】

本発明の方法は、分子、特に生体分子などの標的物質を検出するためのバイオセンサーとして使用してよいと解される。例えば、前記バイオセンサーは、診断又は予後徴候として使用し得る疾患又は薬剤治療のバイオマーカーを検出するために使用してよい。ＧＰＣＲ変異体をセンサー表面に固定化し、例えば、上述の表面プラズモン共鳴によって、化合物の結合を検出してよい。バイオセンサーの更なる例では、受容体に結合する化合物を、内在性トリプトファン蛍光の変化によって又は内在性トリプトファン常在ドナーと蛍光アクセプターとの間の蛍光共鳴エネルギー移動を使用して検出してよい（Ｌａｋｏｗｉｃｚ ＪＲ １９９９．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｍａｒｔｉｎ ＤＤ，Ｂｕｄａｍａｇｕｎｔａ ＭＳ，Ｒｙａｎ ＲＯ，Ｖｏｓｓ ＪＣ，Ｏｄａ ＭＮ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００６ Ｊｕｌ ２１；２８１（２９）：２０４１８－２６）。代替的には、ＧＰＣＲ変異体を音響バイオセンサーとして使用してよく、その場合は、ＧＰＣＲ変異体を水晶振動子センサー（ＱＣＲＳ）に固定化し、音響センサー応答を化合物－ＧＰＣＲ変異体結合相互作用を検出するために使用する（Ｃｏｏｐｅｒ ＭＡ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ．２００６ Ｄｅｃ；１１（２３－２４）：１０６８－７４．Ｅｐｕｂ ２００６ Ｏｃｔ ２０）。

【０３１５】

したがって、本発明の第五の態様は、親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有する親ＧＰＣＲのＧＰＣＲ変異体を含むバイオセンサーであって、標的物質が前記ＧＰＣＲ変異体に結合した場合、検出可能なシグナルが生成されるバイオセンサーを提供する。

【０３１６】

ＧＰＣＲ変異体及びそれらの生成の方法は、本発明の第一の態様に関して上記で規定したものであることが好ましい。

【０３１７】

好ましくは、バイオセンサーはチップ形態又はビーズ支持形態であり、ＧＰＣＲ変異体はチップ又はビーズに固定化され、標的物質を検出するために使用される。しかしながら、ＧＰＣＲ変異体は可溶化形態で提供されてよく、その場合バイオセンサーは溶液を含むと解されるであろう。

【０３１８】

バイオセンサーへの組込みのための固体支持体へのＧＰＣＲ変異体の固定化は、当該技術分野でよく知られ、本発明の第一の態様に関して上述した方法を使用して実施してよい。典型的には、ＧＰＣＲ変異体は、流量依存性表面再構成（ｆｌｏｗ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｓｕｒｆａｃｅ ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）を介した直接バイオセンサー分析に適するチップ表面に再構成される（Ｋａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３００，１３２－１３８（２００２））。例えば、長いアルキル基で修飾されたカルボキシル化デキストラン表面へのＧＰＣＲの迅速な固定化と再構成は、界面活性剤で可溶化された受容体のアミンカップリング後に達成可能である；多くのバイオセンサーシステムにおいて存在する内蔵フローセルを利用して、それらを

固定化表面に注入したとき、脂質／界面活性剤混合ミセルが付着する。界面活性剤はその後の緩衝液流に溶出され、機能性で無傷のＧＰＣＲ変異体がその後のスクリーニングと分析のために残される。界面活性剤を含有するその様なＧＰＣＲ変異体製剤は、水晶膜厚計バイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、プレーナー導波路バイオセンサー、表面ラマンセンサー、又は表面プラズモン共鳴バイオセンサーなどの、フローベースのバイオセンサーにおける使用に理想的に適する。後者の場合、可溶化された受容体は、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（Ｂｉａｃｏｒｅ） ＣＭ４又はＣＭ５デキストランセンサーチップ上に捕捉されてよい。センサーチップのデキストランマトリックスを、５μＬ／分の流速の３５μＬの５０ｍＭ Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド及び２００ｍＭ Ｎ－エチル－Ｎ－［（ジメチルアミノ）プロピル］カルボジイミド、次いで０．１ｍｇ／ｍＬの界面活性剤で可溶化されたＧＰＣＲ受容体（例えば、１０ｍＭ ＭＯＰＳ、ｐＨ７．５中の２５ｍＭ ＣＨＡＰＳ）の７分間の注入によって活性化する。残存する反応性カルボキシ基は、１Ｍ塩酸エタノールアミン、ｐＨ８．５の７分のパルスを使用して不活性化する。注入後、バイオセンサーチップを、安定な基線が回復されるまで（約３０分間）表面プラズモン共鳴作業溶液により高流量で洗浄する。この洗浄工程はフロー透析手順と同様に機能し、センサーチップ表面からの界面活性剤の除去を確実にする；しかし、ＧＰＣＲの疎水性部分は、機能的完全性を維持するために依然として一部の脂質又は界面活性剤分子に結合していてよいと解されるであろう。

【０３１９】

標的物質は、分子、生体分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、ＧＰＣＲリガンド、合成分子、薬剤、薬剤代謝産物又は疾患バイオマーカーの任意のものであってよい。

【０３２０】

１つの実施態様では、検出可能なシグナルは、色の変化；蛍光；エバネッセンス；表面プラズモン共鳴；電気伝導度若しくは電荷分離；紫外、可視若しくは赤外吸収；発光；化学発光；電気化学発光；蛍光異方性；蛍光強度；蛍光寿命；蛍光偏光；蛍光エネルギー移動；分子量；電子スピン共鳴；核磁気共鳴；流体力学的容積若しくは半径；比重；シンチレーション；電界効果抵抗；電気インピーダンス；音響インピーダンス；量子消失（ｑｕａｎｔｕｍ ｅｖａｎｅｓｃｅｎｃｅ）；共鳴散乱；蛍光クエンチング；蛍光相関分光法；音響負荷；音響せん断波速度；結合力；又は界面応力のいずれかである。

【０３２１】

本発明を、以下の図面及び実施例を参照してより詳細に記載する。

【図面の簡単な説明】

【０３２２】

【図１】βＡＲにおけるアミノ酸変化は熱安定性を誘導する。安定性指数は、３２℃で３０分間に亘ってサンプルを加熱した後に変異体の残存する結合活性の％を示す。全ての値は、βAR_{34-424}（５０％、破線で示す）に対して標準化されて、アッセイの間の任意の実験のばらつきを除去する。バーは各変異体の安定性を示す。ｘ軸の文字は、変異に存在するアミノ酸を示す。βAR_{34-424}における本来のアミノ酸及びその位置は下に示す。βAR_{34-424}における同じアミノ酸に対応するバーは同じ色のものであり、最も良好な変異を矢印で示す。誤差は、測定を重複して行って算出し、最も良好な変異体は、その後に再びアッセイして各変異についてのＴｍを測定し、各変異体についての安定性の正確な順位を得た（実施例１参照）。

【図２】βAR_{34-424}における熱安定化変異に対応する位置であるロドプシンにおける側鎖。βAR_{34-424}における変異アミノ酸残基に対応するロドプシンにおけるアミノ酸残基を、ロドプシン、β１アドレナリン受容体、ニューロテンシン受容体、及びアデノシンA_{2a}受容体の間のアラインメントに基づいて、ロドプシン構造に示す（データ示さず）。同じ膜貫通ヘリックスにおける側鎖は、同じ色の空間充填モデルとして示す。アミノ酸残基の名前及び位置はロドプシンのものである。

【図３】βＡＲにおける熱安定性の進化。βＡＲ－ｍ１０－８から出発して、変異の組み

合わせを系統的に再配列させて、変異の最適な組み合わせを見出した（表２参照）。
【図４】ａｐｏ－ｓｔａｔｅ又は結合したアンタゴニスト［^{3}Ｈ］－ＤＨＡの含有におけるβＡＲ－ｍ２３及びβＡＲ$_{34-424}$の安定性。リガンドの非存在下（ａｐｏ－ｓｔａｔｅ、破線）においてＴｍを測定するために、界面活性剤で可溶化した受容体を、結合アッセイを実施する前に、所定の温度で３０分に亘ってインキュベートした。アンタゴニストが結合した形態のＴｍ測定のために（連続線）、界面活性剤で可溶化した受容体を、［^{3}Ｈ］－ＤＨＡと事前インキュベートした後に所定の温度でインキュベートした。βＡＲ－ｍ２３（丸）及びβＡＲ$_{34-424}$（四角）。データポイントは、代表的な実験の二回重複した測定によるものである。
【図５】βＡＲ－ｍ２３及びβＡＲ$_{34-424}$に対するアゴニストの競争的結合。結合アッセイをＤＤＭ中で部分的に精製した受容体に対して実施した；βＡＲ－ｍ２３（三角）及びβＡＲ$_{34-424}$（四角）。［^{3}Ｈ］－ＤＨＡは部分的に精製した受容体のＫ$_{D}$の三倍大きい濃度で使用した（方法参照）。［^{3}Ｈ］－ＤＨＡ結合は、アゴニストであるノルエピネフリン（ａ）及びイソプレナリン（ｂ）又はアンタゴニストであるアルプレノロール（ｃ）の濃度の増大とともに競争的であった。異なるリガンドについてのＬｏｇＥＣ$_{50}$及び対応するＥＣ$_{50}$値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して非線形回帰によって算出し、ＬｏｇＥＣ$_{50}$の誤差は１０％未満であった。βＡＲ$_{34-424}$及びβＡＲ－ｍ２３に対するリガンド結合のＥＣ$_{50}$は、ノルエピネフリン、βＡＲ$_{34-424}$１．５μＭ、βＡＲ－ｍ２３　３．７ｍＭ；イソプレナリン、βＡＲ$_{34-424}$３３０ｎＭ、βＡＲ－ｍ２３　２０μＭ；アルプレノロール、βＡＲ　７８ｎＭ、βＡＲ－ｍ２３　１１２ｎＭ。
【図６】５種の異なる界面活性剤におけるβＡＲ－ｍ２３及びβＡＲ$_{34-424}$の安定性。ＤＤＭ中で可溶化したβＡＲ－ｍ２３（ａ）及びβＡＲ$_{34-424}$（ｂ）のサンプルは、各種の異なる界面活性剤：ＤＤＭ（四角）、ＤＭ（三角）、ＯＧ（逆三角）、ＬＤＡＯ（菱形）、及びＮＧ（丸）に交換することが可能なＮｉ－ＮＴＡアガロースカラムで部分的に精製した。βＡＲはＯＧ、ＮＧ、及びＬＤＡＯ中で非常に不安定であるため、６℃で精製した後に任意の活性を測定することが不可能であった。アッセイは方法に記載のように実施し、曲線及び破線の間の交差下部分でＴｍを示している。結果は、平行に実施した代表的な実験の二回重複した試験によるものである。（ｃ）βＡＲ－ｍ２３変異体の結晶の顕微鏡写真であり、Ｘ線回折による良好な秩序を示した。
【図７】βＡＲ$_{34-424}$の熱安定性曲線（Ｔｍ）。結合アッセイを、「方法」に記載したように放射リガンドである［^{3}Ｈ］－ジヒドロアルプレノロール（ＤＨＡ）を使用して実施した。サンプルをアッセイの前に異なる温度で３０分間に亘って加熱した。Ｔｍは結合が５０％まで低減する温度を表わし、その値を破線で示す。データポイントは、単独の試験の二回重複によるものである。この実験を数回繰り返し、同様の結果であった。
【図８】βＡＲ$_{34-424}$及びβＡＲ－ｍ２３の膜の飽和結合アッセイ。結合アッセイは、放射リガンドとして［^{3}Ｈ］－ジヒドロアルプレノロール（ＤＨＡ）使用する「方法」に記載のように実施した；βＡＲ$_{34-424}$（ａ）及びβＡＲ－ｍ２３（ｂ）。スカッチャードプロットは、Ｂ$_{max}$及びＫ$_{D}$についての対応する値とともに差込図として示した。データポイントは、各タンパク質の２つの独立した実験の二回重複によるものである。データは、Ｐｒｉｓｍソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用して非線形回帰によって分析した。
【図９Ａ】ヒトβ１、β２、及びβ３受容体とシチメンチョウβ－アドレナリン受容体とのアラインメント。
【図９Ｂ】ヒトβ１、β２、及びβ３受容体とシチメンチョウβ－アドレナリン受容体とのアラインメント。
【図１０Ａ】ヒトアデノシン受容体のアラインメント。
【図１０Ｂ】ヒトアデノシン受容体のアラインメント。
【図１１Ａ】ニューロテンシン受容体のアラインメント。
【図１１Ｂ】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図１２】受容体熱安定性を測定するために使用するリガンド（＋）及びリガンド（－）の２つの異なるアッセイ様式を示すフローチャート。
【図１３Ａ】熱安定性アデノシンＡ２ａ受容体変異体であるＲａｎｔ２１の薬理学的プロフィール。（Ａ）アンタゴニスト及び（Ｂ）アゴニストの可溶化受容体に対する飽和結合。（Ｃ－Ｆ）アンタゴニストである（Ｃ）ＸＡＣ及び（Ｄ）テオフィリン並びにアゴニストである（Ｅ）ＮＥＣＡ及び（Ｆ）Ｒ－ＰＩＡの濃度の増大による［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５結合の阻害；未標識リガンドの不在下における［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５（１０ｎＭ）の結合は１００％に設定した。各可溶化受容体は、４００ｍＭ ＮａＣｌを含有する結合緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５及び０．０２５％ ＤＤＭ）中で氷上において１時間に亘ってリガンドとインキュベートした（Ａ、Ｃ－Ｆ）。示されているデータは、三回重複して測定した各データポイントで、２つの独立した実験によるものである。K_D及びK_i値は表（ｉｉｉ）に示す。
【図１３Ｂ】熱安定性アデノシンＡ２ａ受容体変異体であるＲａｎｔ２１の薬理学的プロフィール。（Ａ）アンタゴニスト及び（Ｂ）アゴニストの可溶化受容体に対する飽和結合。（Ｃ－Ｆ）アンタゴニストである（Ｃ）ＸＡＣ及び（Ｄ）テオフィリン並びにアゴニストである（Ｅ）ＮＥＣＡ及び（Ｆ）Ｒ－ＰＩＡの濃度の増大による［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５結合の阻害；未標識リガンドの不在下における［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５（１０ｎＭ）の結合は１００％に設定した。各可溶化受容体は、４００ｍＭ ＮａＣｌを含有する結合緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５及び０．０２５％ ＤＤＭ）中で氷上において１時間に亘ってリガンドとインキュベートした（Ａ、Ｃ－Ｆ）。示されているデータは、三回重複して測定した各データポイントで、２つの独立した実験によるものである。K_D及びK_i値は表（ｉｉｉ）に示す。
【図１４】熱安定変異体は、野生型受容体と比較した際の加熱に対する、脂質（Ａ）依存性の低減及びＤＤＭ（Ｂ）のより高い濃度における増大された生存を示す。受容体は、１％ＤＤＭ（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５及び４００ｍＭ ＮａＣｌ）で可溶化し、ＩＭＡＣ工程についてＮｉ－ＮＴＡアガロースに固定化した。ＤＤＭ及び／又は脂質の適当な濃度を含有する緩衝液の交換を、Ｎｉ－ＮＴＡビーズからの洗浄及び溶出の間に実施した。
【図１５】ヒトβ２アドレナリン受容体構造における相同残基（Ｍ８２、Ｙ２１９、Ｃ２６５、及びＡ３２１）に対する、シチメンチョウβ１アドレナリン受容体におけるＭ９０Ｖ、Ｙ２２７Ａ、Ａ２８２Ｌ、及びＦ３３８Ｍ ｍ２３変異のマッピング（Rasmussenet al (2007) Nature 15;383-387; pdb accession codes 2R4R and 2R4S ）が、ヘリックス界面及びヘリックスの折れ曲がり（キンク）の各々に位置することを明らかにする。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定変異に対応する位置におけるアミノ酸残基を、標識空間充填モデルとして示している。
【図１６】ヒトβ２アドレナリン受容体構造における相同残基に対する、シチメンチョウβ１アドレナリン受容体におけるｍ２３のマッピング（Cherezov et al (2007) Science, 318:1258-65; pdb accession code 2RH1）。β２ＡＲのＣαトレースが、除去された誘導部分（Ｔ４リソザイム）で示される。βＡＲ－ｍ２３における６つの変異（R68S, M90V, Y227A,A282L, F327A, F338M）は、ヒトβ２ＡＲにおけるアミノ酸残基K60, M82, Y219, C265, L310, F321と対応する。Ｌｙｓ６０は、ヘリックス１の細胞内末端上に位置し、脂質－水界面を向いている。Ｍｅｔ８２はヘリックス２の中央部付近に存在し、リガンド結合ポケットを向いている；基質であるカラゾロールとＭｅｔ側鎖との最も近接した間隔は５．７Åである。Ｔｙｒ２１９はヘリックス５の細胞内末端に対し、ヘリックス５－ヘリックス６界面に存在する。Ｃｙｓ２６５はヘリックス５と６の間のループ領域の末端に存在し、膜貫通領域の反対の方向に向いている。Ｌｅｕ３１０及びＰｈｅ３２１の双方はヘリックス７に存在し、双方が脂質二重層を向いている。
【図１７】ヒトβ－２ＡＲ、ラットＮＴＲ、シチメンチョウβ－１ＡＲ、ヒトアデノシンＡ２ａＲ、及びヒトムスカリンＭ１受容体の多重配列アラインメント。各配列において、熱安定化変異が四角で囲って印を付けている。２以上の配列に生じている変異を星で示す

。
【図１８】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異１５５Ａのマッピング（ヒトβ２ＡＲＩ４７）。変異は、３ヘリックス（Ｈ１、Ｈ２折れ曲がり（キンク）、Ｈ７折れ曲がり（キンク））の間の界面に存在する。左：側面図；右：平面図である。
【図１９】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｖ８９Ｌのマッピング（ヒトβ２ＡＲＶ８１）。変異は、ヘリックス２の折れ曲がり（キンク）に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基は空間充填モデルとして示しており、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。
【図２０】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｍ９０Ｖのマッピング（ヒトβ２ＡＲＭ８２）。変異は、結合ポケットに対して向いているヘリックス２の折れ曲がり（キンク）に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストを空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基は、空間充填モデルとして示しており、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図であった。
【図２１】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｉ１２９Ｖのマッピング（ヒトβ２ＡＲＩ１２１）。変異はヘリックス５の折れ曲がり（キンク）の逆に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストを空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：底面図である。
【図２２】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｆ３３８Ｍのマッピング（ヒトβ２ＡＲＦ３２１）。変異はヘリックス７の折れ曲がり（キンク）に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。
【図２３】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｙ２２７Ａのマッピング（ヒトβ２ＡＲＹ２１９）。変異はヘリックス－ヘリックス界面に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：底面図である。
【図２４】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ａ２８２Ｌのマッピング（ヒトβ２ＡＲＣ２６５）。変異はループ領域に存在する。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：平面図である。
【図２５】ヒトβ２ＡＲ構造（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）に対する、シチメンチョウβ１ＡＲ変異Ｒ６８Ｓのマッピング（ヒトβ２ＡＲＫ６０）。変異は脂質－水境界に存在し、溶媒に向いている。ヘリックスは番号付けして、結合したアンタゴニストは空間充填モデルとして示す。シチメンチョウβ１アドレナリン受容体における熱安定化変異に対応する位置のアミノ酸残基を空間充填モデルとして示し、明確にするために矢印で示す。左：側面図；右：斜視図である。
【図２６】３つのβアドレナリン受容体（シチメンチョウβ１（■）、ヒトβ１（▼）、及びヒトβ２（●））並びに２つの熱安定化受容体（シチメンチョウβ１－ｍ２３（▲）及びヒトβ２－ｍ２３（◆））の熱安定性の比較。β１－ｍ２３における６つの熱安定化

変異（Ｒ６８Ｓ、Ｍ９０Ｖ、Ｙ２２７Ａ、Ａ２８２Ｌ、Ｆ３２７Ａ、Ｆ３３８Ｍ）を、図９におけるアラインメントに基づいて、ヒトβ２受容体（Ｋ６０Ｓ、Ｍ８２Ｖ、Ｙ２１９Ａ、Ｃ２６５Ｌ、Ｌ３１０Ａ、Ｆ３２１Ｍ）に直接転用して、β２－ｍ２３を作製した。結果として得られる変異体は、哺乳動物細胞において一過的に発現させて、０．１％ドデシルマルトシドに可溶化して、マイナスリガンドフォーマット（ａｐｏ状態で加熱し、氷上で停止させ、３Ｈ－ＤＨＡを添加する）で熱安定性を評価した。シチメンチョウβ１及びβ２－ｍ２３の見かけのＴｍは、２３℃及び４５℃の各々であり、大腸菌で発現させた受容体において過去に認められているように２２℃のΔＴｍを示した。ヒトβ２及びβ２－ｍ２３のＴｍは、２９℃及び４１℃の各々であり、ａｐｏ受容体は１２℃で安定化されることが示された。このことは、１つの受容体から他の受容体に熱安定化変異を転用することが可能であるという概念を例示するものであり、この場合には５９％の配列同一性を有する。ヒトβ１受容体（Ｔｍ～１２℃）は、シチメンチョウβ１受容体よりも非常に低い安定性を示す。

【図２７】シチメンチョウβ１アドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、及びラットニューロテンシン受容体の、ヒトβアドレナリン受容体、ヒトアデノシン受容体、及びヒトニューロテンシン受容体の各々に対する同一性の割合。

【図２８Ａ】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図２８Ｂ】ニューロテンシン受容体のアラインメント。

【図２９】阻害性ｓｃＦｖ結合物質の同定のための典型的なリード化合物単離工程の概略図。

【図３０Ａ】ポリクローナルファージＥＬＩＳＡの結果。

【図３０Ｂ】モノクローナルファージＥＬＩＳＡの結果。（Ｂ）９６穴ＥＬＩＳＡプレートの横列Ａ～Ｈの縦列１～９を使用して６９の抗β－ＡＲファージクローンをスクリーニングした。

【図３１Ａ】β－アドレナリン受容体及び３つの無関係な対照タンパク質（ＣＤ８６－ＣＤ４、Ｎｏｔｃｈ１－Ｆｃ及びＮｏｔｃｈ１のＮＲＲ領域）を使用した特異性ファージＥＬＩＳＡ。２つのＥＬＩＳＡプレート、アミノプレート（Ａ）及びＨｉｓプレート（Ｂ）に被覆したタンパク質を示す。左から右の（Ｃ１、Ｅ２、Ａ３、Ｇ３、Ｃ４、Ｄ４、Ｆ４、Ｈ４、Ｄ５、Ｆ５、Ｇ５、Ｃ６、Ｄ６、Ｃ７、Ｆ７、Ｂ８及びＣ８）β－ＡＲファージクローン（影を付けた（ハシュ）バー）の名称は、図３０に示すスクリーニングに由来する。グラフにおいて、粘着性抗β－ＡＲクローンを対応するバーの上方にクローン名によって指示している。対照タンパク質、抗－ＣＤ８６（灰色のバー）、抗－Ｎ１　ＥＧＦ（白色のバー）及び抗－Ｎ１　ＮＲＲ（点々を付けたバー）に特異的な対照ファージ集団の結合も示す。

【図３１Ｂ】β－アドレナリン受容体及び３つの無関係な対照タンパク質（ＣＤ８６－ＣＤ４、Ｎｏｔｃｈ１－Ｆｃ及びＮｏｔｃｈ１のＮＲＲ領域）を使用した特異性ファージＥＬＩＳＡ。２つのＥＬＩＳＡプレート、アミノプレート（Ａ）及びＨｉｓプレート（Ｂ）に被覆したタンパク質を示す。左から右の（Ｃ１、Ｅ２、Ａ３、Ｇ３、Ｃ４、Ｄ４、Ｆ４、Ｈ４、Ｄ５、Ｆ５、Ｇ５、Ｃ６、Ｄ６、Ｃ７、Ｆ７、Ｂ８及びＣ８）β－ＡＲファージクローン（影を付けた（ハシュ）バー）の名称は、図３０に示すスクリーニングに由来する。グラフにおいて、粘着性抗β－ＡＲクローンを対応するバーの上方にクローン名によって指示している。対照タンパク質、抗－ＣＤ８６（灰色のバー）、抗－Ｎ１　ＥＧＦ（白色のバー）及び抗－Ｎ１　ＮＲＲ（点々を付けたバー）に特異的な対照ファージ集団の結合も示す。

【図３２】抗－β－ＡＲ抗体クローン（白色のバー）及び陽性対照抗体（黒色のバー）及び抗体なしの陰性対照（黒色のバー）を示す。

【図３３】ストレプトアビジン被覆フローセルへのビオチニル化β１ＡＲの２つの捕捉段階。Ａ～１２００ＲＵ捕捉；Ｂ～４０００ＲＵ捕捉。

【図３４】アルプレノールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。最高濃度は６６６ｎＭであり、各々の濃度を３倍希釈系列において３回試験した。応答は濃度依存性であり、極めて再現

性がある。線は、簡単な１：１相互作用モデルのフィットを表示し、このフィットから決定したパラメータを挿入図に列挙する（括弧内の数字は最後の桁の誤差である）。
【図３５】アルプレノールに対する標準化された応答。応答は、各々の曲線について決定した（フィッティングから）Ｒｍａｘに対して標準化されている。
【図３６】プロプラノロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。最高濃度は１１１ｎＭであり、各々の濃度を３倍希釈系列において２回又は３回試験した。
【図３７】プロプラノロールに対する標準化された応答。応答は、各々の曲線について決定した（フィッティングから）Ｒｍａｘに対して標準化されている。
【図３８】ほぼ３日齢のβ１ＡＲ表面上のアルプレノロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。
【図３９】８０００ＲＵの密度に対するβ１ＡＲの捕捉。
【図４０】８０００ＲＵのβ１ＡＲ表面に結合しているアルプレノロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。
【図４１】２つの異なる表面を使用したサルメテロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。サルメテロールを１．６７μＭの最高濃度を用いて試験し、各々の濃度を２回又は３回試験した。Ａ．４２００ＲＵ表面；Ｂ．８０００ＲＵ表面。８０００ＲＵ表面でより大きな応答が認められる。
【図４２】標準化された応答として示す、サルメテロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。Ａ．４２００ＲＵ表面；Ｂ．８０００ＲＵ表面。
【図４３】イソプロテレノールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。イソプロテレノールを２μＭの最高濃度を用いて試験した。Ａ．４２００ＲＵ表面；Ｂ．８０００ＲＵ表面。
【図４４】カルベジロールに対するＢｉａｃｏｒｅ応答。Ａ．５２００ＲＵ表面；Ｂ．８０００ＲＵ表面。
【図４５】［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５を使用して安定化アデノシンＡ２ａ受容体（Ｒａｎｔ２２）における活性について試験した一連の化合物に対する競争的結合曲線。
【実施例】
【０３２３】
（実施例１）
界面活性剤耐性形態におけるβ－アドレナリン受容体の立体構造安定化
要約
ヒトゲノムによってコードされる５００超の非嗅覚Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）が存在し、その多くが潜在的な治療標的であると予測されているが、ファミリーの全てを代表するものとしてウシロドプシンのみの構造が利用可能である。ＧＰＣＲ構造決定における進歩の欠落には多数の理由が存在するが、本発明者は、これらの受容体の界面活性剤安定性を改善すること、及び同時にそれらを１つの好ましい立体構造に固定化することが、結晶化の可能性を大幅に改善するであろうと仮説を立てた。ＧＰＣＲ、すなわちβ－アドレナリン受容体の界面活性剤可溶化熱安定化変異体の単離のための一般的な戦略は、アラニンスキャニング変異誘発、それに続く受容体安定性のアッセイに基づいて開発した。試験した３１８の変異体のうち、１５が安定性における測定可能な増大を示した。最初の変異部位の各々におけるアミノ酸の最適化の後に、最適に安定化した受容体を特定の変異を組み合わせることによって構築した。最も安定な受容体変異体であるβＡＲ－ｍ２３は、６つの点変異を有し、天然のタンパク質よりも結合したアンタゴニストの存在下で２１℃高いＴｍを生じさせ、βＡＲｍ２３はウシロドプシンと同程度に安定であった。加えて、βＡＲ－ｍ２３は広範な界面活性剤において顕著により安定で、結晶化に理想的であり、リガンドの不在下においてアンタゴニスト立体構造で好適に存在した。
【０３２４】
結果
β１アドレナリン受容体の熱安定性を増大する単一変異の選択
シチメンチョウ赤血球由来のβＡＲはよく特性決定されており、バキュロウイルス発現系を使用して昆虫細胞において高レベルで発現されるため、構造研究に理想的な対象であ

る（非特許文献１０、１１）。βＡＲの最も良好な過剰発現は、残基３４－４２４を含有する受容体の切断型を使用して得られ（βAR_{34-424}）（非特許文献９）、これが本研究の出発点として使用された。アラニンスキャニング変異誘発を使用して、変異した際に、受容体の熱安定性を変化させるβAR_{34-424}におけるアミノ酸を規定した；アラニンが配列中に存在する場合には、ロイシン残基に変異させた。全部で３１８の変異をアミノ酸残基３７－３６９、７つの膜貫通ドメインを含む領域、及びＣ末端の２３アミノ酸残基に作製した；１５アミノ酸残基における変異は、ＤＮＡ鋳型における強力な二次構造によって得られなかった。各変異体の配列決定をして所望の変異のみが存在することを確認した後に、受容体を大腸菌において機能的に発現させ、安定性についてアッセイした。

【０３２５】

熱安定性についてのアッセイは、受容体を３０分間に亘って３２℃で加熱し、氷上で反応を停止させ、次いで、アンタゴニストである［^{3}Ｈ］－ジヒドロアルプレノロールを使用して放射リガンド結合アッセイを実施して未処理の対象と比較して残存する機能的なβAR_{34-424}分子の数を測定することによって、未精製界面活性剤可溶化受容体に対して実施した。非変異βAR_{34-424}をアッセイ前に３０分間に亘って３２℃で加熱することで、未加熱の対照の約５０％まで結合が低減した（図７）；変異体についての全てのデータは、実施した全てのアッセイにおいて非変異βAR_{34-424}を対照として含めることによって標準化した。一巡目のスクリーニングにおいて、１８の変異が安定性における明らかな増大を示し、加熱後に７５％超のアゴニスト結合を保持し、天然のβAR_{34-424}の少なくとも５０％のレベルで大腸菌において発現した。これらの変異の更なる安定性の増大の可能性の観点から、１８残基の各々を２－５の異なるサイズ又は電荷の代替的なアミノ酸残基に変異させた（図１）。これら１８の変異体のうち、１２が更なる変化によって改善し、５が他のアミノ酸が存在する場合に更に良好な熱安定性を有し、第一のスクリーニングに由来する１つの変異が擬陽性であったことが明らかになった。加えて、アラニンへの変異では安定化されなかった３つの残基（Ｖ８９、Ｓ１５１、Ｌ２２１）を広範な他のアミノ酸残基に変異させた；アラニンに変異させた際に熱安定性に影響しなかった２つの位置は、他の変化によっても影響を受けなかった。対照的に、Ｖ８９はアラニンに変異させた際により低い熱安定性を示したが、Ｌｅｕに変異させた際は熱安定性が増大した。かくして、最初のアラニンスキャニングは、任意の所定の位置について試験したもののうち最も良好なアミノ酸残基の三分の二を示した。

【０３２６】

変異された際に熱安定性の最も良好な増大を示した１６のアミノ酸残基の各々について予測される位置及び環境を、構造が既知のロドプシンの配列とβＡＲ配列とのアラインメントによって決定した（図２）。これらの残基の１４は、膜貫通α－ヘリックスに存在すると予測され、そのうち５つの残基は脂質に向いていると予測され、４つは深く埋め込まれており、残部の残基はヘリックスの間の界面に存在すると予測された。連続的なアミノ酸であるＧ６７及びＲ６８（ロドプシンにおけるＶ６３及びＱ６４）またはヘリックス５におけるクラスターＹ２２７、Ｒ２２９、Ｖ２３０、及びＡ２３４（ロドプシンにおけるＹ２２３、Ｑ２２５、Ｌ２２６、及びＶ２３０）などの、これらの残基の幾つかは、βＡＲ構造において互いに相互作用していると予測されるだろう。βＡＲ中で相互作用し得る他のアミノ酸残基は、外側のループ２のＱ１９４Ａ及び外側のループ３のＤ３２２Ａであった（ロドプシンにおけるＧ１８２及びＰ２８５の各々）。

【０３２７】

個々の変異の各々がβAR_{34-424}に与えた安定性の増大は、各変異体のＴｍを測定することによって決定した（結果示さず）；ここでＴｍは３０分間に亘って受容体を加熱した後の機能的な結合における５０％の低減を与える温度である。８℃までＴｍを増大させたＭ９０Ａ及びＹ２２７Ａを除いて、各変異は１から３℃でβAR_{34-424}のＴｍを増大させた。

【０３２８】

最適な安定受容体を作製するための変異の組み合わせ

最初に、βＡＲの一次アミノ酸配列において互いに隣接する、熱安定性を改善した変異を組み合わせた。Ｇ６７Ａ及びＲ６８Ｓという変異又はヘリックス５の末端の変異の異なる組み合わせ（Ｙ２２７Ａ、Ｒ２２９Ｑ、Ｖ２３０Ａ、及びＡ２３４Ｌ）を含有する構築物を発現させて、アッセイした；Ｔｍ値（結果示さず）は、βAR_{34-424}のＴｍよりも１から３℃のみ高く、１つの変異は実際には僅かにより安定でないものであり、一次アミノ酸配列において互いに隣接する変異の組み合わせは大きく熱安定性を改善するものではないことが示唆された。続いて、構造において互いに離れていると予測された変異を組み合わせた。各種のプライマー混合物を使用してＰＣＲ反応を実施し、無作為な様式で５つの異なる変異を組み合わせ、次いで、熱安定性について試験した（表１）。これらの組み合わせの最も良好なものは、βAR_{34-424}のＴｍと比較して１０℃より大きくＴｍを増大させた。幾つかの場合では、個々の変異の連続的な包含でＴｍに対しては相加的な効果が明らかに存在した。これは一連の３つの変異体、ｍ４－１、ｍ４－７、及びｍ４－２において認められ、ｍ４－１に対するＶ２３０Ａの付加はＴｍを２℃増大させ、ｍ４－７におけるＤ３３２Ａという付加的な変異はＴｍをさらに３℃増大させる。Ｙ２２７Ａ及びＭ９０Ａを含有する変異体の全ては、１０℃以上のＴｍの増大を示した。これらの２つの変異が共に、βAR_{34-424}のＴｍを１３℃まで増大させたが（ｍ７－５）、アンタゴニスト結合全体はβAR_{34-424}の５０％であり、これらの変異体の発現低下が示唆された。ｍ７－５に対するＦ３３８Ｍの添加は熱安定性を増大しなかったが、大腸菌における機能的な発現のレベルを増大させた。

【０３２９】

【表１】

表１　PCRによる変異の組み合わせ。選択した変異を含有する異なるペアのプライマーを組み合わせて、10のPCR反応を実施した。成功したPCR反応を表に示す。これらの新規変異体の安定性を図7に記載したようにアッセイし、Tmを算出した。結果は重複試験による平均±S.E.として示す。

PCR	受容体	変異	T_m (°C)
	$\beta AR_{34\text{-}424}$		31.7±0.1
4	m4-1	G67A, G98A	35.5±0.9
	m4-2	G67A, G98A, V230A, D322A	40.9±0.9
	m4-6	G98A, D322A	35.0±0.2
	m4-7	G67A, G98A, V230A	38.0±1.2
6	m6-1	Y227A, A234L, A282L, A334L	41.6±0.9
	m6-4	R68S, Y227A, A234L, A282L	41.6±0.1
	m6-5	R68S, A234L, A282L, A334L	41.9±0.5
	m6-9	R68S, Y227A, A234L, A282L,	43.7±0.4
	m6-10	A334L	47.4±1.1
	m6-11	R68S, Y227A, A282L, A334L	39.1±0.5
		R68S, A282L, A334L	
7	m7-1	M90V, A282L, F338M	43.0±0.8
	m7-2	M90V, A282L	38.9±0.6
	m7-5	M90V, Y227A	45.2±1.0
	m7-6	M90V, I129V	40.0±0.6
	m7-7	M90V, Y227A, F338M	45.2±2.0
10	m10-4	R68S, M90V, V230A, A334L	46.9±1.0
	m10-8	R68S, M90V, V230A, F327A,	47.3±1.4
		A334L	

【０３３０】

大腸菌において依然として高レベルで発現した、最も熱安定である得られた変異体は、ｍ６－１０、ｍ７－７、及びｍ１０－８であった。これらの変異体は合計して全部で１０の異なる変異を含有し、８つの変異はそれらの変異体の少なくとも２種に存在していた。ｍ１０－８を鋳型として使用し、ｍ６－１０及びｍ７－７に存在する変異を添加又は置換することによって、変異誘発の二順目を実施した（図３）；これらの変異の幾つかはβＡＲ

の一次アミノ酸配列において非常に近接していたため、上述のように付加的でなかったが、多数の変異はＴｍをさらに改善した（表２）。例えば、ｍ１０－８における２つの変異を交換して、ｍ１８を作製すると、４９．６℃までＴｍを上昇させ、Ａ２８２Ｌを添加してｍ２３を作製すると、Ｔｍをさらに３℃増大させ５２．８℃とした。これによって、これまでで最も熱安定であるβＡＲ$_{34-424}$が生産され、βＡＲ－ｍ２３と称する。

【０３３１】

【表２】

表２　変異の最も良好な組み合わせの改善。ｍ６－１０、ｍ７－７、及びｍ１０－８といった変異体に存在する変化をＰＣＲによって混合して、これらの新規変異体を得た。これらの新規変異体の安定性を図７に記載のようにアッセイし、Ｔｍを算出した。結果は重複試験による平均±Ｓ．Ｅ．として示す。

	変異								T_m (°C)
m17	R68S	M90V	Y227A	V230A	-	F327A	A334L	-	48.2±1.4
m18	R68S	M90V	Y227A	V230A	A282L	F327A	-	F338M	49.6±0/9
m19	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	F338M	49.0±0.8
m20	R68S	M90V	-	-	-	F327A	A334L	-	48.4±0.7
m21	R68S	M90V	Y227A	-	-	F327A	A334L	-	47.0±1.3
m22	R68S	M90V	Y227A			F327A	A334L	-	47.4±0.5
m23	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	F338M	52.8±1.4

【０３３２】

βＡＲ$_{34-424}$変異体を開発するために使用する熱安定性アッセイは、アンタゴニストの不在下において受容体を加熱することによって実施したが、結合したリガンドが受容体を安定化することがよく知られている。したがって、βＡＲ$_{34-424}$及びβＡＲ－ｍ２３についての安定性アッセイは、加熱工程の間に受容体に結合したアンタゴニストを用いて繰り返した（図４）。予測されるように、インキュベーションの間に結合したアンタゴニストを含有する受容体のＴｍは、アンタゴニストの不在下における受容体のＴｍよりも高いものであった。βＡＲ$_{34-424}$については、結合したアンタゴニストを用いて６℃高く、βＡＲ－ｍ２３については、Ｔｍが２℃増えて５５℃となった；アンタゴニストが結合した際にβＡＲ－ｍ２３について観察された熱安定性のより小さな増大は、当該受容体は既に、βＡＲ$_{34-424}$よりも、アンタゴニストが結合した状態に類似するより安定な立体構造にあることを示唆する（下記参照）。アンタゴニストが結合したβＡＲ－ｍ２３のＴｍは、２つの独立した研究所によってその構造が解析された（非特許文献１２及び１３）、ドデシルマルトシド（ＤＤＭ）中の暗状態のロドプシンのＴｍに非常に似ている（非特許文献１２）。このことは、βＡＲ－ｍ２３が結晶化について十分に安定であることを示唆する。

【０３３３】

βＡＲ－ｍ２３の特性決定

６種の変異の効果を同定するためにβＡＲ－ｍ２３及びβＡＲ$_{34-424}$について測定した３種の特徴的な活性は、アンタゴニスト結合の親和性、アゴニスト結合の相対的な効果、βＡＲ－ｍ２３のＧタンパク質への結合能であった。アンタゴニストである［^{3}Ｈ］－ジヒドロアルプレノロール（図８）を使用した膜への飽和結合実験は、βＡＲ－ｍ２３に対する結合の親和性（K_D　６．５±０．２ｎＭ，ｎ＝２）がβＡＲ$_{34-424}$（K_D　２．８±０．１ｎＭ，ｎ＝２）よりも僅かに低いことを示し、アンタゴニスト結合立体構造ではβＡＲｍ２３の構造に大きなゆらぎが存在することを示唆している。このことは、βＡＲ－ｍ２３における変異のいずれも、リガンド結合に関与すると解されているアミノ酸に相当するものではないことと一致する。アンタゴニスト結合と対照的に、βＡ

Ｒ－ｍ２３によるアゴニスト結合の効果は、βＡＲ$_{34-424}$よりも３桁弱いものである（図５）。アゴニストであるイソプレナリンの有効性は、天然のアゴニストであるノルエピネフリンよりも、βＡＲ－ｍ２３及びβＡＲ$_{34-424}$において一貫して低く、当該２つの受容体のアゴニスト結合立体構造は類似している可能性を示唆する。しかしながら、βＡＲ$_{34-424}$と比較した際のβＡＲ－ｍ２３におけるアゴニストの効力における大きな低減は、βＡＲ－ｍ２３における６種の変異が、アンタゴニストが結合した立体構造に選択的に固定化されていることを示唆する。立体構造の予測からすると、このことは、回折に使用し得る品質の結晶の生産のために立体構造が均一なタンパク質集団を有することが重要であるため、熱安定性に予期せぬ利点を加える。

【０３３４】

βＡＲ－ｍ２３に用いた熱安定性アッセイの全ては、ＤＤＭに可溶化した受容体に対して実施した。熱安定化プロセスの目的は、ＤＤＭのみではなく各種の異なる界面活性剤中で安定である結晶学的に理想的な受容体を生産することであった。したがって、本発明者は、内在性膜タンパク質の結晶化において選択的に使用される小さな界面活性剤に集中して、各種の異なる界面活性剤中においてβＡＲ－ｍ２３及びβＡＲの安定性を試験した。βＡＲ－ｍ２３又はβＡＲ$_{34-424}$を発現する大腸菌から調製した膜をＤＤＭ中で可溶化し、Ｎｉ－ＮＴＡアガロースに結合させ、次いで、ＤＤＭ、デシルマルトシド（ＤＭ）、オクチルグルコシド（ＯＧ）、ラウリルジメチルアミンオキシド（ＬＤＡＯ）、又はノニルグルコシド（ＮＧ）のいずれかを用いて洗浄した。安定性アッセイを異なる界面活性剤の各々中の受容体に対して実施した（図６）。βＡＲ$_{34-424}$はＤＤＭ及びＤＭにおいてのみ安定であり、ＯＧ、ＮＧ、又はＬＤＡＯで洗浄した樹脂から溶出した活性受容体は存在しなかった。対照的に、機能的なβＡＲ－ｍ２３は全ての界面活性剤中に依然として存在し、Ｔｍを測定し得た。予測されるように、より小さな界面活性剤が、ＤＤＭ（Ｔｍ５２℃）又はＤＭ（Ｔｍ４８℃）のいずれかよりも顕著に変性させ、２５℃（ＮＧ）、２３℃（ＬＤＡＯ）、及び１７℃（ＯＧ）のＴｍであった。受容体をＤＤＭ又はＤＭのいずれに可溶化したかにかかわらず、βＡＲ－２３及びβＡＲ$_{34-424}$の間のＴｍの差は約２０℃である；したがって、予測されるＴｍは約５℃であり、かくして、精製に使用した条件下で受容体が迅速に不活性化したため、活性βＡＲ$_{34-424}$はＮＧ中においてさえ認められないことは驚くべきことではない。厳しさを増している界面活性剤中における安定性に関して選択するよりも利用するのがかなり単純であるため、βＡＲ－ｍ２３の生産に使用した所定の戦略は、熱安定性に基づいて意図的に選択した。しかしながら、βＡＲ$_{34-424}$の熱安定性の増大は、内在性膜タンパク質の結晶化に理想的な小さな界面活性剤に対する耐性の増大をもたらす。

【０３３５】

ＧＰＣＲ変異体の結晶化

シチメンチョウβ－アドレナリン受容体の幾つかの異なる構築物を結晶化する以前の試みは失敗した。各種の条件で実験したにもかかわらず、天然の配列並びに幾つかの切断型及びループ欠失構築物の双方の使用によっては、長年に亘って、結晶が得られなかった。

【０３３６】

しかしながら、βＡＲ－ｍ２３に由来する安定化変異を前記構築物に転用すると、幾つかの異なる結晶が、異なる界面活性剤及び異なる条件において得られた。

【０３３７】

これまで最も研究された結晶は、バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞において発現させた精製β－３６構築物（以下の変化：点変異Ｃ１１６Ｌ及びＣ３５８Ａを含有するシチメンチョウβ受容体のアミノ酸残基３４－３６７；ｍ２３の６つの熱安定化点変異；配列ＡＳＫＲＫを用いたアミノ酸残基２４４－２７８の置換；Ｃ末端Ｈｉｓ６タグ）を使用して、当該受容体を界面活性剤であるオクチルチオグルコシドに移した後に得られた。使用した沈殿剤は、ＰＥＧ６００又はＰＥＧ１０００であり、得られた結晶は細長いプレート状であった。

【０３３８】
実験を実施して、安定化受容体を使用した結晶化条件を規定して、本来の非安定化構築物を使用して結晶が得ることが可能であったか否かを確認した。同様に又はおそらく非常に小さな結晶を得ることが可能であるかもしれないが、実際には、「野生型」（すなわち、変異誘発させる出発構造）は結晶を生じなかった。
【０３３９】
前記結晶は、空間群Ｃ２及び良好に回折するプレート状であり、使用した凍結条件に依存してセル寸法が変化する。
【０３４０】
一般的には、ＧＰＣＲが安定化されると、各種のよく知られた各種の構造決定技術に供してよい。最も一般的な膜タンパク質結晶化技術は、多くの場合には市販の機械装置を使用して設定した数千の結晶化条件をまず使用する（非特許文献２２）、蒸気拡散（非特許文献２０及び２１）によるものである。しかしながら、蒸気拡散によって形成される結晶は小さく且つ不規則である場合があるため、次いで付加的な技術を使用してよい。１つの技術は、タンパク質表面の立体構造エピトープに特異的に結合する抗体と膜タンパク質との共結晶化（蒸気拡散による）を伴う（非特許文献２３及び２４）；このことによって、タンパク質の親水性表面を増やし、且つ、強力な結晶接触を形成し得る。第二の代替的な方法は、脂質立方相又は脂質中間相のいずれかと一般的に称される結晶化マトリックスを使用することであり（非特許文献２５及び２６）、機械的なプラットホームにも開発されている（非特許文献２７）。このことは、小さな親水性表面のみを有するタンパク質、例えば、細菌ロドプシンの高品質な結晶の生産に関して成功を確実なものとする（非特許文献２８）。膜タンパク質構造は、電子線結晶学によって高分解能で測定されてもよい（非特許文献２９）。
【０３４１】
アラニンスキャニング変異誘発及び熱安定変異体の選択の併用によるβＡＲ$_{34-42}$$_{4}$からβＡＲ－ｍ２３への進化は、結晶学に理想的なＧＰＣＲをもたらした。βＡＲ－ｍ２３のＴｍは、アンタゴニストの存在下においてβＡＲ$_{34-424}$よりも２１℃高く、βＡＲ－ｍ２３はロドプシンと同様の安定性を有している。βＡＲ－ｍ２３のＴｍの増大は、βＡＲ$_{34-424}$を不活化する各種の小さな界面活性剤における安定性の増大をもたらす。加えて、使用した選択戦略は、受容体の立体構造の集団は野生型のβＡＲ$_{34-424}$よりも均一であるため、結晶を得る可能性を改善する選択的にアンタゴニストが結合した立体構造にある受容体をもたらした。かくして、本発明者は、単独の選択法において立体構造を安定化する方法を完成した。
【０３４２】
本発明者が導入した特定の変異が受容体の熱安定化をもたらす原因は全く明らかではない。ロドプシンにおける対応する位置は、変異したアミノ酸残基は脂質二重層を向いているか、受容体の中心を向いているか、又は２つの環境の間の界面に存在する。複雑な可溶性タンパク質の熱安定化を理解する試みにおける困難性を考慮すると（非特許文献１５）、膜タンパク質はより容易に理解されるようではない；本発明者は、変異した際に熱安定性をもたらすβＡＲにおけるアミノ酸残基に特定のパターンは存在しないことを確認した。しかしながら、生産した約５％の変異体は天然の受容体より安定であったため、アラニンスキャニング変異誘発は、迅速に熱安定性変異体を同定する効率的な戦略であることが示される。
【０３４３】
βＡＲ－ｍ２３の生産に本発明者が使用した手法は、界面活性剤可溶化形態における活性を検出するための簡便なアッセイを有する任意の膜タンパク質に等しく適用可能である。本発明者は、最も簡便な主要なパラメータとして、温度の関数としての安定性を選択したが、該手法は、主に安定性、例えば、厳しい界面活性剤、極端なｐＨ、又はカオトロピック塩の存在下における安定性についての試験に容易に拡張可能である。各種のヒト受容体、チャンネル、及びトランスポーターの立体構造安定化は、それらを結晶学により適し

たものとし、既に結晶化されている膜タンパク質についての分解能も改善するであろう。立体構造安定化が、膜タンパク質結晶化を、現在よりも迅速に成功する可能性が大きい、より扱いやすい問題とすることを可能にすることが望まれる。これによって、製薬業界におけるヒト膜タンパク質の日常的な結晶化を可能にし、薬剤開発への価値のある立体構造の洞察を可能にするはずである。

【０３４４】

方法

材料

シチメンチョウ由来の切断型のβ１アドレナリン受容体（βAR_{34-424}）（非特許文献９）は、ＤｒＴｏｎｙ Ｗａｒｎｅ（ＭＲＣ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）によって快く提供された。３４－４２４残基をコードするβＡＲ構築物は、Ｃ１１６Ｌ変異を含有して発現を改善し（非特許文献１１）、精製のために１０ヒスチジンのＣ末端タグを含有している。１－［４，６－プロピル－^{3}Ｈ］－ジヒドロアルプレノロール（［^{3}Ｈ］－ＤＨＡ）はＡｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅによって提供され、（＋）Ｌ－ノルエピネフリン酒石酸水素塩、（－）イソプレナリン塩酸、（－）アルプレノロール酒石酸塩、及びｓ－プロプラノロール塩酸はＳｉｇｍａからのものである。

【０３４５】

βＡＲの変異誘発

βＡＲ ｃＤＮＡは、ｐＲＧＩＩＩにライゲートし、ＭａｌＥ融合タンパク質としての大腸菌におけるβＡＲの機能的な発現を可能にした（非特許文献１６）。変異体は、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ ＩＩ方法（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて、発現プラスミドを鋳型として使用してＰＣＲによって産生した。ＰＣＲ反応物は、ＸＬ１０－Ｇｏｌｄ ｕｌｔｒａｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｃｅｌｌ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に形質転換し、個々のクローンを完全に配列決定して、所望の変異のみが存在していることを調べた。異なる変異は、以下の変異：Ｍｕｔ４、Ｇ６７Ａ、Ｇ０６８Ａ、Ｖ２３０Ａ、Ｄ３２２Ａ、及びＦ３２７Ａ；Ｍｕｔ６、Ｒ０６８Ｓ、Ｙ２２７Ａ、Ａ２３４Ｌ、Ａ２８２Ｌ、及びＡ３３４Ｌ；Ｍｕｔ７、Ｍ９０Ｖ、Ｉ１２９Ｖ、Ｙ２２７Ａ、Ａ２８２Ｌ、及びＦ３３８Ｍ；Ｍｕｔ１０、Ｒ６８Ｓ、Ｍ９０Ｖ、Ｖ２３０Ａ、Ｆ３２７Ａ、及びＡ３３４Ｌを導入する全てのペアのプライマーを含めることによって、ＰＣＲによって無作為に組み合わせた。ＰＣＲ混合物を形質転換して、クローンは配列決定して変異が確かに導入されていることを測定した。

【０３４６】

タンパク質発現及び膜調製物

βＡＲ及び変異体の発現は、ＸＬ１０細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）において実施した。５０ｍｌのアンピシリン含有（１００μｇ／ｍｌ）２×ＴＹ培地の培養物を、OD_{600}＝３まで浸透しながら３７℃で増殖させ、次いで、０．４ｍＭ ＩＰＴＧを用いて誘導した。誘導した培養物は、４時間に亘って２５℃でインキュベートし、次いで、細胞を１３，０００×ｇで１分に亘って遠心分離することによって回収し（２ｍｌの一定分量）、－２０℃で保存した。アッセイに関しては、細胞を凍結融解（５サイクル）によって破砕し、５００μｌの緩衝液［２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８、０．４Ｍ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、及びプロテアーゼインヒビター（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（商標）、Ｒｏｃｈｅ）］に再懸濁した。１００μｇ／ｍｌリゾザイム及びＤＮアーゼ Ｉ（Ｓｉｇｍａ）を用いて４℃で１時間に亘ってインキュベートした後に、氷上で３０分に亘ってサンプルを２％ＤＤＭに可溶化した。不溶性物質を遠心分離（１５，０００×ｇ、２分、４℃）によって除去し、上清を放射リガンド結合アッセイに直接使用した。

【０３４７】

大規模膜調製のために、βＡＲ及びＭｕｔ２３各々の２Ｌ及び６Ｌの大腸菌培養物を上述のように増殖させた。２０分間に亘る５，０００×ｇの遠心分離によって細胞を回収し

、液体窒素で凍結させ、－８０℃で保存した。１×プロテアーゼインヒビターカクテル（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（商標）ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ、Ｒｏｃｈｅ）を含有する１０ｍｌの２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５にペレットを再懸濁した。１ｍｇのＤＮアーゼＩ（Ｓｉｇｍａ）を添加して、終容量を１００ｍｌとした。細胞をＦｒｅｎｃｈ ｐｒｅｓｓ（２ｐａｓｓａｇｅｓ、２０，０００ｐｓｉ）によって破砕し、１２，０００×ｇで４５分間に亘って４℃で遠心分離して細胞残屑を除去した。上清（膜）を２００，０００×ｇで３０分間に亘って４℃で遠心分離した；膜ペレットは１５ｍｌの２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５に再懸濁して、液体窒素で迅速に凍結した後に１ｍｌの一定分量で－８０℃において保存した。タンパク質濃度はアミノブラック法によって測定した（非特許文献１７）。これらのサンプルは、融解後に放射リガンド結合アッセイにおいて使用し、上述の２％ ＤＤＭに可溶化した。

【０３４８】

競争アッセイに関しては、異なる界面活性剤を試験することと共に、ＤＤＭ可溶化βＡＲをＮｉ－ＮＴＡアガロース（Ｑｉａｇｅｎ）で部分的に精製した。２００μｌのＮｉ－ＮＴＡアガロースを、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８、０．４Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾールｐＨ ８中の２ｍｌの可溶化サンプル（１０ｍｇ／ｍｌの膜タンパク質）に添加し、１時間に亘って４℃でインキュベートした。インキュベート後に、サンプルを１３，０００×ｇで３０秒間に亘って遠心分離し、界面活性剤（０．１％ＤＤＭ、０．１％ＤＭ、０．１％ＬＤＡＯ、０．３％ＮＧ、又は０．７％ＯＧのいずれか）を含有する２５０μｌの緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８、０．４Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール）で二回洗浄した。

【０３４９】

受容体は、２×１００μｌの緩衝液（０．４Ｍ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、２５０ｍＭイミダゾールｐＨ８、及び関連の界面活性剤）に溶出した。半精製したβＡＲ$_{34-424}$及びβＡＲ－ｍ２３に対する［^{3}Ｈ］－ＤＨＡ結合についてのK_Dは、各々３．７ｎＭ及び１２．５ｎＭであり、競争アッセイにおいて使用した［^{3}Ｈ］の終濃度は３倍のK_DでありβＡＲ$_{34-424}$については１２ｎＭでありβＡＲ－ｍ２３については４０ｎＭであった。

【０３５０】

放射リガンド結合及び熱安定性アッセイ　単独の点の結合アッセイは、１２０μｌの終濃度において、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８、０．４Ｍ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、０．１％ＤＤＭ（又は対応する界面活性剤）を５０ｎＭ［^{3}Ｈ］－ＤＨＡ及び２０から１００μｇの膜タンパク質と共に含有した；平衡化は１時間、４℃であった。３０分間に亘って特定の温度で［^{3}Ｈ］－ＤＨＡを使用して又は使用せずに、結合アッセイ混合物をインキュベートすることによって、熱安定性を評価した；反応は氷上で実施し、必要であれば［^{3}Ｈ］－ＤＨＡを添加して、さらに１時間平衡化した。受容体結合放射リガンド及び遊離の放射リガンドは、以前に開示されているようにゲル濾過によって分離した（非特許文献１８）。非特異的結合は、１μＭのｓ－プロプラノロールの存在下で測定した。飽和曲線は、０．４ｎＭから１００ｎＭの広範な［^{3}Ｈ］－ＤＨＡ濃度を使用して得られた。競争アッセイは、βＡＲ$_{34-424}$については１２ｎＭの濃度の［^{3}Ｈ］－ＤＨＡを使用して実施し、βＡＲ－ｍ２３については４０ｎＭの濃度の［^{3}Ｈ］－ＤＨＡを使用して実施し（すなわち、３倍のK_D）、各種の濃度の未標識のリガンド（０から１００ｍＭ）を用いて実施した。放射活性はＢｅｃｋｍａｎＬＳ６０００液体シンチレーションカウンターで計測し、Ｐｒｉｓｍソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用して非線形回帰によってデータを分析した。

【０３５１】

ロドプシン構造におけるβＡＲ－ｍ２３熱安定変異の位置

登録コードが１ＧＺＭ［１４］であるロドプシン構造のｐｄｂファイルは、Ｐｒｏｔｅｉｎ ＤａｔｅＢａｎｋウェブサイト（www.pdb.org）からダウンロードし、ＰｙＭＯＬＸ１１Ｈｙｂｒｉｄ（ＤｅＬａｎｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）プログラムに表示した。βＡ

Ｒにおける熱安定変異についての、ロドプシンの対応するアミノ酸残基は、本発明者のよく知っている４つのＧＰＣＲ、すなわち、ロドプシン、β１アドレナリン受容体、ニューロテンシン受容体、及びアデノシンＡ$_{2a}$受容体の間のアラインメントに基づいてロドプシン構造に配置した（非特許文献１９）。

【０３５２】

（実施例２）

増大した熱安定性を有するアデノシンＡ$_{2a}$受容体（Ａ$_{2a}$Ｒ）の変異体

１．３１５の部位特異的変異体を、Ａ$_{2a}$Ｒの２から３１６残基の間に作製した。

２．これらの変異体の全てを、加熱工程後のアゴニスト及びアンタゴニスト結合測定アッセイを使用して熱安定性についてアッセイした（図１２に記載のリガンド（－）フォーマット）。

ａ．^{3}Ｈ－ＮＥＣＡ（アゴニスト）と共に測定した際に、２６の変異体が改善された熱安定性を示した：G114 A, G118A, L167A, A184L, R199A, A203L, L208A, Q210A, S213A, E219A, R220A, S223A, T224A, Q226A, K227A, H230A, L241A, P260A, S263A, L267A, L272A, T279A, N284A, Q311A, P313A, K315A 。

ｂ．^{3}Ｈ－ＺＭ２４１３８５（アンタゴニスト）と共にアッセイした際に、１８の変異体が改善された熱安定性を示した：A54L, V57A, H75A, T88A, G114A, G118A, T119A, K122A, G123A, P149A, E151A, G152A, A203L, A204L, A231L, L235A, V239A。

３．変異を組み合わせて、推定上のアンタゴニストの立体構造において変異体を産生した。野生型Ａ$_{2a}$ ＲはＺＭ２４１３８５が結合した状態で３１℃のＴｍを有する。

a.Rant17 A54L+K122A+L235A Tm 48°C (ZM241385 bound)

b.Rant19 A54L,T88A,V239A+A204L Tm 47°C (ZM241385 bound)

c.Rant21 A54L,T88A,V239A+K122A Tm 49°C (ZM241385 bound)

４．アゴニストスクリーニングよる変異を組み合わせたが、＋２℃のＴｍという非常に低レベルの改善のみをもたらした。

【０３５３】

【表３】

表（ｉ）．Ａ２ａＲ安定化変異の一覧。変異体を大腸菌において発現させ、２％ＤＤＭ＋１０％グリセロールにおいて可溶化し、アゴニストである［^{3}Ｈ］－ＮＥＣＡ（右）及びアンタゴニストである「^{3}Ｈ」－ＺＭ２４１３８５（左）を使用してリガンド結合について試験した。放射リガンドの濃度は、野生型の受容体について測定したそれらのK_Dの６から１０倍であった。活性受容体の発現を４℃でリガンド結合によって評価した。安定性は、可溶化した受容体をそのａｐｏ状態で３０℃において３０分間に亘って加熱し、次いで、残存する結合活性を測定することによってアッセイした。これらの条件下において、野生型の活性は５０％まで衰える（Ｓ．Ｄ．＝１５％）。発現及び安定性について得られたデータは、野生型の値に対して標準化した。変異誘発の後の回において含めた変異は、野生型と比較して、発現が３０から４０％以上であり、かつ、安定性が１３０から１４０％以上であった。太線は変異のクラスターを示す。

アゴニスト			アンタゴニスト		
変異	発現 (%)	安定性 (%)	変異	発現 (%)	安定性 (%)
wt	100	100	wt	100	100
S090A	151	151	A054L	90	140
G114A	62	143	V057A	44	144
G118A	71	151	H075A	82	152
L167A	41	174	T088A	67	230
A184L	140	150	G114A	73	153
R199A	73	202	G118A	84	148
A203L	42	172	T119A	90	148
L208A	276	215	K122A	52	153
Q210A	46	155	G123A	90	158
S213A	40	140	P149A	54	215
E219A	96	221	E151A	63	173
R220A	84	250	G152A	70	156
S223A	57	146	A203L	111	132
T224A	142	276	A204L	40	181
Q226A	119	217	A231L	90	148
K227A	87	222	L235A	85	140
H230A	57	154	V239A	91	134
L241A	139	156			
P260A	70	169			
S263A	60	158			
L267A	40	187			
L272A	34	157			
T279A	125	158			
N284A	64	151			
Q311A	49	164			
P313A	44	148			
K315A	64	186			

【０３５４】

【表４】

表（ｉｉ）．最も良好な組み合わせの安定性。受容体は１％ＤＤＭ（グリセロールを含まない）に可溶化した。リガンドの存在下（リガンド占拠状態）又は非存在下（ａｐｏ状態）において各種の異なる温度において可溶化した受容体を加熱することによって、融解プロフィールを得た。以下に示すデータは、少なくとも３回の独立した実験の代表例である。Ｓ．Ｄ．は１℃未満である。

	Tm (°C)			Tm (°C)	
	- アゴニスト	+ アゴニスト		- アンタゴニスト	+ アンタゴニスト
Wt	21	29	wt	31	32
Rag 1 (A184L/R199A/L272A)	26	34	Rant 5 (A54L/T88A/V239A)	42	46
Rag 23 (Rag 1+F79A /L208A)	22	38	Rant 21 (Rant 5+K122A)	41	49

【０３５５】

【表５】

表（ｉｉｉ）．界面活性剤で可溶化した野生型のＡ２ａＲ及び熱安定性変異体Ｒａｎｔ２１の競争アッセイについての結果のまとめ。値は２回の独立した実験の代表例である。各データの点は三回重複してアッセイしたものであり、平均±ＳＤとしてプロットした。各可溶化受容体は、１時間に亘って氷上で 400 mM NaCl を含有する結合緩衝液（50 mM Tris 中においてリガンドと共にインキュベートした。未標識リガンドの非存在下における [3H]ZM241385 (10 nM)の結合を１００％と設定した。以下に示すデータは、二回重複して測定した各データ点を用いて二回の独立した実験によるものである。サンプルのリガンドとのインキュベートは、１時間に亘って氷上で１０ｎＭの濃度で[3H]ZM241385 を用いて実施した。K_i 値は、Ｐｒｉｓｍソフトウェアの非線形回帰式を使用して Cheng and Prusoff 式にしたがって計算し、野生型については１２ｎｍ及びＲａｎｔ２１については１５ｎＭという[3H]ZM241385 についての K_D を適用した。Ｒａｎｔ２１は正確なＫｉ測定について十分にＮＥＣＡに結合しなかった（したがって、＞１×１０$^{-1}$と示される）。アゴニスト結合についてのＲａｎｔ２１の親和性は、Ｒ－ＰＩＡについて２３２倍弱められ、ＮＥＣＡについて少なくとも１９００倍まで弱められた。

競争相手	K_i (M)	
	wt	Rant 21
XAC	2.3 x 10^{-6}	2.3 x 10^{-6}
テオフィリン	1.5 x 10^{-3}	0.9 x 10^{-3}
NECA	7.0 x 10^{-6}	>1 x 10^{-1}
R-PIA	1.6 x 10^{-5}	3.6 x 10^{-3}

【０３５６】

【表６】

表（ｉｖ）．界面活性剤に可溶化した野生型Ａ２ａＲ及び熱安定性変異体の飽和アッセイについての結果のまとめ。値は３回の独立した実験の代表例である。各データ点は三回重複してアッセイしたものであり、平均±ＳＤとしてプロットした。Ｐｒｉｓｍソフトウェアの非線形回帰式を使用して、データをミカエリスーメンテン式に適合させた。

受容体	K_D (nM)	
	[3H]NECA (アゴニスト)	[3H]ZM241385 (アンタゴニスト)
wt	32 ± 1	12 ± 3
Rag 1	26 ± 0.4	26 ± 0.5
Rag 23	21 ± 1	62 ± 1
Rant 21	>450	15 ± 3

【０３５７】

【表７】

表（ｖ）．異なる界面活性剤における野生型受容体及び受容体変異体の安定性のまとめ。受容体の可溶化及び界面活性剤交換は、ＩＭＡＣ工程の間に実施した。Ｓ．Ｄ．は１℃未満であった。受容体は非常に不安定であったため(†)、幾つかの受容体－界面活性剤の組み合わせについてはＴｍを測定することが不可能であった。

Tm (°C)

	アゴニスト結合		アンタゴニスト結合	
	wt	Rag 23	wt	Rant 21
0.01% DDM	27	34	25	39
0.1% DM	23	29	10	28
0.3% NM	22	28	< 4	25
0.3% NG	†	†	†	22
0.6% OG	<9	16	†	23
0.003% LDAO	28	38	32	42
0.006% FC12	37	39	43	49

【０３５８】

（実施例３）

増大した熱安定性を有するニューロテンシン受容体（ＮＴＲ）の変異体

１．３４０部位特異的変異体を、ＮＴＲの６１から４００残基の間に作製した。

２．まず、これらの変異体の全てを、加熱工程後に^{3}Ｈ－ニューロテンシン（アゴニスト）結合を測定するアッセイを使用して熱安定性についてアッセイした。２４の変異体は、熱安定性おける小さいが顕著な増大をもたらした：A356L, H103A, D345A, A86L, A385L, Y349A, C386A, K397A, H393A, I116A, F358A, S108A, M181A, R392A, D113A, G209A, L205A, L72A, A120L, P399A, Y351A, V268A, T207A, A155L, S362A, F189A, N262A, L109A,W391A, T179A, S182A, M293A, L256A, F147A, D139A, S100A, K176A, L111A, A90L, N270A。

３．アゴニストの非存在下における加熱によって熱安定性について試験した変異体を、変異体を^{3}Ｈ－ニューロテンシンの存在下で加熱する僅かに異なるアッセイを使用して再試験した（図１２におけるリガンド（＋）フォーマット）。改善された熱安定性を有する変異体は：A69L, A73L, A86L, A90L, H103A, V165A, E166A, G215A, V229A, M250A, I253A, A177L, R183A, I260A, T279A, T294A, G306A, L308A, V309A, L310A, V313A, F342A, F358A, V360A, S362A, N370A, S373A, F380A, A385L, P389A, G390A, R395A。

４．野生型の受容体と比較して顕著に向上した発現レベルを有する変異体も存在し、結晶化のための受容体生産レベルを促進するために使用し得る：A86L, H103A, F358A, S362A, N370A, A385L, G390A。これら全てが熱安定性を増大させた。

５．好ましい組み合わせは、

a.　Nag7m　F358A+A86L+I260A+F342A　Tm 51°C（ニューロテンシン結合）

b.　Nag7n　F358A+H103A+I260A+F342A　Tm 51°C（ニューロテンシン結合）

野生型のＮＴＲは、ニューロテンシンが結合した状態で３５℃のＴｍを有する。

【０３５９】

（実施例４）

安定化ＧＰＣＲ変異が存在する構造モチーフの同定

β２アドレナリン受容体の構造を決定した（非特許文献２０及び２１）。それはシチメンチョウβ１受容体と５９％同一であったが、はっきりと異なる薬理学的プロフィールを有していた（非特許文献２２及び２３）。シチメンチョウβ１受容体の安定化変異が存在する構造モチーフを決定するために、本発明者は、ヒトβ２構造に変異をマッピングした（非特許文献２１）。

【０３６０】

ＭａｃＶｅｃｔｏｒパッケージにおいてＣｌｕｓｔａｌＷを使用して、βアドレナリン受容体を最初に整列（アライン）した；シチメンチョウβ１における熱安定化変異を、ヒトβ２配列における対応する残基と同様にハイライトした。ヒトβ２モデル（ｐｄｂ登録コード２ＲＨ１）はＰｙｍｏｌで可視化し、所望のアミノ酸を、当該技術分野において既知の標準的な手法によって空間充填モデルとして示した。安定化変異が存在する構造モチーフは、目視検査によって決定した。

【０３６１】

表（ｖｉ）は、βＡＲ－ｍ２３の熱安定化変異に対応するβ２受容体における対応する位置及びそれらが存在する構造モチーフの一覧である。

【０３６２】

表（ｖｉ）から認められるように、変異体は、多数の異なる位置に存在している。３つの変異は、水性溶媒に接近可能であることが予測されるループ領域に存在する（ループ）。８の変異は、膜貫通α－ヘリックスに存在し、脂質二重層を示す（脂質）；これらの変異の３つはヘリックスの末端付近に存在し、親水性境界層に存在していると解されてよい（脂質境界）。８の変異は膜貫通α－ヘリックスの間の界面に存在することが認められ（ヘリックス－ヘリックス界面）、そのうち３つはヘリックスの折れ曲がった又はゆがんだ領域内のいずれかに存在し（折れ曲がり（キンク））、他の２つの変異は一つのヘリックスで生じているが、変異した残基に対して空間をあけて近接する折れ曲がり（キンク）を含有する1つ又は複数の他のヘリックスと近接している（反対側の折れ曲がり（キンク））。これらの後者の変異は、折れ曲がり（キンク）領域内のアミノ酸のパッケージングに影響を与え、熱安定化をもたらし得る。他の変異は、基質結合ポケットに存在する（ポケット）。

【０３６３】

【表８】

	シチメンチョウβ1	ヒトβ2	記載	
ヘリックス１	I55A	I47	3-ヘリックスキンク界面	図 18
ヘリックス１	G67A	A59	脂質境界	
ヘリックス１	R68S	K60	脂質境界	図 25
ヘリックス２	V89L	V81	キンク	図 19
ヘリックス２	M90V	M82	キンク	図 20
ヘリックス２	G98A	G90	ポケット	
ヘリックス３	I129V	I121	反対側のキンク	図 21
	S151E	S143	ループ	
ヘリックス４	V160A	V152	脂質	
	Q194A	A186	ループ	
ヘリックス５	L221V	V213	脂質	
ヘリックス５	Y227A	Y219	ヘリックス-ヘリックス界面	図 23
ヘリックス５	R229Q	R221	脂質	
ヘリックス５	V230A	V222	ヘリックス-ヘリックス界面	
ヘリックス５	A234L	A226	ヘリックス-ヘリックス界面	
ヘリックス６	A282L	C265	ループ	図 24
	D322A	K305	脂質境界	
ヘリックス７	F327A	L310	脂質	
ヘリックス７	A334L	V317	脂質	
ヘリックス７	F338M	F321	キンク	図 22

表（ｖｉ）シチメンチョウβ１受容体において認められる熱安定化変異に対応するアミノ酸残基のヒトβ２構造における位置並びにそれらが存在する構造モチーフ

【０３６４】

その様な構造モチーフは、それらが安定化変異を含有するために、タンパク質安定性の測定において重要である。したがって、これらのモチーフを変異の標的とすることは、安定化したＧＰＣＲ変異体の産生を容易にする。事実、２以上の変異を同一の構造モチーフにマッピングした幾つかの例が存在する。例えば、Ｙ２２７Ａ、Ｖ２３０Ａ、及びＡ２３４Ｌといったシチメンチョウβ１アドレナリン受容体における変異は全て、同一のヘリックス界面にマッピングされ、Ｖ８９Ｌ及びＭ９０Ｖといった変異は同一のヘリックスの折れ曲がり（キンク）にマッピングされ、Ｆ３２７Ａ及びＡ３３４Ｌといった変異は脂質二重層を示す同一のヘリックス表面にマッピングされた（表（ｖｉ））。かくして、1つの安定化変異が同定された際における、変異が存在する構造モチーフの決定は、更なる安定化変異の同定を可能にするであろう。

【０３６５】

（実施例５）

ＧＰＣＲの立体構造特異的結合パートナーの作製

親ＧＰＣＲと比較して特定の立体構造で増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体の作製は、結合パートナーのスクリーニングのために多くの利点を提供する。例えば、本発明の方法はスクリーニングに必要とされる物質の量を低減する。標準的なスクリーニングでは、ＧＰＣＲは全細胞中又は全細胞からの膜中に存在し、これらは通常、化合物のライブラ

リーではなく隔離室における個々の化合物とのインキュベーションによってスクリーニングされる。かくして本発明は、化合物のスクリーニングを実施するために必要とされる時間に関する利点を提供する。ＧＰＣＲを特定の立体構造に固定できることは、必要な薬理学的特性を有するリガンドを同定する可能性を高めるという利点を提供する。標準的な結合スクリーニングでは、ＧＰＣＲは多くの異なる立体構造をとることが可能であり、結合化合物は各種の薬理学的タイプに亘って同定されるであろう。アッセイ形式を小型化できるため試薬の費用を低減でき、これは本発明の方法によって促進される。

【０３６６】

方法

化合物のスクリーニング

特定の立体構造で増大した安定性を有するＧＰＣＲ変異体を固体表面に固定化し、コードされる化合物のライブラリーを含む緩衝液と共にインキュベートする。ＧＰＣＲ変異体とＧＰＣＲ変異体に選択的に結合するライブラリーからの化合物との間の結合を可能にする適切な時間後、緩衝液を除去する。次に、ＧＰＣＲ変異体に特異的に結合しなかった化合物を除去するために数回の洗浄工程を実施する。読取りコード、タグ又は空間的位置（ＤＮＡ又はＲＮＡなど）を使用して、依然としてＧＰＣＲ変異体に結合している又はＧＰＣＲから溶出した後の、結合低分子を同定する。その後立体構造特異的結合パートナーを単離する。

【０３６７】

固定化ＧＰＣＲを使用した抗体の選択

固定化した安定化ＧＰＣＲを使用して、安定化ＧＰＣＲ、天然受容体又は受容体からのペプチドで免疫した動物からの血漿中に存在するような抗体の混合物から受容体に対する抗体を選択することが可能である。抗体は、免疫動物から採取したＢ細胞から得られる上清中から、又は免疫動物からのＢ細胞の不死化後に得られるハイブリドーマから、又はファージ粒子上で若しくはリボソームディスプレイなどのインビトロ発現系を介して発現されてよい組換え抗体ライブラリーから同定できるであろう。前記方法は、受容体の特定立体構造に対する抗体を選択するという利点を有する。受容体のアンタゴニスト又は基底状態に固定された安定化ＧＰＣＲは、アンタゴニスト抗体を選択する確率を高め、一方、活性又はＲ＊状態に固定された安定化ＧＰＣＲは、活性化抗体を選択する確率を高めるであろう。標準的なスクリーニングでは、抗体は、多くの場合、受容体のペプチドエピトープに結合するが、アンタゴニスト又はアゴニスト特性を有さず、したがって治療薬としては有用でないＧＰＣＲに対するものが選択される。

【０３６８】

（実施例６）

β－アドレナリン受容体に対する抗体ファージ選択

要約

本発明者らは、ファージディスプレイを使用して抗体を作製するために安定化β－アドレナリン受容体（β－ＡＲ）を使用した。陽性ファージクローンはβ－ＡＲに対する特異性を示し、選択した抗体遺伝子のサブクローニングは、抗－β－ＡＲ特異的ｓｃＦｖ抗体の生産の成功をもたらした。

【０３６９】

緒言

受容体－リガンド系の領域における抗体の治療適用は大きな潜在的可能性を有する。しかしながら、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）に対する抗体を作製する（インビトロ又はインビボ法のいずれかによって）際の主要な問題は、不均一な製剤における多数の立体構造の精製抗原を認識する抗体結合物質のプールを作製することよりもむしろ、均一な抗原製剤における特定の立体構造、すなわちアゴニスト立体構造又はアンタゴニスト立体構造の免疫原性認識に関係する。加えて、組換え受容体抗原は通常、細胞外ドメイン形態でのみ入手可能であり、このことは、受容体の他の部分に関与する任意の三次構造を排除

する。この問題に対して提案される解決法は、標的抗原としての安定化ＧＰＣＲの適用である。

【０３７０】

本発明者らは、アンタゴニスト立体構造において安定化されたβアドレナリン受容体に結合する抗体が単離され得る、ファージディスプレイのインビトロ法によって組換え抗体を作製する際の安定化ＧＰＣＲ（ＳｔａＲｓ（商標））の有用性を明らかにした。そのような抗体は機能的アッセイ、例えばリガンド結合アッセイに供してよい。

【０３７１】

工程の概要

典型的なファージディスプレイ戦略は、阻害性ｓｃＦｖクローンを同定するための工程においていくつかの段階を含む（図２９）。最初の部分は、各種の方法（例えば、パニング選択、可溶性選択等）を使用してファージ抗体結合物質の集団を単離するための抗原に対するファージライブラリーの選択である。生じるこのファージ抗体結合物質の集団は、選択アウトプットと称される。特異的抗原結合物質を富化するためにこの工程を２から４回反復する。

【０３７２】

選択アウトプットであるクローンのプール（ポリクローナルファージＥＬＩＳＡ）を、ファージＥＬＩＳＡによって抗原の認識に関して評価する。個々のクローンをモノクローナルファージＥＬＩＳＡによって、及び配列分析によって多様性を評価してもよいが、好ましい方法は、選択した集団を組換え抗体発現ベクター（ｐＳＡＮＧ　１０－３Ｆ）にサブクローニングし、モノクローナルｓｃＦｖ　ＥＬＩＳＡ及びＤＮＡ塩基配列決定法による評価を実施することである。これは、その後ｓｃＦｖ断片として低い発現を示すファージ抗体結合物質を同定するという問題を回避する。多様なＥＬＩＳＡ陽性クローンを生じる選択アウトプットは、ファージ抗体のより大きなパネルの機能的スクリーニングのために優先順位を決定されてよい。

【０３７３】

ｓｃＦｖインヒビターの集団を同定するため、選択アウトプットを、機能的ハイスループットアッセイを使用したペリプラズム抽出物のスクリーニングキャンペーンに供する。最後に、スクリーニングキャンペーンからのヒットを、更なる機能的アッセイ並びにそれらの阻害作用の効率を評価するＩＣ５０分析によりｓｃＦｖとしてプロファイリングする。

【０３７４】

方法及び結果

安定化β－ＡＲを抗原として使用し、且つＳｃｈｏｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，２００７（２４）に記載されている「ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ」抗体ファージディスプレイライブラリーを使用して、２から３回の抗体選択を実施した。選択は、結合及び洗浄工程において２０ｎＭのリガンド（－）－アルプレノロールの存在下（Ａ）又は不在下（Ｂ）にＰＢＳ中で実施した。さらに、β－ＡＲタンパク質の取り扱いに関しては、全ての被覆、洗浄及びブロッキング緩衝液に０．１％の界面活性剤デシルマルトシド（Ａｎａｔｒａｃｅ，Ａｎａｇｒａｄｅ）を添加した。選択抗体の相対的な成功を、ポリクローナルファージＥＬＩＳＡ及びモノクローナルファージＥＬＩＳＡを使用して測定した。

【０３７５】

抗原を固定化するための最適化

固定化戦略はＨｉｓタグ抗原を利用することに基づいた。第一の場合には、βＡＲ－ｍ２３ではなく対照タンパク質を使用して固定化を行った。Ｎｉ－ＮＴＡプレートを含む各種の表面を最初の評価において使用した。すべてをＮｕｎｃプレートへの標準的な受動吸収に対して比較した。すべての場合に、２回の選択後にポリクローナルファージＥＬＩＳＡを使用して結果を評価した。

【０３７６】

抗体選択

ライブラリーの選択、溶出及び回収は、Ｓｃｈｏｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ（２００７）に記載されているとおりとした。１５０μｌの２０μｇ／ｍｌ濃度のβ－ＡＲをニッケルキレートプレート（Ｎｕｎｃ）の２つの（２４）ウエルにおいて＋４℃で一晩被覆した。受容体を被覆緩衝液に希釈し、被覆緩衝液は、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８、１００ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％デシルマルトシド（ｄｅｃ－Ｍ）であり、選択Ａについては２０ｎＭリガンドも含むものとした。翌日、ウエルをＰＢＳで洗浄し、０．１％ｄｅｃ－Ｍを添加したＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｍ）中の３％Ｍａｒｖｅｌ乳タンパク質により室温で１時間ブロックした。被覆後、ウエルをＰＢＳで洗浄し、２％Ｍａｒｖｅｌ／ＰＢＳ中であらかじめブロックした１００μｌのファージライブラリーを添加して、室温で１時間インキュベートした。結合後、試料を、０．１％ｄｅｃ－Ｍを添加したＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ中で６回及び０．１％ｄｅｃ－Ｍを添加したＰＢＳ中で６回洗浄した。結合ファージをトリプシンで溶出した（２４）。

【０３７７】

溶出したファージを対数増殖期のＴＧ１細胞（OD_{600}＝０．５）に添加し、３７℃で１時間増殖させた。感染した細胞を、１００μｇ／ｍｌアンピシリン、２％グルコースを添加したＴＹプレートに塗布し、３０℃で一晩増殖させた。翌日、プレートを保存のために１００μｇ／ｍｌアンピシリン、１５％グリセロールを添加したＴＹ培地に収集した。この１回目の選択からの集団をヘルパーファージで回収し、ＰＥＧで沈殿させて、これらの１００μｌを、１回目で述べたのと同じ条件及び手順を使用して２回目の選択において使用した。

【０３７８】

ポリクローナルファージＥＬＩＳＡ

ＥＬＩＳＡのために、βＡＲをアミノプレート（Ｎｕｎｃカタログ番号：４３６００８）に共有結合的に固定化した。被覆及び洗浄緩衝液には２０ｎＭリガンド及び０．１％ｄｅｃ－Ｍを添加した。ＥＬＩＳＡプレートを２４μｇ／ｍｌのβ－ＡＲ及び５μｇ／ｍｌの２つの対照タンパク質（ＣＤ８６及びＮｏｔｃｈ１）で一晩被覆した。翌日、ウエルをＰＢＳ－Ｍで洗浄し、ブロックした。２回の選択からのポリクローナルファージ５０μｌ／ウエルを添加し（ＰＢＳ－Ｍ中に最初の培養容積に対して０．１×の濃度で）、α－Ｍ１３抗体（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、製品番号：２７－９４２１－０１）と共に室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ユウロピウム標識抗マウス抗体（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、製品番号：ＡＤ ０２０７）と共に室温で１時間インキュベートした。ウエルを洗浄し、５０μｌ／ウエルの増強溶液（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、製品番号：４００１－００１０）を添加して、１０分間インキュベートした。結果を図３０Ａに示しており、２回の選択後の実験Ａ及びＢにおけるβ－ＡＲ結合ファージの特異的富化を示唆する。シグナルはファージ選択Ａ（緩衝液中にリガンドが存在する）からの方が高かった。

【０３７９】

モノクローナルファージＥＬＩＳＡ

このアッセイのために、選択Ａからの２回目のファージの個々のクローンを採取し、回収して、ＰＥＧで沈殿させた。やはり、被覆、洗浄、ブロッキング及び抗体検出緩衝液に２０ｎＭリガンドと０．１％界面活性剤を添加した。Ｎｕｎｃアミノプレートのウエルは、β－ＡＲにより室温で１時間半に亘って被覆した。被覆したウエルをＰＢＳＴで３回、ＰＢＳで３回洗浄し、ＰＢＳ－Ｍでブロックして、５０μｌ／ウエルの０．１×ファージを添加し、室温で１時間インキュベートした。ウエルをＰＢＳで６回洗浄し、α－Ｍ１３抗体と共に室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで６回洗浄した後、ウエルを抗マウスＥｕ抗体と共に室温で１時間インキュベートした。次に、ウエルを洗浄し、増強溶液と共に１０分間インキュベートした。６９のスクリーニングしたクローンのうちで、２０のクローンが陽性と検出された（図３０Ｂ）。

【０３８０】

特異性ファージＥＬＩＳＡ

モノクローナルＥＬＩＳＡからの陽性ファージクローンのうちの１７をβ－ＡＲ及び３つの無関係なタンパク質に対する結合特異性に関して試験した。これは、Ｎ１－ＥＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓからの、ヒトＦｃドメインに融合したマウスＮｏｔｃｈ　１のＥＧＦドメイン１～１２、カタログ番号１０５７－ＴＫ）を含む。その他の対照タンパク質は、Ｃｈａｐｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ　２００６（２５）に記載されている一過性発現系においてＣＤ４融合体として発現される、マウスＣＤ８６の細胞外ドメイン及びマウスＮｏｔｃｈ　１の負の調節領域（それぞれＣＤ８６及びＮ１（ＮＲＲ））を含む。このＥＬＩＳＡでは、ニッケルキレートとアミノプレートの両方を比較のために使用した。やはり、β－ＡＲタンパク質を含むウエルに関しては、被覆、洗浄、ブロッキング及び抗体検出緩衝液に２０ｎＭリガンドと０．１％界面活性剤を添加した。前の章でモノクローナルＥＬＩＳＡに関して述べたようにウエルを洗浄し、抗体と共にインキュベートした。アッセイは、Ｈｉｓ及びアミノプレートの両方が使用可能であること、及び抗β－ＡＲクローンの大部分が無関係なタンパク質とは交差反応しないことを示した（図３１）。

【０３８１】

モノクローナルｓｃＦｖの発現とスクリーニング

サブクローニング、抗体一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）の発現及び精製は、Ｓｃｈｏｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ（２００７）に記載されているとおりとした。２回目のファージ集団の中の選択した抗体遺伝子（選択Ａ）をｐＳＡＮＧ１０－３Ｆベクター（２６）にサブクローニングし、ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞に形質転換した。９６のコロニーを採取し、当該技術分野における標準的な方法を使用して９６穴フォーマットでｓｃＦｖ抗体のペリプラズム発現を誘導した。ｓｃＦｖをペリプラズムから回収し、アミノプレート（Ｎｕｎｃ）でのＥＬＩＳＡのために使用した。洗浄し、ブロックしたウエルを５０μｌ／ウエルのｓｃＦｖと共に１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ユウロピウム標識抗ＦＬＡＧ抗体と共に室温で１時間インキュベートした。１２のクローンが１０００単位を超えるシグナルを生じ、陰性クローンについては５０未満のバックグラウンドレベルであった（図３２）。

【０３８２】

陽性クローンを結合によって選択し、二次ＥＬＩＳＡにおいて特異的に確認して、対象とするクローンを配列決定する。単離されたユニーク結合クローンの数を同定するために抗体配列を分析する。

【０３８３】

単離抗体によるリガンドの結合のブロッキングを試験するため、ペリプラズム抽出及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを使用したより大規模な製造（５０～５００ｍｌ）のためにユニーク陽性抗体クローンを選択する。この物質を、強固なレポーターアッセイを使用して受容体へのリガンド結合を妨げる能力（例えば、ｃＡＭＰ産生の阻害又はトランスフェクト細胞へのリガンド結合の阻害）に関して評価する。

【０３８４】

（実施例７）

β１－ＡＲと化合物の相互作用の評価

方法及び結果

ストレプトアビジン被覆ＣＭ５チップを備え、作業緩衝液（２０ｍＭ　ｔｒｉｓＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％ＤＭＳＯ、０．１％デシルマルトシド、ｐＨ７．８）で平衡化させたＢｉａｃｏｒｅ　Ｓ５１光学バイオセンサーを使用して１０℃で結合試験を実施した。

【０３８５】

β１ＡＲの固定化

β１ＡＲ３６－Ｍ２３を、ＥＺ結合スルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ＬＣビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｎｏ．２１３３８）を使用して最小限にビオチニル化した：前記ビオチンを受容体製剤に添加し、（１００μＭアルプレノロールでスパイクして）、４℃で３時間反応させた後、遊離ビオチンをカラムクロマトグラフィーによって除去した。

【０３８６】
図３３は、ストレプトアビジン被覆フローセルへのビオチニル化β１ＡＲの２つの捕捉段階を示す。第一段階で～１２００ＲＵを捕捉し、第二段階では～４０００ＲＵを捕捉した。
【０３８７】
安定化β受容体で被覆したＢｉａｃｏｒｅセンサーチップを使用して、β受容体において活性を有する薬剤の結合を特徴づけることが可能であった。化合物のフロースルーによりオンレートを測定することが可能であった。その後の洗浄により、オフレートの測定が可能となった。これらのパラメータは動的親和性値（K_d）を測定するために使用してよいであろう。
【０３８８】
図３４は、受容体表面への結合に関して３倍希釈系列において反復して試験したアルプレノールに対する応答を示す。最高濃度は６６６ｎＭであり、各々の濃度を３回試験した。応答は濃度依存性であり、再現性がある。灰色の線は、簡単な１：１相互作用モデルのフィットを表示し、このフィットから決定したパラメータを挿入図に列挙する（括弧内の数字は最後の桁の誤差である）。
【０３８９】
図３５は、図３４に示すデータの代替的な表現である。応答は、各々の曲線について決定した（フィッティングから）Ｒｍａｘに対して標準化されている。
【０３９０】
アルプレノールデータは、ビオチニル化ｂ１ＡＲが活性であり、このバイオセンサーアプローチが化合物／受容体相互作用を特徴づけるために使用可能であることを明らかにする。
【０３９１】
図３６は、β１ＡＲへのプロプラノロール結合に対する応答を示す。１１１ｎＭが最高濃度であり、各々の濃度を２回又は３回試験した。プロプラノロールのデータを、図３７において標準化された応答として表示する。
【０３９２】
β１ＡＲ表面がほぼ３日齢である場合、本発明者らは、受容体が経時的にどの程度活性を喪失していたかを測定するためにアルプレノロール結合を再試験した。図３８は、３３３ｎＭを最高濃度としたアルプレノロール結合応答を示す。受容体は、最初に捕捉された場合とほぼ同程度に活性であると思われた。
【０３９３】
他のスポット上のβ１ＡＲ捕捉
Ｓ５１バイオセンサーは２つの反応スポットを同時に観測する能力を有するので、本発明者らは、他のストレプトアビジン被覆スポット上で８０００ＲＵの密度に受容体を捕捉した（図３９）。
【０３９４】
８０００ＲＵのβ１ＡＲスポットへのアルプレノロール結合の試行試験からのデータを図４０に示す。
【０３９５】
β受容体アゴニスト、サルメテロールを、１．６７μＭの最高濃度を使用して試験し、各々の濃度を２回又は３回試験した（図４１Ａ及びＢ）。応答は濃度依存的であり、大部分は再現可能である。また、予測されたように、８０００ＲＵ表面からの応答（図４１Ｂ）は４２００ＲＵ表面（図４１Ａ）より大きかった。
【０３９６】
サルメテロールは、アルプレノロール又はプロプラノロールよりもはるかに速く解離し、はるかに弱く受容体に結合した。サルメテロールはβ１－ＡＲに対して低い親和性を有し、特に本明細書で使用するアンタゴニスト安定化形態の受容体に対して低い親和性を有するので、これは当然予想される。加えて、本発明者らは、解離期（ｔ＞６０秒）の間の

応答へのモデルの低いフィット性によって示されるように、相互作用における幾分かの複雑さを検出した。図４２Ａ及びＢは、標準化した応答として表示したデータを示す。

【０３９７】

非選択的β－アドレナリンアゴニストであるイソプロテレノールを、２μＭの最高濃度を使用して試験した（図４３Ａ及びＢ）。この分析において、イソプロテレノールはその他の化合物よりもはるかに緩やかな会合速度を示した。化合物は９０秒間注入した。

【０３９８】

図４４Ａ及びＢは、２つのβ１ＡＲ表面への１１１μＭ及び３３３ｎＭのカルベジロール結合に対する応答を示す。カルベジロールは、これまでに検討した他の化合物よりもはるかに緩やかな解離速度を示す。

【０３９９】

結論

１．最小限のビオチニル化及びストレプトアビジンによる捕捉は、化合物の結合を測定するために使用可能である活性なβ１ＡＲ表面を生じた。

２．１０℃で、β１ＡＲ表面は数日間に亘って活性なままであった。

３．アゴニスト及びアンタゴニストを含む試験した化合物に関して、会合及び解離速度の両方、並びに親和性における相違を認めた。これは、バイオセンサーアッセイがこのｂ１ＡＲ製剤に結合する化合物のパネルを特徴づけるために実行可能なアプローチであることを明らかにする。

４．以下の表Ａに示すように結合パラメータを幾つかの化合物について測定し、その全てを１０℃で測定した。

【０４００】

【表Ａ】

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
アルプレノロール	(1.453 ± 0.007) x 10^5	(6.3 ± 0.1) x 10^{-3}	44 ± 1
プロプラノロール	(5.94 ± 0.02) x 10^5	(2.17 ± 0.04) x 10^{-3}	3.64 ± 0.07
サルメテロール[1]	(3.8 ± 0.3) x 10^4	(9.5 ± 0.4) x 10^{-2}	2500 ± 300
イソプロテレノール[1,2]	(6 ± 2) x 10^3	(4.4 ± 0.2) x 10^{-3}	800 ± 300
カルベジロール[1,2]	(2.3 ± 0.9) x 10^5	(1.1 ± 0.1) x 10^{-3}	5 ± 3

[1] 2つのb1AR表面から平均した

[2] 予備的結果

【０４０１】

（実施例８）

薬剤探索における化合物のスクリーニングのためのアデノシンＡ２ａ　ＳｔａＲの使用方法

Ａ２ａ受容体において活性を有する化合物を同定するため、アンタゴニスト形態（Ｒａｎｔ２２と呼ぶ）で立体構造的に選択した熱安定化アデノシンＡ２ａ受容体（Ａ２ａ　ＳｔａＲ）を使用して、ライブラリーからの化合物をスクリーニングした。ＳｔａＲは以前に開示されているように作製した（Ｍａｇｎａｎｉ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｏ－ｅｖｏｌｖｉｎｇ　ｓｔａｂｉｌｉｔｙ　ａｎｄ　ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ　ｈｏｍｏｇｅｎｅｉｔｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ａｄｅｎｏｓｉｎｅ　Ａ２ａ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２００８　Ａｕｇ　５；１０５（３１）：１０７４４－９）。Ｒａｎｔ２２　Ａ２ａ受容体でトランスフェクトしたＨＥＫ２

９３Ｔ細胞を、１０％ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中、３７℃、５％CO_2にてＴ－１７５フラスコの単層で増殖させた。Ｔ－１７５表面から細胞を削り取って採取し、遠心分離によって収集した。

【０４０２】

膜の調製

細胞ペレットを１０ｍｌの２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４プラスプロテアーゼインヒビターカクテル錠（Ｒｏｃｈｅ）に再懸濁し、Ｔｉｓｓｕｅｍｉｚｅｒを使用して２０，５００ｒｐｍで３０秒間に亘ってホモジナイズした。ホモジネートを２００×ｇで１５分間に亘って４℃で遠心分離した。

【０４０３】

上清を取り出し、氷上に保存した。この手順をさらに２回反復し、プールした上清を４０，０００×ｇで４５分間に亘って４℃で遠心分離した。膜を２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４プラスプロテアーゼインヒビターカクテル錠の１ｍｌ分量に再懸濁した。タンパク質濃度をＢＣＡプロテインアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ）によって測定した。

【０４０４】

スクリーニングアッセイ

調製した膜の１０μｇ分量を、［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５　３．７ｎＭ及び適切な量の非標識リガンドと共に室温で６０分間インキュベートした。１０ｍＭから１μＭの範囲の連続希釈を９６穴フォーマットでスクリーニングした。フィルターＧＦＣプレートを０．１％ＰＥＩ中で６０分間予浸した。Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ　ｃｏｕｎｔｅｒを3分／ウエルで使用した液体シンチレーション計数によって放射能を測定した。

結果

濃度応答曲線にフィットさせるためにＧｒａｐｈＰａｄプリズムを使用してデータを解析した。化合物のIC_{50}を、［^{3}Ｈ］ＺＭ２４１３８５の特異的結合の５０％阻害を生じさせる濃度として計算した。図４５及び以下の表Ｂに提示するデータは、試験した化合物がＡ２ａ受容体ＳｔａＲへの結合を阻害することができ、このアッセイにおいて一連の活性を有していたことを明らかにする。このデータは、化合物スクリーニングのためのＳｔａＲの有用性を明らかにする。

【０４０５】

【表Ｂ】

TableB

	HTL0245	HTL0246	HTL0247	HTL0248	HTL0249	HTL0250	HTL0251	HTL0252	CGS15943
ベストフィット値									
基部	105.2	151.2	47.23	44.21	25.74	13.98	-5.831	176.4	22.40
上部	1428	1414	1406	1519	1527	1382	1446	1257	1530
LogIC50	-6.795	-6.442	-7.552	-8.098	-8.431	-4.112	-2.874	-4.658	-8.661
IC50	1.605e-007	3.614e-007	2.804e-008	7.985e-009	3.709e-009	7.735e-005	0.001337	2.199e-005	2.183e-009
標準誤差									
基部	29.07	70.00	40.67	18.05	7.115	104.4	79.15	154.9	29.97
上部	44.68	83.73	96.91	50.84	20.46	38.13	26.10	74.89	40.93
LogIC50	0.07888	0.1886	0.1338	0.05205	0.02427	0.1202	0.2821	0.2878	0.08677

【０４０６】

参照

1. S. H. White (2004) *Protein Sci* **13**, 1948-1949.
2. C. G. Tate (2001) *FEBS Lett* **504**, 94-98.
3. R. Grisshammer, C. G. Tate (1995) *Q Rev Biophys* **28**, 315-422.
4. J. U. Bowie (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**, 397-402.
5. F. W. Lau, S. Nauli, Y. Zhou, J. U. Bowie (1999) *J Mol Biol* **290**, 559-564.
6. Y. Zhou, J. U. Bowie (2000) *J Biol Chem* **275**, 6975-6979.
7. S. Faham, D. Yang, E. Bare, S. Yohannan, J. P. Whitelegge, J. U. Bowie (2004) *J Mol Biol* **335**, 297-305.
8. Y. Yarden, H. Rodriguez, S. K. Wong, D. R. Brandt, D. C. May, J. Burnier, R. N. Harkins, E. Y. Chen, J. Ramachandran, A. Ullrich, *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6795-6799.
9. T. Warne, J. Chirnside, G. F. Schertler (2003) *Biochim Biophys Acta* **1610**, 133-140.
10. E. M. Parker, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 9987-9996.
11. E. M. Parker, K. Kameyama, T. Higashijima, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 519-527.
12. W. J. Degrip (1982) *Methods in Enzymology* **81**, 256-265.
13. K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, *et al* (2000) *Science* **289**, 739-745.
14. J. Li, P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa, G. F. Schertler (2004) *J Mol Biol* **343**, 1409-1438.
15. R. Jaenicke, G. Bohm (1998) *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 738-748.
16. J. Tucker, R. Grisshammer (1996) *Biochem J* **317** (Pt 3), 891-899.
17. W. Schaffner, C. Weissmann (1973) *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
18. C. G. Tate (1998) *Methods Enzymol* **296**, 443-455.
19. H. M. Weiss, R. Grisshammer (2002) *Eur J Biochem* **269**, 82-92.
20. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. and Kobilka, B. K. (2007) *Nature* 15, 383-387.

21. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. and Stevens, R. C. (2007) *Science* 318:1258-1265.

22. Minneman, K. P., Weiland, G. A. and Molinoff, P. B. (1980) *Mol Pharmacol* 17:1-7.

23. Parker, E. M., Swigart, P., Nunnally, M. H., Perkins, J. P. and Ross, E. M. (1995) *J Biol Chem* 270:6482-6487.

24. Schofield DJ, Pope A, Clementel V, Buckell J, Chapple SDJ,, Clarke KF, Conquer JS, Crofts AM, Crowther SRE, Dyson MR, Flack G, Griffin GJ, Hooks Y, Howat WJ, Kolb-Kokocinski A,, Kunze S, Martin CD, Maslen GL,, Mitchell JM, O'Sullivan M, Perera RL, Roake W, Shadbolt SP, Vincent KJ, Warford A, Wilson WE, Xie J, Young JL, McCafferty J (2007) Application of phage display to high throughput antibody generation and characterisation. Genome Biology. 8 (11) R254

25. Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. (2006) Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. BMC Biotechnol. 2006 Dec 22;6:49. http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/49

26. Martin C, Rojas G, Mitchell JN, Vincent KJ, Wu J, McCafferty J, Schofield DJ (2006) A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. BMC Biotechnology **6:**46 doi:10.1186/1472-6750-6-46 http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/46/abstract

27. Warne *et al* (2008) Structure of a β adrenergic G protein coupled receptor *Nature* **454**: 486-491

【図１】

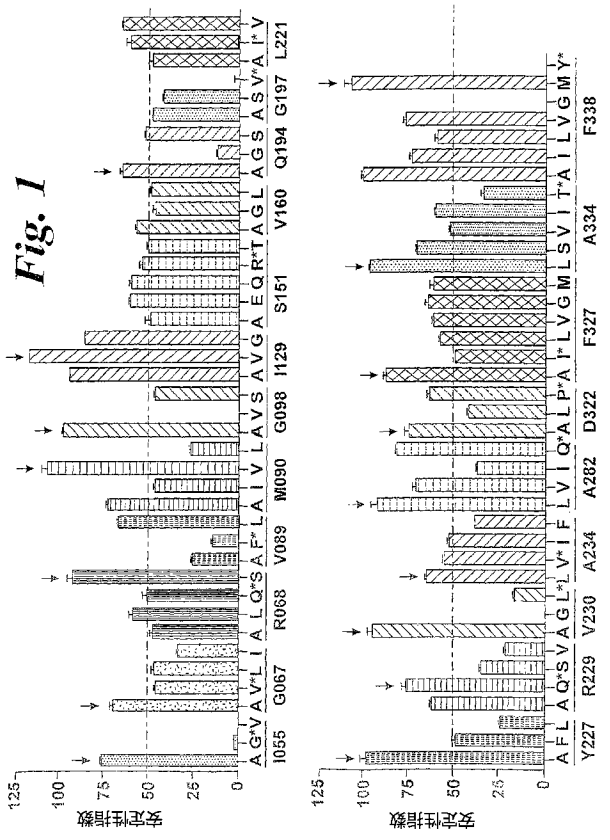


Fig. 1

【図２】

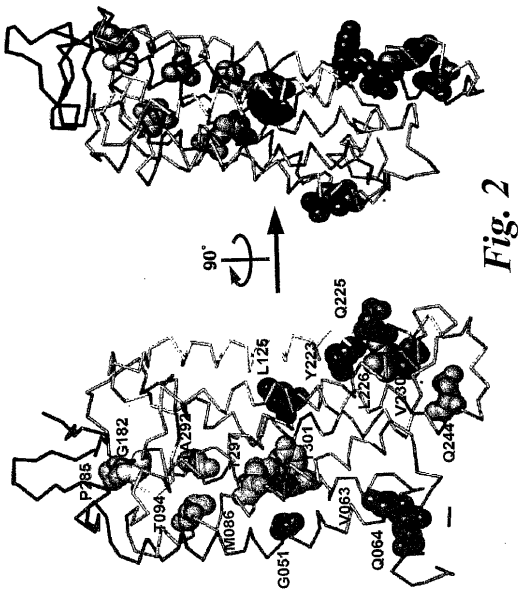


Fig. 2

【図３】

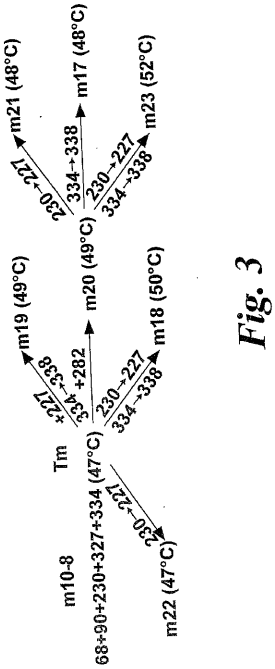


Fig. 3

【図４】

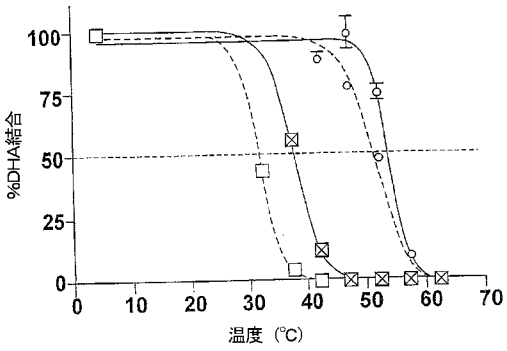


Fig. 4

【図５】

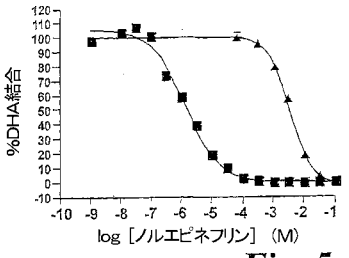


Fig. 5a

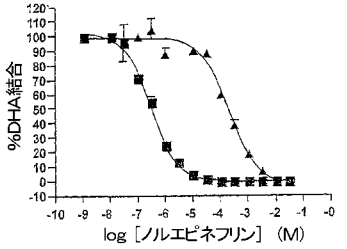


Fig. 5b

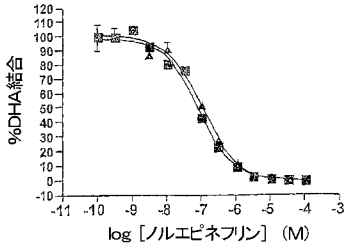


Fig. 5c

【図６】

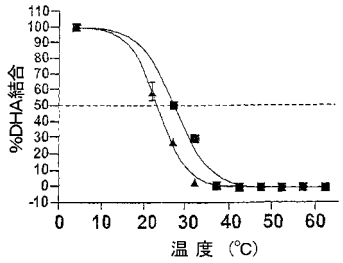


Fig. 6a

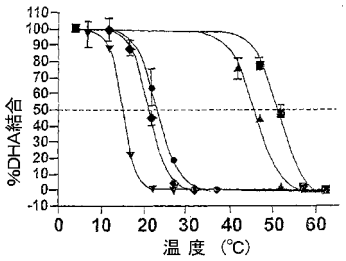


Fig. 6b

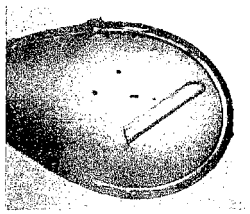


Fig. 6c

【図７】

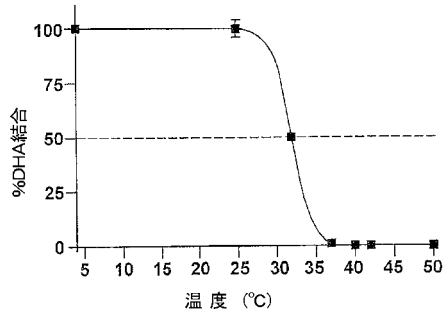


Fig. 7

【図８】

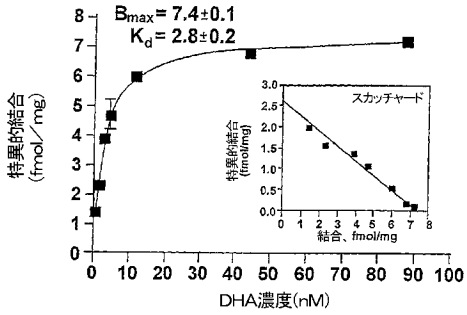


Fig. 8a

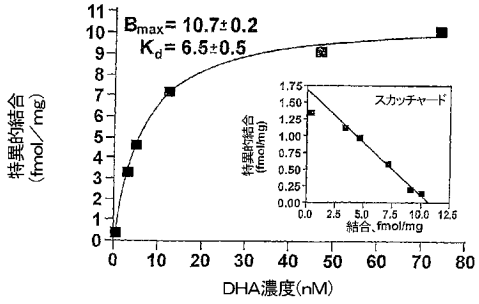


Fig. 8b

【図９Ａ】

ヒトβ1、β2、及びβ3とシチメンチョウβ－アドレナリン受容体とのアラインメント

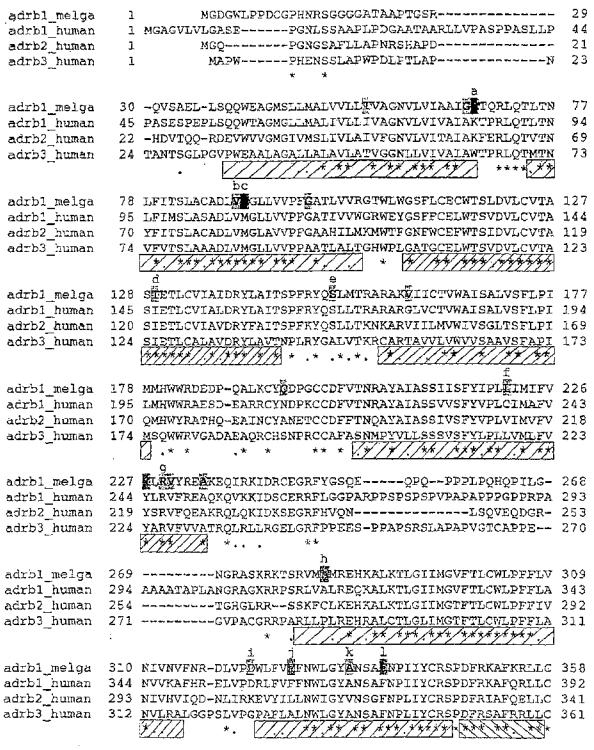


Fig. 9 (Page 1 of 2)

【図９Ｂ】

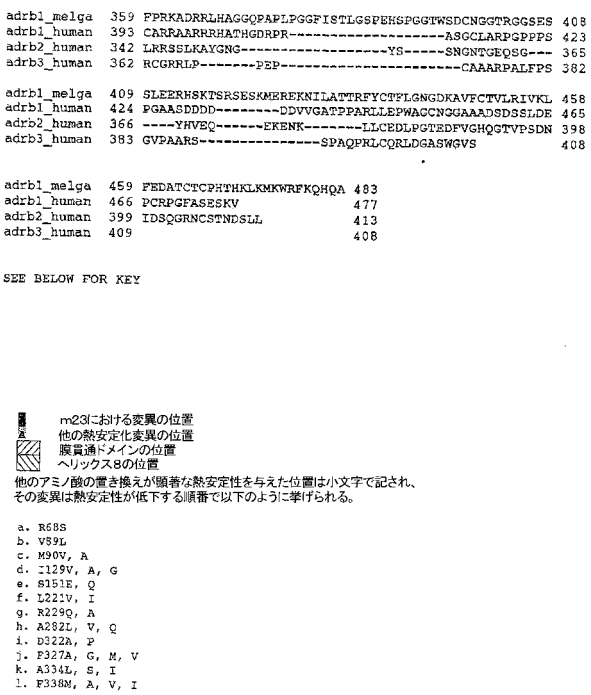


Fig. 9 (Page 2 of 2)

【図１０Ａ】

ヒトアデノシン受容体のアラインメント

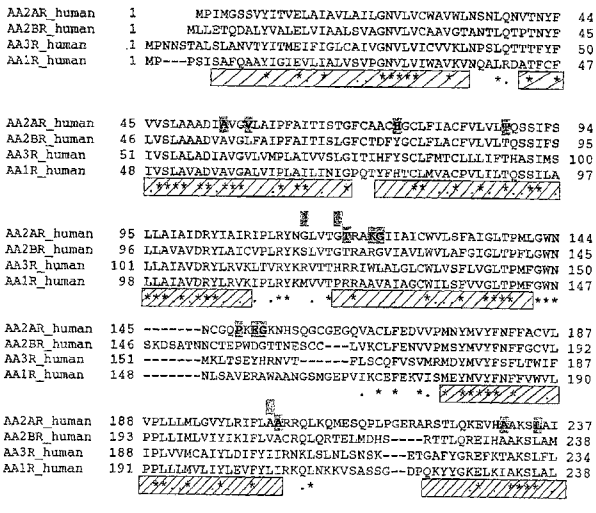


Fig. 10 (Page 1 of 2)

【図１０Ｂ】

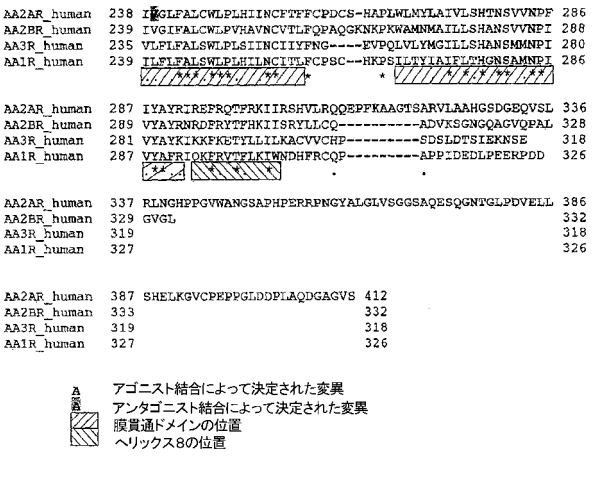


Fig. 10 (Page 2 of 2)

【図１１Ａ】

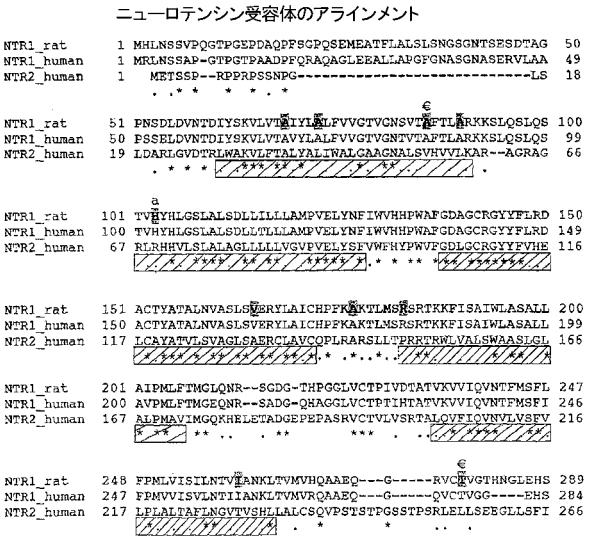


Fig. 11 (Page 1 of 2)

【図１１Ｂ】

(a) H103: A、N、S、V、L、Mで熱安定性が得られた
H103N及びH103Sのみが発現のwtレベルを与えた

Fig. 11 (Page 2 of 2)

【図１２】

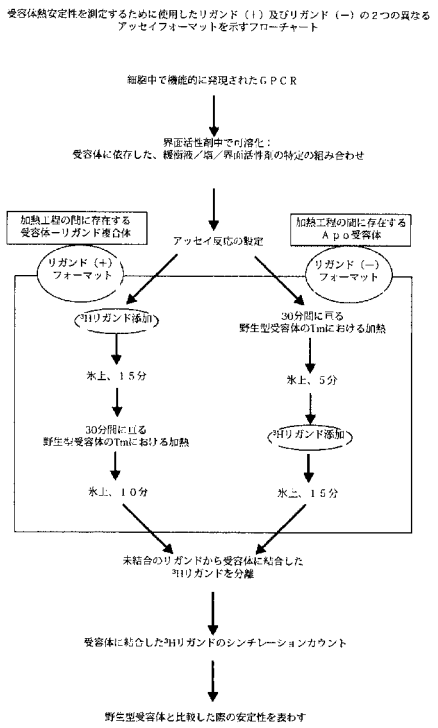


Fig. 12

【図１３Ａ】

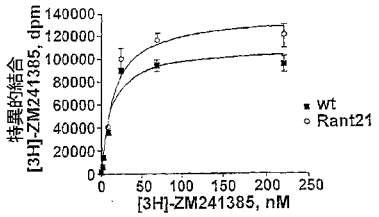


Fig. 13A

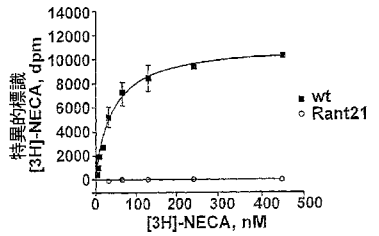


Fig. 13B

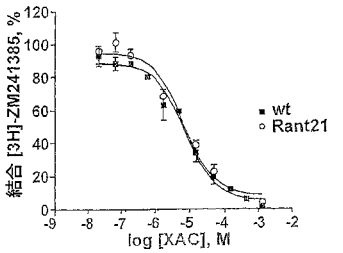


Fig. 13C

【図１３Ｂ】

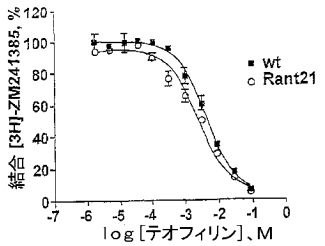


Fig. 13D

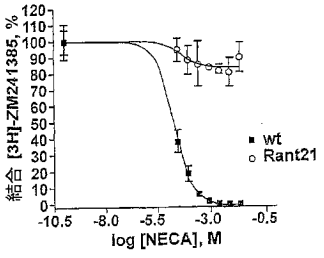


Fig. 13E

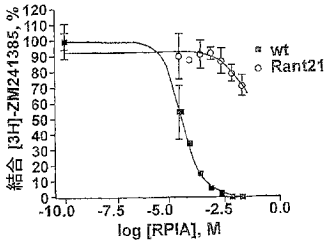


Fig. 13F

【図１４】

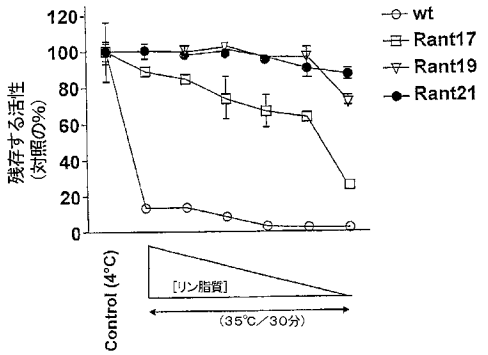


Fig. 14A

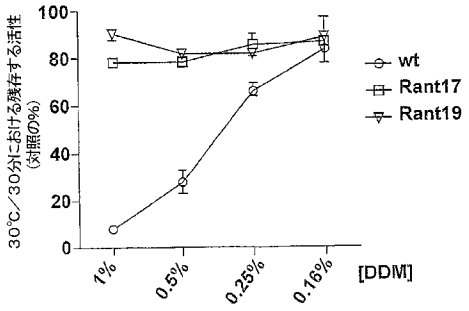


Fig. 14B

【図１５】

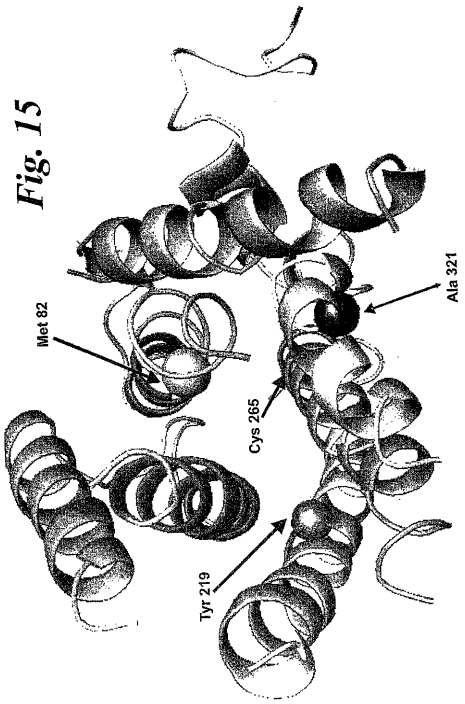


Fig. 15

【図１６】

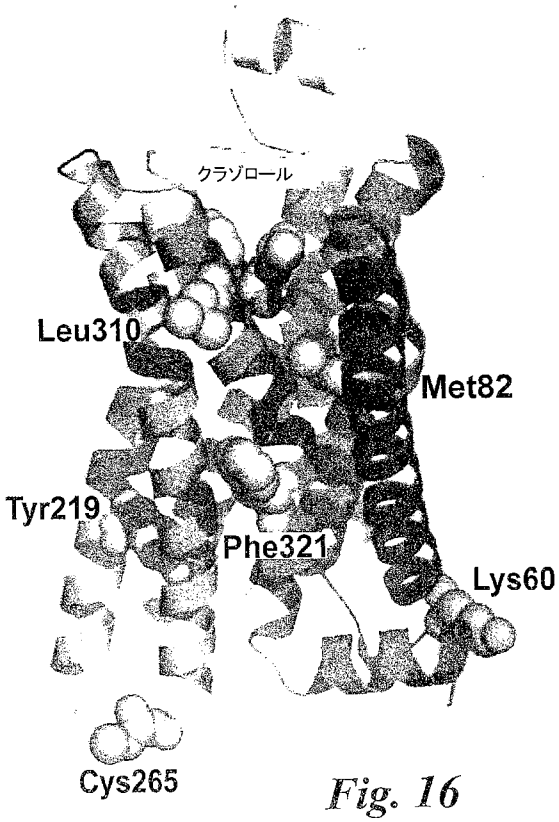


Fig. 16

【図１７Ａ】

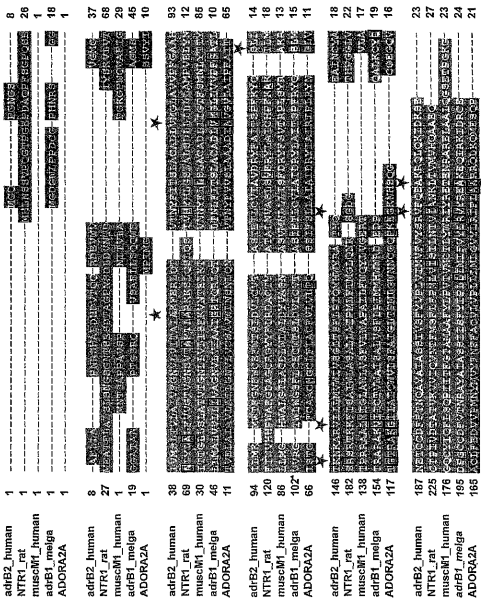


Fig. 17 (Page 1 of 3)

【図１７Ｂ】

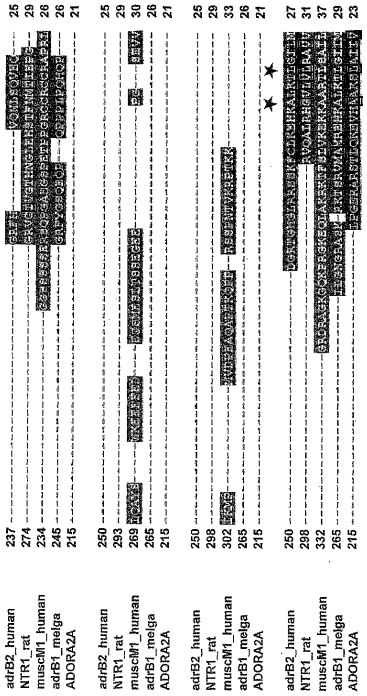


Fig. 17 (Page 2 of 3)

【図１７Ｃ】

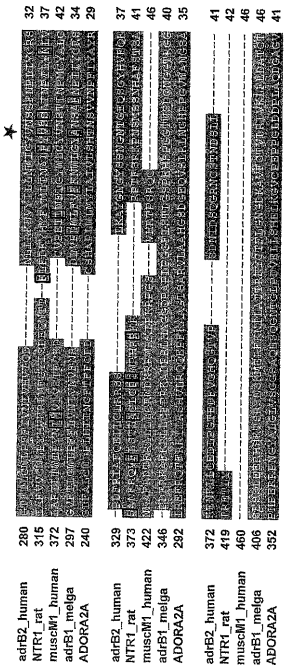


Fig. 17 (Page 3 of 3)

【図１８】

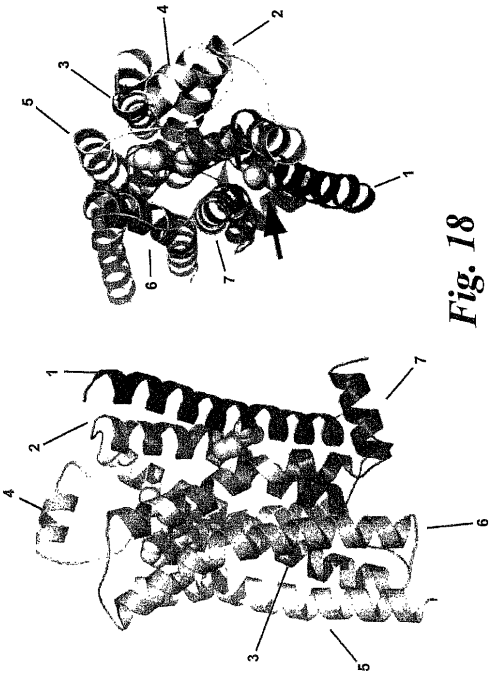


Fig. 18

【図１９】

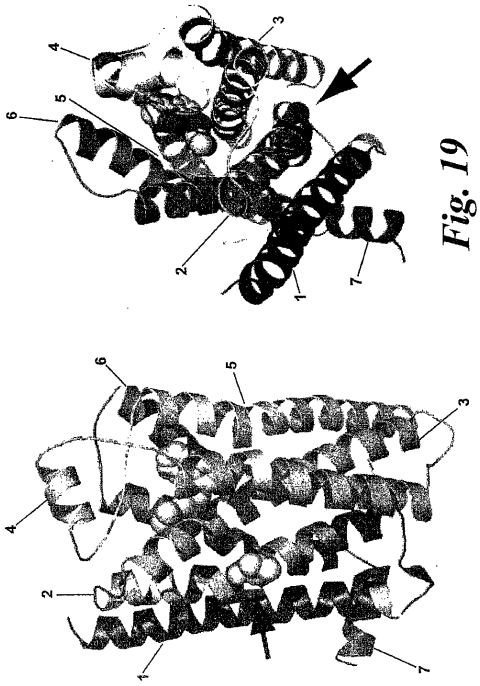


Fig. 19

【図２０】

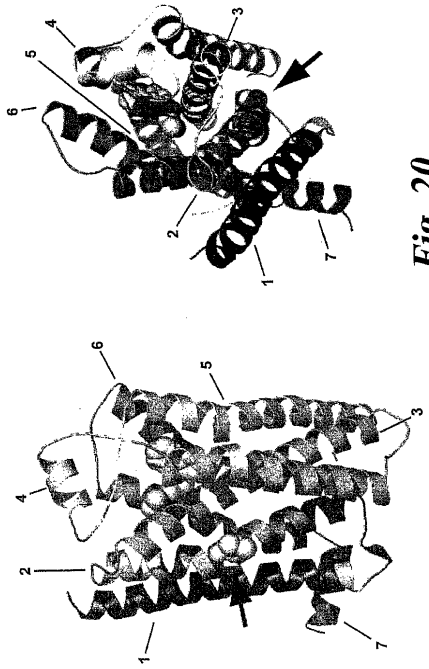


Fig. 20

【図２１】

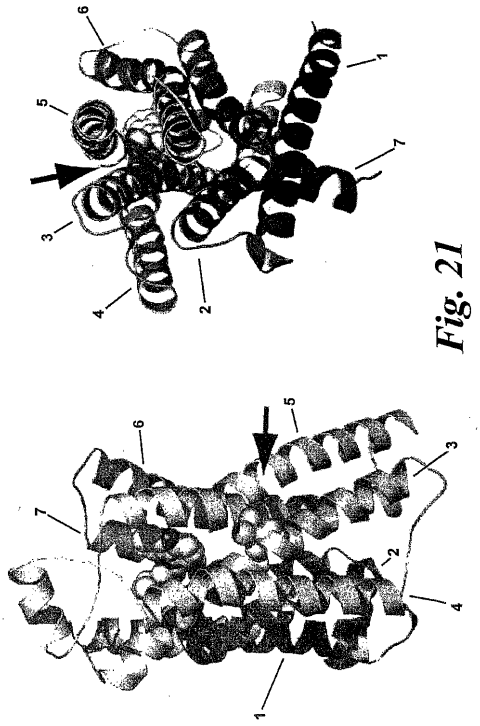


Fig. 21

【図２２】

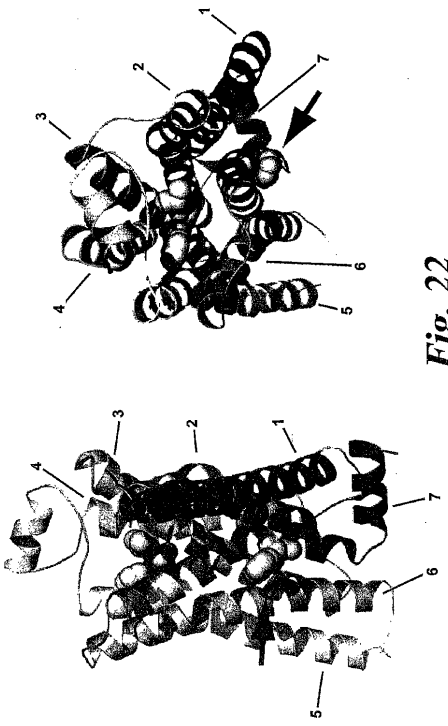


Fig. 22

【図２３】

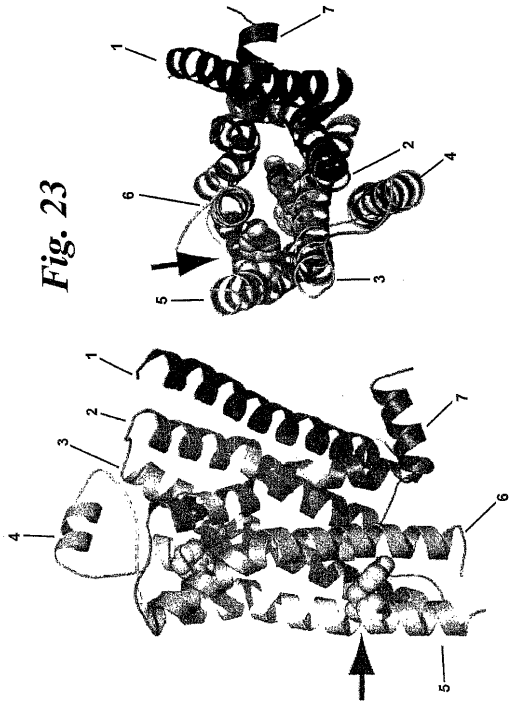


Fig. 23

【図２４】

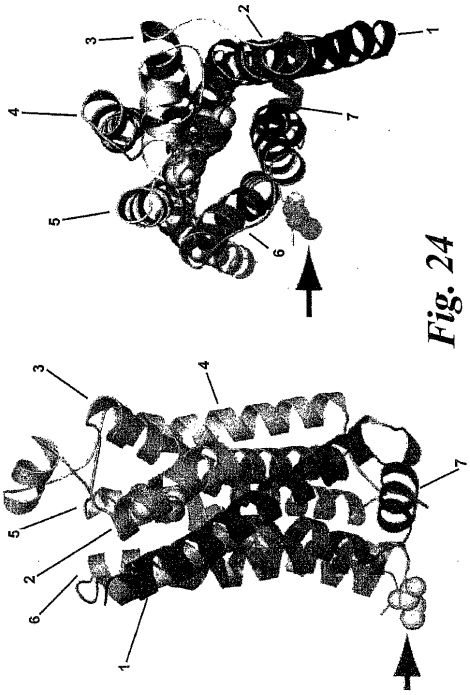


Fig. 24

【図２５】

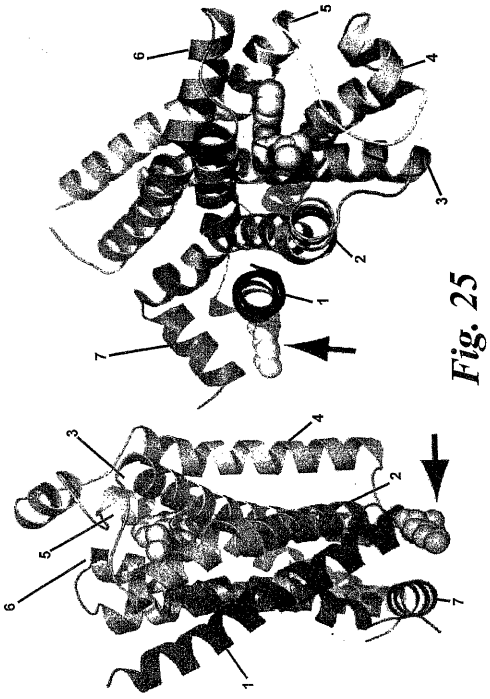


Fig. 25

【図２６】

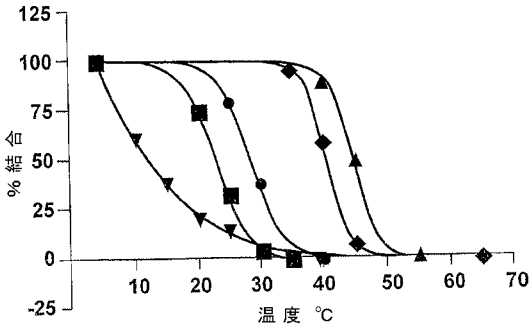


Fig. 26

【図２７】

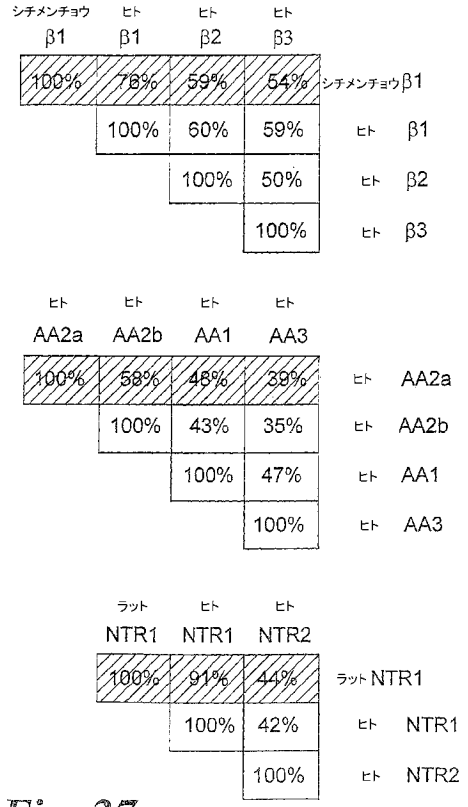
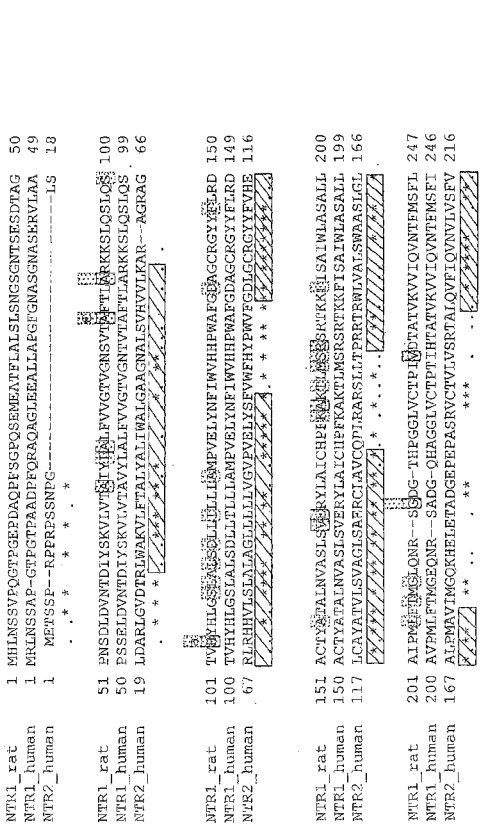


Fig. 27

【図２８Ａ】

Fig. 28 (Page 1 of 2)



【図２８Ｂ】

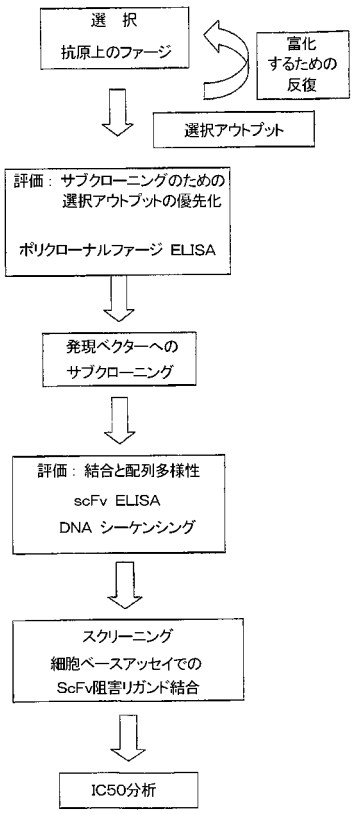
(a) H103: A, N, S, V, L, Mで熱安定性が得られた
H103N及びH103Sのみがwtレベルの発現を与えた

Fig. 28 (Page 2 of 2)

【図２９】

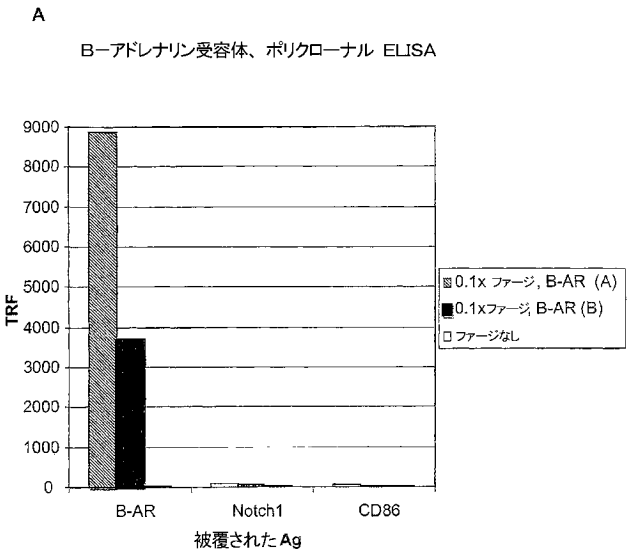
Figure 29

阻害性scFv結合物質の同定のための典型的なリード化合物単離工程の概略図



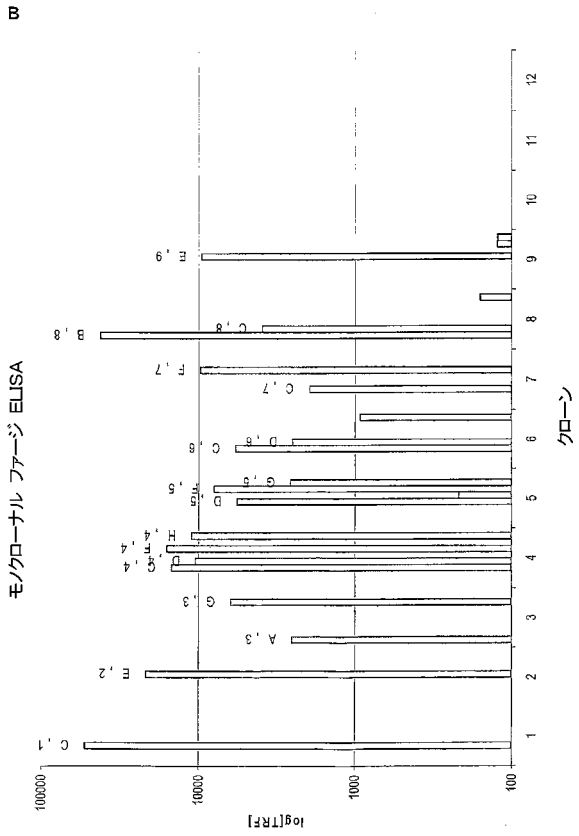
【図３０Ａ】

Figure 30 (Page 1 of 2)

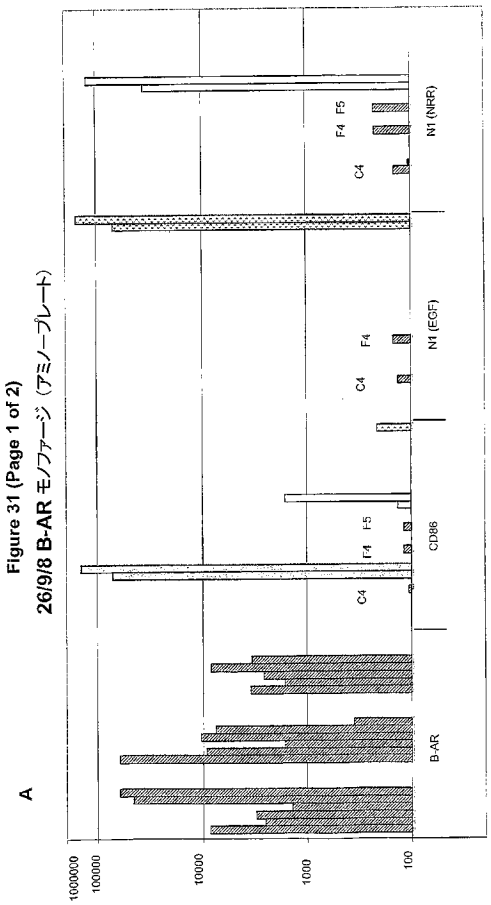


【図３０Ｂ】

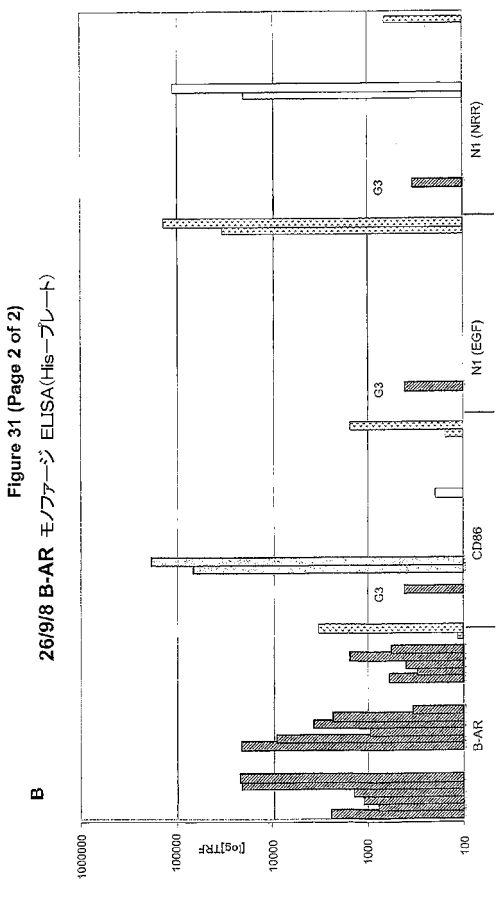
Figure 30 (Page 2 of 2)



【図３１Ａ】

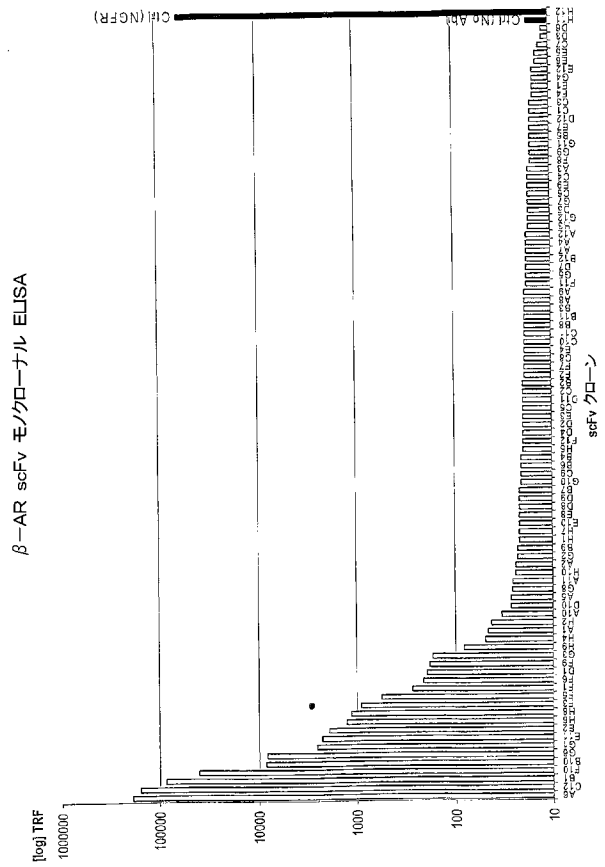


【図３１Ｂ】



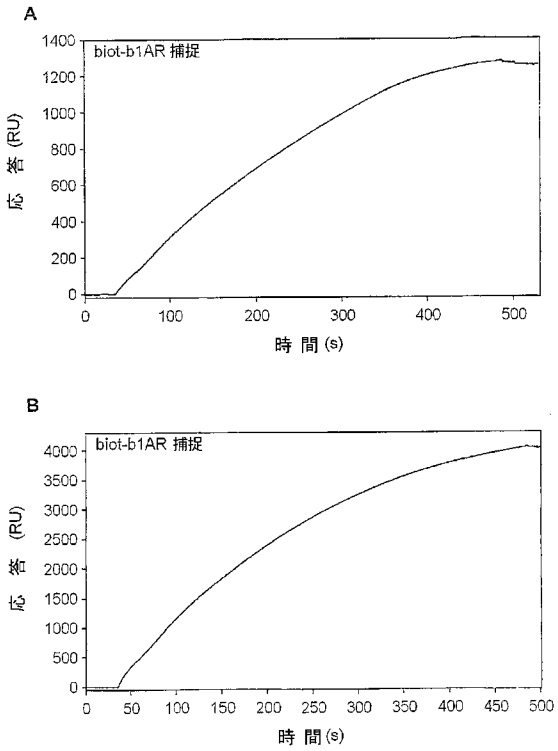
【図３２】

Figure 32



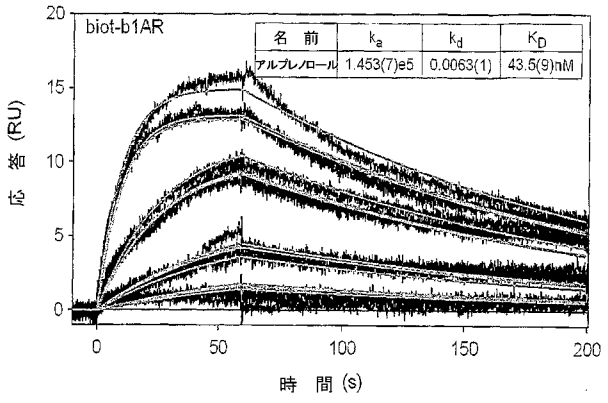
【図３３】

Figure 33



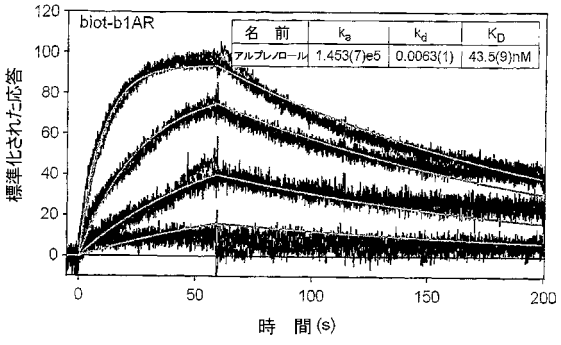
【図３４】

Figure 34



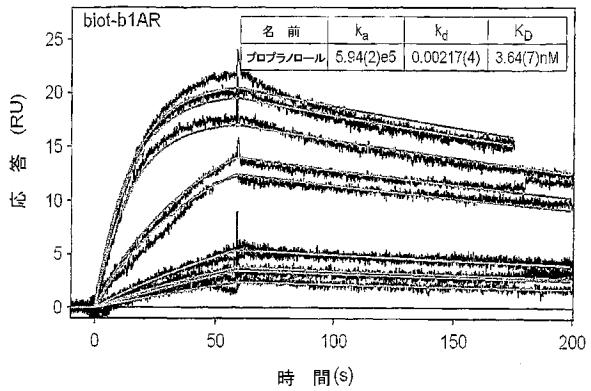
【図３５】

Figure 35



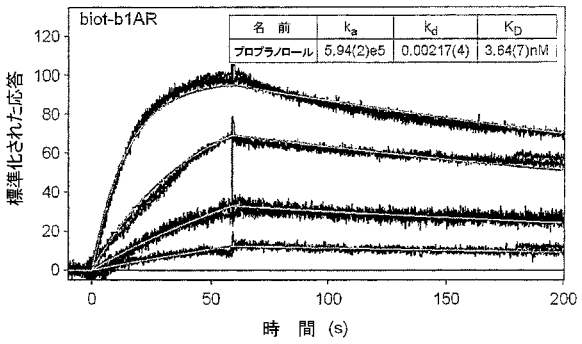
【図３６】

Figure 36



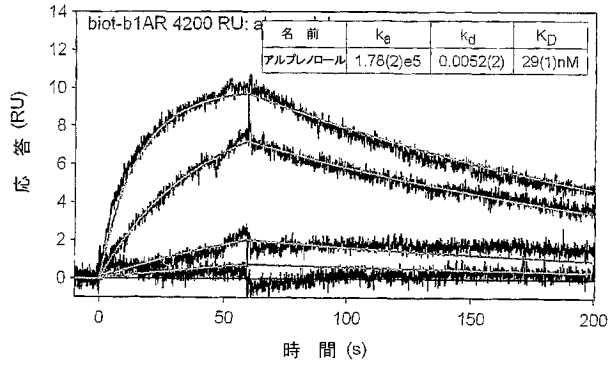
【図３７】

Figure 37



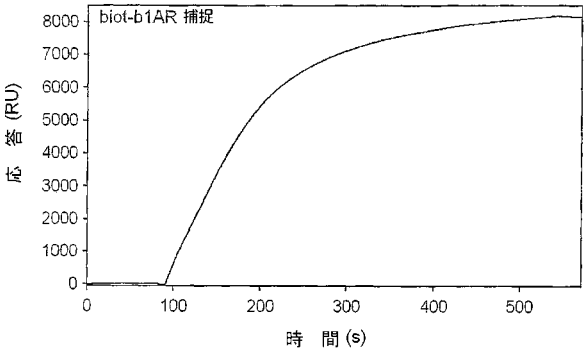
【図３８】

Figure 38



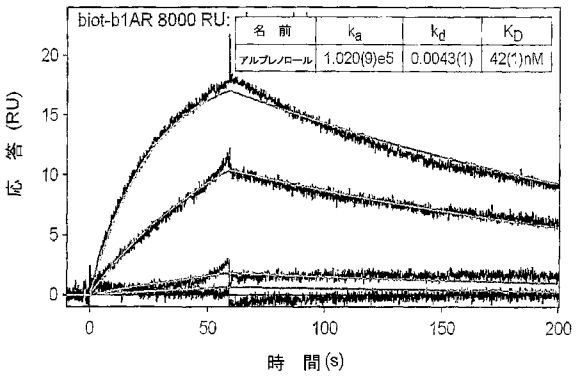
【図３９】

Figure 39



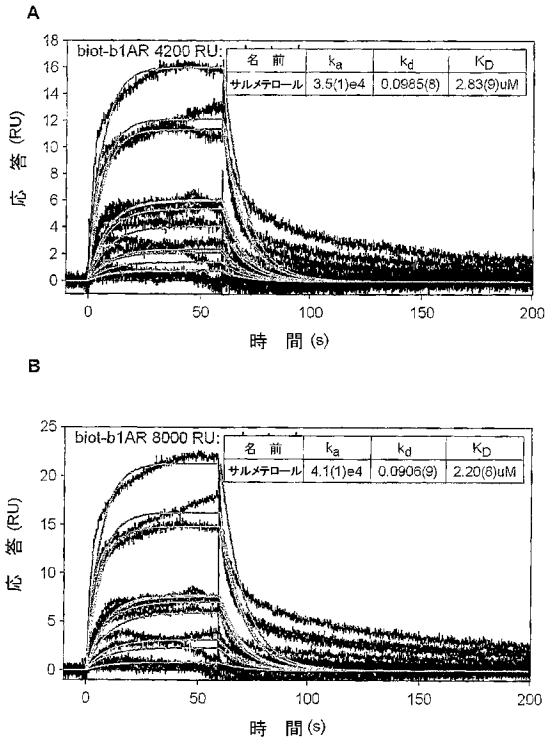
【図４０】

Figure 40



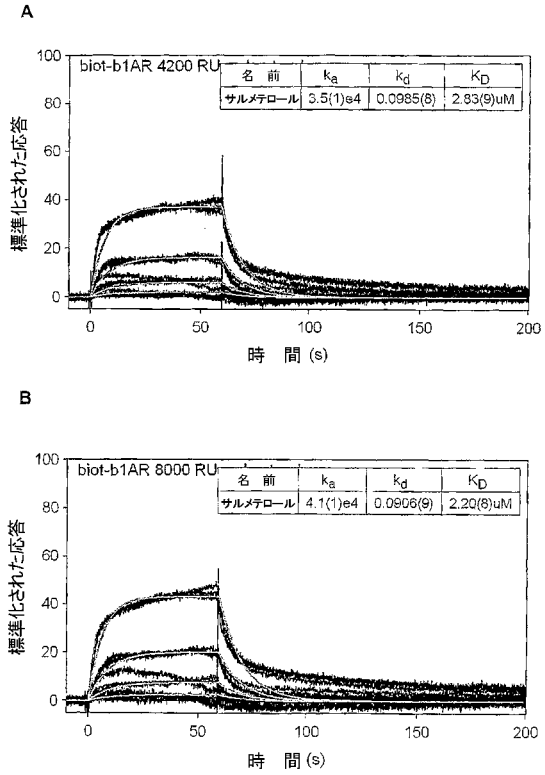
【図４１】

Figure 41



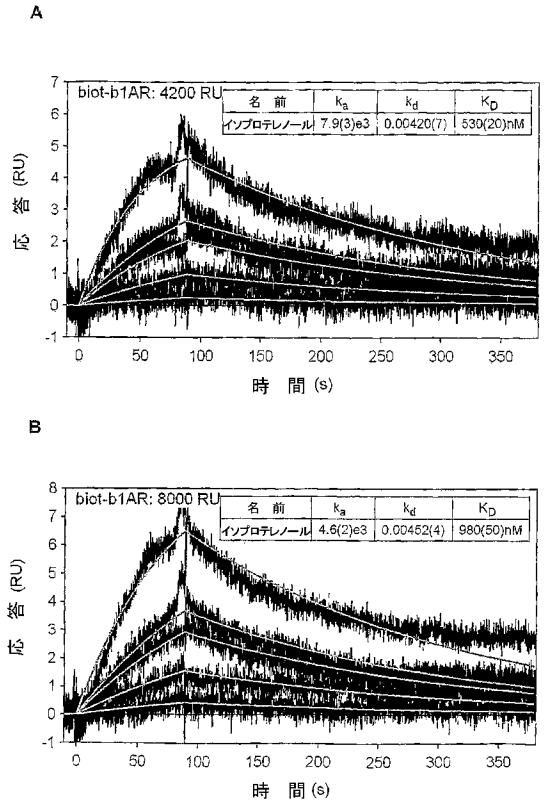
【図４２】

Figure 42



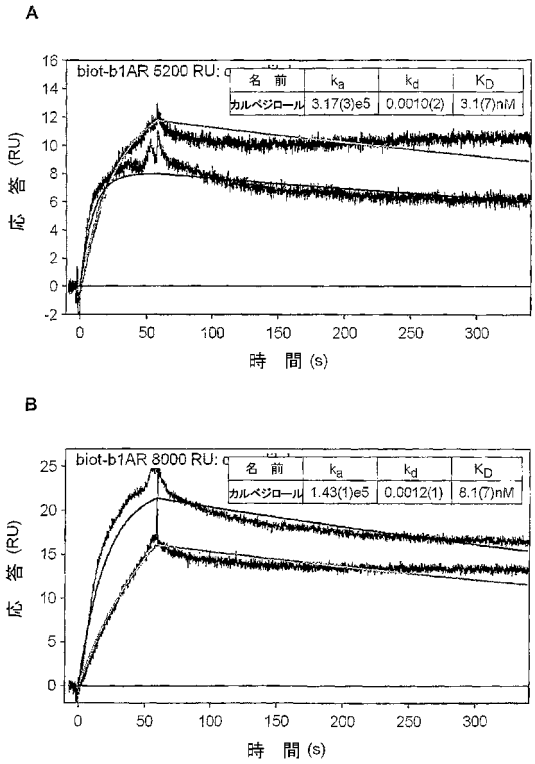
【図４３】

Figure 43



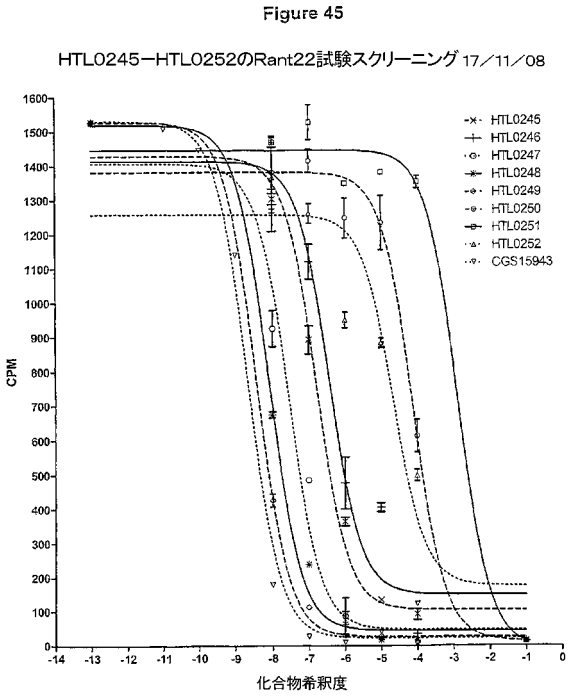
【図４４】

Figure 44



【図４５】

Figure 45



【配列表】

2011508875000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/004223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/566 C07K14/72 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D'ANTONA A M ET AL: "A cannabinoid receptor 1 mutation proximal to the DRY motif results in constitutive activity and reveals intramolecular interactions involved in receptor activation" BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1108, no. 1, 7 September 2006 (2006-09-07), pages 1-11, XP025101414 ISSN: 0006-8993 [retrieved on 2006-09-07] the whole document -/--	1-23, 32-44

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 March 2009	19/08/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Martin

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/004223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STANDFUSS ET AL: "Crystal Structure of a Thermally Stable Rhodopsin Mutant" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 372, no. 5, 11 September 2007 (2007-09-11), pages 1179-1188, XP022242879 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-23, 32-44
A	LEE N H ET AL: "ALANINE SCANNING MUTAGENESIS OF CONSERVELD ARGININE/LYSINE-ARGININE/L YSINE-X-X-ARGININE/LYSINE G PROTEIN/ACTIVATING MOTIFS ON M1 MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 50, no. 1, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 140-148, XP000901009 ISSN: 0026-895X the whole document	1-23, 32-44
A	SAMAMA P ET AL: "A mutation-induced activated state of the beta2-adrenergic receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 268, no. 7, 5 March 1993 (1993-03-05), pages 4625-4636, XP002135769 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-23, 32-44
A	LATTION A-L ET AL: "Constitutively active mutants of the beta1-adrenergic receptor" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 457, no. 3, 3 September 1999 (1999-09-03), pages 302-306, XP004260170 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-23, 32-44
P,X	WO 2008/114020 A (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; HENDERSON RICHARD [GB]; TATE CHRISTOPHER GOR) 25 September 2008 (2008-09-25) cited in the application the whole document	1-23, 32-44

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/004223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SERRANO-VEGA MARIA J ET AL: "Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 105, no. 3, 22 January 2008 (2008-01-22), pages 877-882, XP002487473 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-23, 32-44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2008/004223

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23, 32-44

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2008/004223

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-23, 32-44

The claims concern methods of producing a binding partner to a mutant GPCR that has increased stability in a particular conformation relative to the cognate wildtype (parent) GPCR.

---

2. claims: 24-31

The claims concern methods of producing an antibody for a mutant GPCR that has increased stability in a particular conformation relative to the parent GPCR.

---

3. claims: 45-66, 78

The claims concern methods for providing a mutant GPCR wherein the binding of a selected ligand has increased stability compared to a parent GPCR.

---

4. claims: 67-77, 79-92, 94-96

The claims concern methods for providing a mutant GPCRs wherein said mutant has increased stability compared to parent GPCRs.

---

5. claims: 93, 103-108

The claims concern mutant GPCR and products comprising said GPCR with increased stability compared to parent GPCR.

---

6. claims: 97-102

The claims concern binding partners to mutant GPCRs with increased stability compared to parent GPCRs and synthesis of said binding partners.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2008/004223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008114020 A	25-09-2008	GB 2447786 A	24-09-2008
		GB 2456235 A	15-07-2009
		GB 2456236 A	15-07-2009
		GB 2456237 A	15-07-2009

フロントページの続き

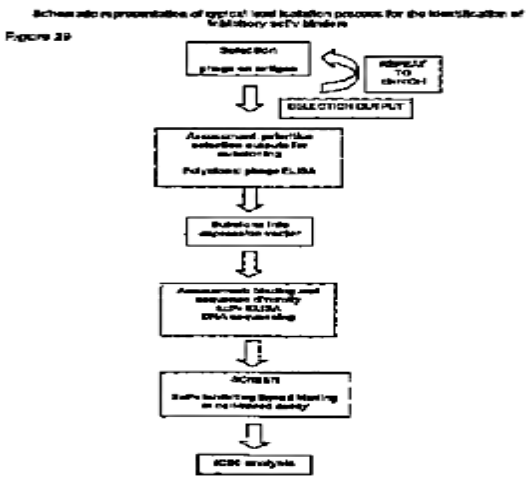
(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｚ	
Ｃ０７Ｋ 14/705	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ 14/705		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100087468
弁理士 村瀬 一美
(72)発明者 ウィア, マルカム ピーター
イギリス国 ハーフォードシャー エイエル７ ３エイエックス, ウェリンガーデンシティー, ブロードウォーターロード, バイオパーク （番地なし）, ヘプテアズ セラピューティクス リミテッド
(72)発明者 マーシャル, フィオナ ハミルトン
イギリス国 ハーフォードシャー エイエル７ ３エイエックス, ウェリンガーデンシティー, ブロードウォーターロード, バイオパーク （番地なし）, ヘプテアズ セラピューティクス リミテッド

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 DA13 DA30 DA36 DA60
4B064 AG20 CA19 CC24 CE09 DA13
4H045 AA10 BA05 BA10 CA40 DA50 EA50 FA74 GA20

专利名称(译)	筛选		
公开(公告)号	JP2011508875A	公开(公告)日	2011-03-17
申请号	JP2010538902	申请日	2008-12-19
申请(专利权)人(译)	Heputeazu治疗有限公司		
[标]发明人	ウィアマルカムピーター マーシャルフィオナハミルトン		
发明人	ウィア, マルカム ピーター マーシャル, フィオナ ハミルトン		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C40B20/04 G01N33/543 C12P21/02 C07K14/705		
CPC分类号	G01N33/74 C07K14/705 C07K14/70571 C07K14/723 G01N33/54366 G01N33/566 G01N2333/726 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/50.ZNA.Z G01N33/53.U G01N33/15.Z C40B20/04 G01N33/543.595 C12P21/02.Z C07K14/705		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA13 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA60 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE09 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/BA05 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20		
优先权	2007024860 2007-12-20 GB		
其他公开文献	JP2011508875A5 JP5763343B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种产生GPCR的构象特异性结合配偶体的方法，a）提供所述亲本GPCR的突变体GPCR，与亲本GPCR相比，在特定构象下具有增加的稳定性，b）提供测试化合物，c）当所述测试化合物包含特定构象时，测量所述测试化合物是否与所述突变GPCR结合;和d）当提供所述特定构象时，分离与所述突变GPCR结合的测试化合物 该方法包括。还公开了与亲本GPCR相比产生具有增加的稳定性的GPCR的方法。