

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年2月2日 (2012.2.2)

【公表番号】特表2011-505800(P2011-505800A)

【公表日】平成23年3月3日 (2011.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2011-009

【出願番号】特願2010-536531(P2010-536531)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/705

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 1 1 1

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月8日 (2011.12.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親 G P C R に対して増大した安定性を有する変異体 G P C R を生産するための方法であって、

( a ) 第一の親 G P C R に対して増大した立体構造安定性を有する第一の親 G P C R の一又は複数の変異体のアミノ酸配列において、一又は複数の変異体が第一の親 G P C R と比較して少なくとも 1 個の異なるアミノ酸残基を有する一又は複数の位置を同定すること、及び

( b ) ( i ) 対応する一又は複数の位置で、第二の G P C R を規定するアミノ酸配列において一又は複数の変異を作製して、第二の親 G P C R と比較して増大した立体構造安定性を有する第二の親 G P C R の一又は複数の変異体を提供すること；( i i ) i が対応する位置である i プラス又はマイナス 5 残基のウィンドウ内において第二の G P C R を定めるアミノ酸配列に一又は複数の変異を作製して、第二の親 G P C R に対して増大した立体構造安定性を有する第二の親 G P C R の一又は複数の変異体を提供すること；又は( i i i ) i が対応する位置であるアミノ酸残基 i の C 原子から 1 2 の距離内、又はその任意の原子から 8 の距離内に第二の G P C R を定めるアミノ酸配列に一又は複数の変異を作

製して、第二の親 G P C R に対して増大した安定性を有する第二の親 G P C R の一又は複数の変異体を提供すること

を含む方法。

【請求項 2】

親 G P C R に対して増大した安定性を有する変異体 G P C R を製造するための方法であって、

(a) 第一の親 G P C R に対して増大した立体構造安定性を有する第一の親 G P C R の一又は複数の変異体を提供すること、

(b) 一又は複数の変異体が第一の親 G P C R と比較して少なくとも 1 個の異なるアミノ酸残基を有する一又は複数の構造モチーフを構造膜タンパク質モデル中で同定すること、及び

(c) 第二の親 G P C R における一又は複数の対応する構造モチーフを定めるアミノ酸配列における一又は複数の変異を作製し、第二の親 G P C R に対して増大した立体構造安定性を有する第二の親 G P C R の一又は複数の変異を提供すること

を含む方法。

【請求項 3】

工程 (a) における第一の親 G P C R の一又は複数の変異体が、

(i) 第一の親 G P C R の一又は複数の変異体を提供すること、

(i i) 親 G P C R が特定の立体構造を備えている際に該親 G P C R に結合するものであるリガンドを選択すること、

(i i i) リガンドの結合に関して特定の立体構造にあるときの前記又は各変異体 G P C R が、そのリガンドの結合に関して同じ特定の立体構造にあるときの親 G P C R の安定性と比較して増大した立体構造安定性を有するか否かを決定すること、及び

(i v) 選択したリガンドの結合に関して、第一の親 G P C R と比較して増大した立体構造安定性を有する変異体を選択すること

を含む方法によって得ることができる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第一の G P C R の一又は複数の変異体の結合親和性が、選択されるリガンドに対する親の結合親和性と実質的に同じかそれより大きい請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (i) - (i v) が一又は複数回繰り返され、工程 (i v) における増大した安定性を有する第一の G P C R の選択された変異体が方法の次の回における親 G P C R を表す請求項3 又は 4に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (i i) において、二以上のリガンドが選択され、それぞれの存在が G P C R を同じ特定の立体構造になるようにさせる請求項3 から 5の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (i v) において、その親と比較して、工程 (i i) で選択したリガンドと異なるクラスのリガンドに結合する能力が低減した変異体 G P C R を選択する請求項3 から 6の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (i v) において選択された変異体 G P C R が G タンパク質に共役できるか、工程 (i v) において選択された変異体 G P C R が、親 G P C R に匹敵する伝播及び / 又は親和性の順番で選択リガンドと同じクラスの複数のリガンドに結合できるかが決定される請求項 3 から 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (a) における第一の親 G P C R の一又は複数の変異体が、

(i) 請求項3 から 8の何れか一項に記載の工程 (i) から (i v) に従って親 G P C R に対して増大した立体構造安定性を有する一又は複数の変異体を選択すること、

(i i) 増大した立体構造安定性について選択された一又は複数の変異体 G P C R 中の

又は複数の変異したアミノ酸残基の一又は複数の位置を同定すること、及び  
 ( i i i ) 同定した位置の一又は複数にアミノ酸置換を含む一又は複数の変異体 G P C R  
 を合成すること  
 を含む方法によって得ることができる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 ( a ) における第一の親 G P C R の一又は複数の変異体が、第一の親 G P C R と比較して複数の変異を含んでいるか、又は工程 ( a ) における第一の親 G P C R の一又は複数の変異体が、熱、界面活性剤、カオトロピック剤及び極端な pH の何れか一又は複数に対して増大した安定性を有している請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第一の親 G P C R の変異体 G P C R が、その対応する親受容体と比較して、図 9 に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けした次の位置： I l e 5 5、G l y 6 7、A r g 6 8、V a l 8 9、M e t 9 0、G l y 9 8、I l e 1 2 9、S e r 1 5 1、V a l 1 6 0、G l n 1 9 4、G l y 1 9 7、L e u 2 2 1、T y r 2 2 7、A r g 2 2 9、V a l 2 3 0、A l a 2 3 4、A l a 2 8 2、A s p 3 2 2、P h e 3 2 7、A l a 3 3 4、及び P h e 3 3 8 の何れか一又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有しているものような変異体 アドレナリン受容体であり、場合によっては該変異体 アドレナリン受容体は、配列を図 9 に記載したシチメンチョウ アドレナリン受容体のものと少なくとも 20 % 同一であるアミノ酸配列を有し；又は第一の親 G P C R の変異体 G P C R は、その対応する親受容体と比較して、図 10 に記載のヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体の番号付けした次の位置： G l y 1 1 4、G l y 1 1 8、L e u 1 6 7、A l a 1 8 4、A r g 1 9 9、A l a 2 0 3、L e u 2 0 8、G l n 2 1 0、S e r 2 1 3、G l u 2 1 9、A r g 2 2 0、S e r 2 2 3、T h r 2 2 4、G l n 2 2 6、L y s 2 2 7、H i s 2 3 0、L e u 2 4 1、P r o 2 6 0、S e r 2 6 3、L e u 2 6 7、L e u 2 7 2、T h r 2 7 9、A s n 2 8 4、G l n 3 1 1、P r o 3 1 3、及び L y s 3 1 5 の何れか一又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有している変異体アデノシン受容体であり、場合によっては変異体アデノシン受容体が、配列を図 10 に記載したヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体のものと少なくとも 20 % 同一であるアミノ酸配列を有し；又は第一の親 G P C R の変異体 G P C R は、その対応する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した次の位置： A l a 6 9、L e u 7 2、A l a 7 3、A l a 8 6、A l a 9 0、S e r 1 0 0、H i s 1 0 3、S e r 1 0 8、L e u 1 0 9、L e u 1 1 1、A s p 1 1 3、I l e 1 1 6、A l a 1 2 0、A s p 1 3 9、P h e 1 4 7、A l a 1 5 5、V a l 1 6 5、G l u 1 6 6、L y s 1 7 6、A l a 1 7 7、T h r 1 7 9、M e t 1 8 1、S e r 1 8 2、A r g 1 8 3、P h e 1 8 9、L e u 2 0 5、T h r 2 0 7、G l y 2 0 9、G l y 2 1 5、V a l 2 2 9、M e t 2 5 0、I l e 2 5 3、L e u 2 5 6、I l e 2 6 0、A s n 2 6 2、V a l 2 6 8、A s n 2 7 0、T h r 2 7 9、M e t 2 9 3、T h r 2 9 4、G l y 3 0 6、L e u 3 0 8、V a l 3 0 9、L e u 3 1 0、V a l 3 1 3、P h e 3 4 2、A s p 3 4 5、T y r 3 4 9、T y r 3 5 1、A l a 3 5 6、P h e 3 5 8、V a l 3 6 0、S e r 3 6 2、A s n 3 7 0、S e r 3 7 3、P h e 3 8 0、A l a 3 8 5、C y s 3 8 6、P r o 3 8 9、G l y 3 9 0、T r p 3 9 1、A r g 3 9 2、H i s 3 9 3、A r g 3 9 5、L y s 3 9 7、及び P r o 3 9 9 の何れか一又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有している変異体ニューロテンシン受容体であり、場合によっては変異体ニューロテンシン受容体が、配列を図 11 に記載したラットニューロテンシン受容体のものと少なくとも 20 % 同一であるアミノ酸配列を有し；又は第一の親 G P C R の変異体 G P C R は、対応する野生型のムスカリン受容体と比較して、図 17 に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けした次の位置： L e u 6 5、M e t 1 4 5、L e u 3 9 9、I l e 3 8 3 及び M e t 3 8 4 の何れか一又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸を有している変異体ムスカリン受容体であり、場合によっては変異体ムスカリン受容体が、配列を図 17 に記載したラットニューロテンシン受容体のものと少なくとも 20 % 同一であるアミノ酸配列を有する請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の

方法。

【請求項 12】

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一つの異なるアミノ酸を有するタンパク質ドメインにわたって、工程 (a) の第一の親 GPCR の変異体と少なくとも 20 % の配列同一性を有する完全な膜タンパク質、GPCR であり、場合によっては第一の親 GPCR と同じ GPCR のクラス又はファミリーである GPCR のような完全な膜タンパク質のモデルであり、又は構造膜タンパク質モデルが、ヒト  $\beta_2$  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 2 から 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】

構造モチーフが、ヘリックス界面、ヘリックスのねじれ、ヘリックスのねじれ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何れかである請求項 2 から 12 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

第二の親 GPCR が第一の親 GPCR であるか、又は第二の親 GPCR が第一の GPCR ではなく、例えば第一の親 GPCR と少なくとも 20 % の配列同一性を有する GPCR、又は第一の親 GPCR と同じ GPCR のクラス又はファミリーの GPCR である請求項 1 から 13 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】

その親 GPCR に対して増大した安定性を有する変異体 GPCR を製造するための方法であって、

(a) 親 GPCR に対して増大した立体構造安定性を有する GPCR の一又は複数の変異体の一の三次元モデルを提供するか一を越える三次元モデルを整列させること、

(b) 一又は複数の変異体が親 GPCR と比較して少なくとも 1 個の異なるアミノ酸残基を一又は複数の変異体が有する一又は複数の位置を一又は複数の変異体のアミノ酸配列中に同定すること、

(c) 一又は複数の変異体が親 GPCR と比較して異なったアミノ酸残基を有する一又は複数の位置におけるアミノ酸残基の C 原子又は任意の原子から設定距離 d 内に、一又は複数の変異体が親 GPCR と比較して少なくとも 1 個の異なるアミノ酸残基を有する任意の整列されたモデルからの他の位置の数を決定すること、及び

(d) (i) 他の位置の数が統計的に有意なクラスターを表すかどうかを決定し、もしそうなら、一又は複数の変異体が親 GPCR と比較して少なくとも 1 個の異なるアミノ酸残基を有する一又は複数の位置のアミノ酸残基の C 原子又は任意の原子から d の距離内に第二の GPCR を定めるアミノ酸配列中に一又は複数の変異を作製して、第二の親 GPCR に対して増大した立体構造安定性を有する第二の親 GPCR の一又は複数の変異体を提供すること；又は (ii) 他の位置の数が統計的に有意なクラスターを表すかどうかを決定し；同定された二以上の統計的に有意なクラスターの中心を決定し、及び二以上の統計的に有意なクラスターの中心に対応する位置から x の距離内に第二の GPCR を定めるアミノ酸配列中に一又は複数の変異を作製して、第二の親 GPCR に対して増大した立体構造安定性を有する第二の親 GPCR の一又は複数の変異体を提供することを含む方法。

【請求項 16】

一又は複数の三次元モデルが請求項 11 に記載の変異体 GPCR の何れか一又は複数のモデルであり、又は少なくとも 2、3、4、5 又は 10 のモデルがアラインされ、又は C I 原子からの設定距離 d が 12 Å 以下であり、又は任意の原子からの設定距離 d が 12 Å 以下であり、又は統計的に有意なクラスターが、95 % レベルで有意である ( $p < 0.05$ ) ものである請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

(I) 第二の親 GPCR が特定の立体構造を備える際に、該第二の親 GPCR に結合す

るものであるリガンドを選択すること、

( I I ) そのリガンドの結合について同じ特定の立体構造を備えている際の第二の親 G P C R の安定性と比較して、第二の親 G P C R の変異体が、特定の立体構造を備える際に選択したリガンドの結合について増大した立体構造安定性を有するか否かを決定すること、及び

( I I I ) 選択したリガンドの結合に関して、第二の親 G P C R と比較して増大した立体構造安定性を有する変異体を選択すること

をさらに含む請求項 1 から 1 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

工程 ( i i i ) 又は ( I I ) における G P C R が備える特定の立体構造が、工程 ( i i ) 又は ( I ) で選択したリガンドのクラスに対応し、場合によっては選択したリガンドがリガンドのアゴニストクラスに由来し、特定の立体構造がアゴニスト立体構造であるか、又は選択したリガンドがリガンドのアンタゴニストクラスに由来し、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 3 又は 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

リガンドが、完全アゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト及びアンタゴニストの何れか一つであり、又はリガンドが、G P C R に結合するポリペプチド、例えば抗体、アンキリン、G タンパク質、R G S タンパク質、アレスチン、G P C R キナーゼ、レセプターチロシンキナーゼ、R A M P、N S F、G P C R、N M D A レセプターサブユニット N R 1 又は N R 2 a、又はカルシオン ( calcyon )、又は G P C R に結合するその断片又は誘導体の何れかである請求項 3 から 1 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

第二の G P C R の一又は複数の変異体の結合親和性が、選択したリガンドについての第二の親 G P C R 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 3 から 1 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 から 2 0 の何れか一項に記載の方法によって生産されるその親 G P C R に対して増大した安定性を有する変異体 G P C R であって、場合によっては該変異体が、熱、界面活性剤、カオトロピック剤及び極端な p H の何れか一に対して増大した安定性を有しており、例えば変異体は増大した熱安定性を有し ( 例えばその親より少なくとも 1 より安定 )、場合によっては、変異体 G P C R がリガンドの存在下においてその親と比較して増大した熱安定性を有している変異体 G P C R。

【請求項 2 2】

変異体 G P C R が、その親受容体と比較して、以下の ( i ) 図 9 に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けした位置 : I l e 5 5、G l y 6 7、A r g 6 8、V a l 8 9、M e t 9 0、G l y 9 8、I l e 1 2 9、S e r 1 5 1、V a l 1 6 0、G l n 1 9 4、G l y 1 9 7、L e u 2 2 1、T y r 2 2 7、A r g 2 2 9、V a l 2 3 0、A l a 2 3 4、A l a 2 8 2、A s p 3 2 2、P h e 3 2 7、A l a 3 3 4、及び P h e 3 3 8、( i i ) 図 1 0 に記載のヒトアデノシン A<sub>2a</sub> 受容体の番号付けした位置 : G l y 1 1 4、G l y 1 1 8、L e u 1 6 7、A l a 1 8 4、A r g 1 9 9、A l a 2 0 3、L e u 2 0 8、G l n 2 1 0、S e r 2 1 3、G l u 2 1 9、A r g 2 2 0、S e r 2 2 3、T h r 2 2 4、G l n 2 2 6、L y s 2 2 7、H i s 2 3 0、L e u 2 4 1、P r o 2 6 0、S e r 2 6 3、L e u 2 6 7、L e u 2 7 2、T h r 2 7 9、A s n 2 8 4、G l n 3 1 1、P r o 3 1 3、及び L y s 3 1 5、( i i i ) 図 1 1 に記載のラットニューロテンシンの番号付けした位置 : A l a 6 9、L e u 7 2、A l a 7 3、A l a 8 6、A l a 9 0、S e r 1 0 0、H i s 1 0 3、S e r 1 0 8、L e u 1 0 9、L e u 1 1 1、A s p 1 1 3、I l e 1 1 6、A l a 1 2 0、A s p 1 3 9、P h e 1 4 7、A l a 1 5 5、V a l 1 6 5、G l u 1 6 6、L y s 1 7 6、A l a 1 7 7、T h r 1 7 9、M e t 1 8 1、S e r 1 8 2、A r g 1 8 3、P h e 1 8 9、L e u 2 0 5、T h r 2 0 7、G l y 2 0 9、G l y 2 1 5、V a l 2 2 9、M e t 2 5 0、I l e 2 5 3、L e u 2 5

6、Ile260、Asn262、Val268、Asn270、Thr279、Met293、Thr294、Gly306、Leu308、Val309、Leu310、Val313、Phe342、Asp345、Tyr349、Tyr351、Ala356、Phe358、Val360、Ser362、Asn370、Ser373、Phe380、Ala385、Cys386、Pro389、Gly390、Trp391、Arg392、His393、Arg395、Lys397、及びPro399、並びに(i v) 図17に記載のムスカリン受容体の番号付けした位置：Leu65、Met145、Leu399、Ile383、及びMet384のいずれか一又は複数と対応する位置に少なくとも1つの異なるアミノ酸を有し；又は変異体GPCRは、変異体 - アドレナリン受容体、例えば対応する野生型アドレナリン受容体と比較したとき、図9に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けした次の位置：Ile55、Gly67、Arg68、Val89、Met90、Gly98、Ile129、Ser151、Val1160、Gln194、Gly197、Leu221、Tyr227、Arg229、Val230、Ala234、Ala282、Asp322、Phe327、Ala334、及びPhe338の何れか一又は複数に対応する位置に異なるアミノ酸残基を有する変異体 - アドレナリン受容体；又は図9に記載のシチメンチョウ - アドレナリン受容体の番号付けした次の位置：Ile55、Gly67、Arg68、Val89、Met90、Gly98、Ile129、Ser151、Val1160、Gln194、Gly197、Leu221、Tyr227、Arg229、Val230、Ala234、Ala282、Asp322、Phe327、Ala334、及びPhe338の何れかに対応する位置で、変異体受容体がその親受容体と比較して異なるアミノ酸を有する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変異体 - アドレナリン受容体であり；又は変異体GPCRは、変異体アデノシン受容体、例えば対応する野生型アデノシン受容体と比較した場合、図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2A</sub>受容体の番号付けした以下の位置：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、及びLys315のいずれかに対応する位置で異なったアミノ酸を有している変異体アデノシン受容体、又は図10に記載のヒトアデノシンA<sub>2A</sub>受容体の番号付けした以下の位置：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、及びLys315のいずれかに対応する位置で、前記変異体受容体がその親受容体と比較して異なるアミノ酸を有する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変異体アデノシン受容体であり；又は変異体GPCRは、変異体ニューロテンシン受容体、例えば対応する野生型ニューロテンシン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した以下の位置：Ala69、Leu72、Ala73、Ala86、Ala90、Ser100、His103、Ser108、Leu109、Leu111、Asp113、Ile116、Ala120、Asp139、Phe147、Ala155、Val165、Glu166、Lys176、Ala177、Thr179、Met181、Ser182、Arg183、Phe189、Leu205、Thr207、Gly209、Gly215、Val229、Met250、Ile253、Leu256、Ile260、Asn262、Val268、Asn270、Thr279、Met293、Thr294、Gly306、Leu308、Val309、Leu310、Val313、Phe342、Asp345、Tyr349、Tyr351、Ala356、Phe358、Val360、Ser362、Asn370、Ser373、Phe380、Ala385、Cys386、Pro389、Gly390、Trp

391、Arg392、His393、Arg395、Lys397、及びPro399のいずれかに対応する位置で異なったアミノ酸を有しているニューロテンシン受容体、又は図11に記載のラットニューロテンシン受容体の番号付けした以下の位置：Ala69、Leu72、Ala73、Ala86、Ala90、Ser100、His103、Ser108、Leu109、Leu111、Asp113、Ile116、Ala120、Asp139、Phe147、Ala155、Val165、Glu166、Lys176、Ala177、Thr179、Met181、Ser182、Arg183、Phe189、Leu205、Thr207、Gly209、Gly215、Val229、Met250、Ile253、Leu256、Ile260、Asn262、Val268、Asn270、Thr279、Met293、Thr294、Gly306、Leu308、Val309、Leu310、Val313、Phe342、Asp345、Tyr349、Tyr351、Ala356、Phe358、Val360、Ser362、Asn370、Ser373、Phe380、Ala385、Cys386、Pro389、Gly390、Trp391、Arg392、His393、Arg395、Lys397、及びPro399のいずれかに対応する位置で、前記変異体受容体がその親受容体と比較して異なるアミノ酸を有する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であり；又は変異体GPCRは、変異体ムスカリン受容体、例えば図17に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けした以下の位置：Leu65、Met145、Leu399、Ile383、及びMet384のいずれかに対応する位置で、対応する野生型ムスカリン受容体と比較して異なるアミノ酸を有するムスカリン受容体、又は図17に記載のヒトムスカリン受容体の番号付けした以下の位置：Leu65、Met145、Leu399、Ile383、及びMet384のいずれかに対応する位置で、前記受容体変異体がその親受容体と比較して異なるアミノ酸を有する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ムスカリン受容体である請求項21に記載の変異体GPCR。

【請求項23】

請求項21又は22に記載の変異体GPCRをコードするポリヌクレオチド。

【請求項24】

請求項23に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項25】

可溶化形態にあるか、又は他のタンパク質を実質的に含まず、場合によっては固体担体に固定化された、請求項21又は22に記載の変異体GPCR。

【請求項26】

請求項21、22及び25の何れか一項に記載の変異体GPCRの、結晶化のための、又は創薬における（例えばリガンド結合スクリーニング又はアッセイ開発における）、又はバイオセンサーとしての使用。