

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 532**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 14/72** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2011 PCT/EP2011/062288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO2012007594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11732498 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2593791**

54 Título: **Dominios de unión a proteína que estabilizan estados conformacionales funcionales de GPCR y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**06.09.2010 GB 201014715**

**16.07.2010 US 399781 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.05.2017**

73 Titular/es:

**VIB VZW (33.3%)**

**Rijvisschestraat 120**

**9052 Ghent, BE;**

**VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (33.3%) y**

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND**

**STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**STEYAERT, JAN;**

**PARDON, ELS;**

**LAEREMANS, TOON;**

**KOBILKA, BRIAN;**

**FUNG, JUAN y**

**RASMUSSEN, SØREN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 613 532 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dominios de unión a proteína que estabilizan estados conformacionales funcionales de GPCR y usos de los mismos

## Descripción

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la señalización y biología estructural del GPCR. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de compuestos que se pueden unir a un estado conformacional activo de un GPCR usando nanocuerpos dirigidos frente a o que se pueden unir específicamente a un estado conformacional activo de un receptor acoplado a proteína G (GPCR), más específicamente, nanocuerpos que pueden incrementar la estabilidad de un GPCR en su estado conformacional activo. También se pueden usar  
10 los nanocuerpos descritos en el presente documento como una herramienta para la caracterización estructural y funcional de los receptores acoplados a proteína G unidos a diversos ligandos naturales y sintéticos, así como para el cribado y esfuerzos para el descubrimiento de fármacos que seleccionan como diana los GPCR.

## ANTECEDENTES

15 Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son la familia más grande de proteínas de membrana en el genoma humano. Desempeñan papeles esenciales en las respuestas fisiológicas con respecto a un conjunto diverso de ligandos, tales como aminas biógenas, aminoácidos, péptidos, proteínas, prostanoïdes, fosfolípidos, ácidos grasos, nucleósidos, nucleótidos, iones  $Ca^{2+}$ , odorantes, estimulantes del gusto amargos y dulces, feromonas y protones (Heilker et al. 2009). Los GPCR son dianas terapéuticas para un amplio intervalo de enfermedades. Los GPCR están  
20 caracterizados por siete dominios transmembranarios con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular y también se denominan siete receptores heptahelicoidales o transmembranarios (Rosenbaum et al. 2009). La rodopsina, un GPCR que es altamente especializado para la detección eficaz de la luz, ha sido el paradigma para la biología estructural y señalización del GPCR debido a su estabilidad bioquímica y abundancia natural en la retina bovina (Hofmann et al. 2009). Por el contrario, muchos GPCR presentan un comportamiento funcional complejo modulando la actividad de múltiples isoformas de la proteína G, así como vías de señalización  
25 independientes de la proteína G (por ejemplo,  $\beta$ -arrestina). En algunos casos, un GPCR puede presentar actividad basal hacia una vía de señalización específica, incluso en ausencia de un ligando. Los ligandos ortostéricos que actúan sobre un GPCR pueden tener un espectro de efectos sobre las vías de señalización en dirección 3'. Los agonistas completos activan al máximo el receptor. Los agonistas parciales desencadenan una estimulación submáxima, incluso en concentraciones de saturación. Los agonistas inversos inhiben la actividad basal, mientras que los antagonistas neutros no tienen ningún efecto sobre la actividad basal, pero bloquean competitivamente la  
30 unión de otros ligandos.

El comportamiento complejo de los GPCR para hormonas y neurotransmisores se puede atribuir a su plasticidad estructural (Kobilka and Deupi, 2007). Las pruebas de los estudios funcionales y biofísicos muestran que los GPCR  
35 pueden existir en múltiples estados conformacionales funcionalmente distintos (Kobilka and Deupi, 2007). Mientras que esta plasticidad estructural y comportamiento dinámico es esencial para la función normal, contribuye a su inestabilidad bioquímica y dificultad en obtener estructuras cristalinas de alta resolución. Hasta la fecha, se ha informado de estructuras cristalinas para el  $\beta_2$ AR humana (Rasmussen et al. 2007; Rosenbaum et al. 2007; Cherezov et al. 2007; Hanson et al. 2008), el  $\beta_1$ AR aviar (Warne et al. 2008) y el receptor de adenosina A2 humano (Jaakola et al. 2008). Mientras que se puede cristalizar rodopsina a partir de proteína no modificada aislada a partir  
40 de tejido natural, estos otros GPCR requieren la expresión en sistemas recombinantes, la estabilización de un estado inactivo por un agonista inverso y modificaciones bioquímicas para estabilizar la proteína de receptor. La primera estructura cristalina del  $\beta_2$ AR se estabilizó por un Fab selectivo (Rasmussen et al. 2007). Se obtuvieron estructuras posteriores del  $\beta_2$ AR y el receptor de adenosina A2 con ayuda de la ingeniería de proteínas: la inserción del lisozima T4 en el tercer bucle intracelular como se describe originalmente para el  $\beta_2$ AR (Rosenbaum et al. 2007).  
45 Finalmente, se hicieron crecer los cristales del  $\beta_1$ AR aviar a partir de proteínas genotecnológicas con truncamientos en el extremo carboxílico y amínico y deleción del tercer bucle intracelular, así como 6 sustituciones aminoacídicas que potenciaron la termoestabilidad de la proteína purificada (Warne et al. 2008).

La obtención de las estructuras de un estado activo de un GPCR es más difícil porque este estado es relativamente inestable. Los estudios de vida media de fluorescencia muestran que el  $\beta_2$ AR es estructuralmente heterogéneo en  
50 presencia de concentraciones de saturación de un agonista completo (Ghanouni et al. 2001). Esta heterogeneidad estructural es incompatible con la formación de cristales. La estabilización del estado activo del  $\beta_2$ AR requiere la presencia de su proteína G análoga Gs, la proteína estimulante de la adenilato-ciclasa (Yao et al. 2009). Hasta la fecha, la única estructura del estado activo del GPCR es la de opsina, la forma libre del ligando de rodopsina (Park et al. 2008). Estos cristales se hicieron crecer a pH ácido (5,5) donde la opsina ha demostrado ser estructuralmente  
55 similar a rodopsina activada por luz (metarodopsina II) a pH fisiológico mediante espectroscopia FTIR. Mientras que el  $\beta_2$ AR también presenta actividad basal más alta a pH reducido, es bioquímicamente inestable (Ghanouni et al. 2000).

La solicitud internacional WO 2004/092199 A2 y la solicitud de EE. UU. US 2007/077597 divulga péptidos derivados de los aminoácidos en el extremo carboxílico de una proteína G natural o análogos de péptidos de alta afinidad derivados de la misma, péptidos que se pueden unir específicamente a los GPCR en el sitio donde se une la proteína G. Estas solicitudes divulgan adicionalmente un ensayo de unión competitiva para identificar compuestos que compiten con los péptidos para su unión al GPCR.

Sin embargo, este ensayo no permite identificar compuestos que se unen específicamente a una conformación activa del GPCR. La solicitud internacional WO 2004/035614 divulga péptidos que se unen específicamente a una subunidad G $\alpha$  de una proteína G y su uso en ensayos de cribado. Sin embargo, estos péptidos no se unen directamente a un GPCR. La solicitud internacional WO 02/086507 describe un ensayo de cribado para compuestos que modulan la actividad de las proteínas de membrana, tales como los GPCR.

El ensayo de cribado se basa en la medición de un cambio conformacional en una región conformacionalmente sensible de la proteína de membrana usando una proteína detectable y no usando un agente de estabilización que mantiene la proteína de membrana en una conformación activa. La solicitud internacional WO 2009/081136 y la solicitud GB 2 447 786 se refieren a los GPCR mutados que han incrementado la estabilidad térmica en una conformación particular en relación con el GPCR no mutado y a su uso para la identificación de ligandos específicos de conformación. La solicitud internacional WO 2010/043650 describe nanocuerpos frente a los GPCR y usos terapéuticos de los mismos, pero no menciona su uso para estabilizar los GPCR en una conformación activa. La solicitud internacional WO 2006/086883 divulga biosensores basados en BRET que se pueden usar para supervisar el estado de activación de los GPCR o para identificar ligandos en un ensayo basado en BRET.

Desentrañar las estructuras de diferentes estados conformacionales funcionales de los GPCR en complejo con diversos ligandos naturales y sintéticos y proteínas es valioso tanto para comprender los mecanismos de transducción de señales por los GPCR, así como para los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos basados en la estructura. Por lo tanto, se necesita el desarrollo de nuevas herramientas sencillas para el análisis estructural de alta resolución de conformeros individuales de los GPCR.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención engloba un procedimiento de identificación de compuestos que se pueden unir a un estado conformacional activo de un GPCR, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar un GPCR y un nanocuerpo que se pueda unir específicamente a un estado conformacional activo de dicho GPCR, en el que dicho nanocuerpo puede estabilizar y/o inducir un estado conformacional activo del GPCR tras la unión, y
- (ii) proporcionar un compuesto de prueba o una colección de compuestos de prueba, y
- (iii) evaluar si el compuesto de prueba se une al estado conformacional activo del GPCR, y
- (iv) seleccionar un compuesto que se una al estado conformacional activo del GPCR.

Preferentemente, el procedimiento descrito anteriormente para identificar compuestos comprende adicionalmente la etapa de formar un complejo que comprende el nanocuerpo y el GPCR en un estado conformacional activo de acuerdo con la invención. Dicho complejo puede comprender adicionalmente un ligando de receptor, que se puede elegir del grupo que comprende una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un andamiaje de proteína, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono o un anticuerpo o cualquier fragmento adecuado de los mismos. Preferentemente, dicho ligando de receptor es un agonista completo, o un agonista parcial, o un agonista inverso, o un antagonista. Preferentemente, se proporcionan dicho nanocuerpo y/o dicho complejo en forma esencialmente purificada. De forma alternativa, se proporcionan dicho nanocuerpo y/o dicho complejo en una forma solubilizada. De forma alternativa, se inmoviliza dicho nanocuerpo y/o dicho complejo en un soporte sólido. De forma alternativa, se proporciona dicho nanocuerpo y/o dicho complejo en una composición celular.

En modos de realización del procedimiento, el nanocuerpo se puede unir específicamente a un GPCR unido a un agonista y/o potencia la afinidad del GPCR por un agonista. En modos de realización del procedimiento, el nanocuerpo puede incrementar la termoestabilidad de un estado conformacional activo de un GPCR tras la unión. En modos de realización del procedimiento, el nanocuerpo se puede unir específicamente a un epítipo conformacional del estado conformacional activo de un GPCR, en particular, un epítipo intracelular. En modos de realización adicionales del procedimiento, el epítipo conformacional está comprendido en un sitio de unión para una proteína de señalización en dirección 3', en particular, un sitio de unión a proteína G. En modos de realización del procedimiento, el GPCR es una proteína de mamífero, o una proteína vegetal, o una proteína de levadura, o una proteína vírica, o una proteína de insecto, en particular, una proteína humana.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el compuesto de prueba usado en el procedimiento descrito anteriormente para identificar compuestos se selecciona del grupo que comprende un polipéptido, un péptido, una molécula pequeña, un producto natural, un peptidomimético, un ácido nucleico, un lípido, lipopéptido, un hidrato de carbono, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, tal como Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv

- monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o bien VH, un anticuerpo de cadena pesada (hCAb), un anticuerpo de dominio único (sdAb), un minicuerpo, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH o nanocuerpo), el dominio variable de los receptores de antígeno nuevos derivado de anticuerpos de tiburón (VNAR), un andamiaje de proteína que incluye un alfacuerpo, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knottinas, dominios CH2 genotecnológicos (nanoanticuerpos). Preferentemente, dichos compuestos de prueba están marcados. Adicionalmente, se puede usar una colección de compuestos de prueba. Adicionalmente, el procedimiento descrito anteriormente para identificar compuestos puede ser un procedimiento de cribado de alto rendimiento.
- Otras aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos y polipéptidos descritos en el presente documento serán evidentes para el experto en la técnica a partir de la divulgación adicional en el presente documento.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### FIGURA 1. Los nanocuerpos específicos para $\beta_2$ AR se unen y estabilizan un estado activo del receptor.

- (a) Traza representativa de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para Nb80. Se incubó  $\beta_2$ AR purificado (20  $\mu$ M), unido a un  $\beta_2$ AR-agonista con y sin Nb80 40  $\mu$ M (negros y azules, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis mediante FPLC. En presencia de Nb80, el pico de elución de  $\beta_2$ AR-agonista se incrementa en absorbancia en UV (280 nm) y se eluye a un volumen anterior que el  $\beta_2$ AR-agonista solo, con una disminución simultánea en el pico de elución de Nb80 (verde), lo que sugiere la formación del complejo  $\beta_2$ AR-agonista-Nb80. La incubación de  $\beta_2$ AR (20  $\mu$ M) unido a un agonista inverso con Nb80 (rojo) dio como resultado un cambio más pequeño y un incremento más pequeño de la absorbancia en UV en comparación con el complejo  $\beta_2$ AR-agonista-Nb80.
- (b) Experimentos de unión por competición de respuesta a la dosis sobre membranas de células de insecto Sf9 que expresaban  $\beta_2$ AR. Se incubaron individualmente siete nanocuerpos que se unían a  $\beta_2$ AR mediante SEC durante 90 min a temperatura ambiente con membranas que expresaban  $\beta_2$ AR. Todos los siete nanocuerpos incrementaron la afinidad del  $\beta_2$ AR por (-)-isoproterenol (tabla 3). Se seleccionó Nb80 (azul) como el nanocuerpo principal. Los datos representan la media  $\pm$  EE de dos experimentos independientes realizados por triplicado.
- (c) Un ensayo funcional basado en fluorescencia que usa un receptor purificado marcado con monobromobimano (mBBr) muestra que Nb80 1  $\mu$ M (azul) estabiliza un estado más activo del  $\beta_2$ AR (unido al agonista completo (-)-isoproterenol) en comparación con el receptor en ausencia de Nb80 (negro). El estado activo está caracterizado por una desactivación de la fluorescencia por mBBr y un cambio hacia el rojo en la fluorescencia por mBBr (Yao *et al.*, 2009).

### FIGURA 2. Inmunotransferencias por puntos representativas que muestran especificidad de los nanocuerpos con respecto a la estructura terciaria del $\beta_2$ AR.

- (a) Se descubrieron por triplicado cantidades iguales de  $\beta_2$ AR purificado desnaturalizado con SDS o natural unido a un agonista (parte superior y parte media, respectivamente) o  $\beta_2$ AR natural unido a un agonista inverso (parte inferior) sobre tiras de nitrocelulosa. Las tiras se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5 % en PBS (pH 7,4) con Tween-20 al 0,05 % y luego se incubaron con 1 mg/ml de los nanocuerpos indicados diluidos en tampón de bloqueo. Se detectó la unión de los nanocuerpos mediante un anticuerpo murino primario anti-histidina ( $\alpha$ -6His), seguido de incubación con anticuerpo secundario marcado con IR-800 antimurino de cabra. El anticuerpo M1, que reconoce el epítipo FLAG lineal, se marcó con Alexa-688 y detectó directamente  $\beta_2$ AR. Se exploraron las inmunotransferencias por puntos y se representaron en imágenes usando el Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences). Se procesaron las inmunotransferencias que detectaban nanocuerpos por separado de inmunotransferencias que detectaban  $\beta_2$ AR mediante M1, puesto que se usaron dos canales diferentes (800 nm frente a 700 nm, respectivamente) para la formación de imágenes; por lo tanto, las inmunotransferencias no se pueden comparar y cuantificar directamente (es decir, la comparación de la unión de nanocuerpos frente a la unión de M1 únicamente son de carácter cualitativo).
- (b) Inmunotransferencias por puntos representativas que muestran nanocuerpos con unión reducida a  $\beta_2$ AR plegado de manera natural.

### FIGURA 3. Unión selectiva de nanocuerpos al estado activo del receptor

- Se incubó  $\beta_2$ AR purificado (20  $\mu$ M) unido a un agonista con y sin nanocuerpos 40  $\mu$ M (negros y azules, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño. También se analizaron muestras de  $\beta_2$ AR (20  $\mu$ M) unido a un agonista inverso en presencia de nanocuerpos (rojo). En presencia de varios nanocuerpos (Nb72, Nb65, Nb71, Nb69, Nb67 y Nb84), el pico de elución de  $\beta_2$ AR-agonista se incrementa en absorbancia en UV (280 nm) y se eluye a un volumen anterior (línea negra) que el  $\beta_2$ AR-agonista solo (azul), con una disminución simultánea en el pico de elución de Nb80 (verde), lo

que sugiere la formación del complejo  $\beta_2$ AR-agonista-Nb80. No se observa la formación de un complejo  $\beta_2$ AR-agonista inverso-Nb80 (línea roja).

#### FIGURA 4. Unión selectiva de nanocuerpos al estado activo del receptor

5 Se incubó  $\beta_2$ AR purificado (20  $\mu$ M) unido a un agonista con y sin nanocuerpos 40  $\mu$ M (negros y azules, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

#### FIGURA 5. Espectros de emisión de fluorescencia que muestran cambios conformacionales inducidos por nanocuerpos de $\beta_2$ AR marcado con monobromobimano

10 Los nanocuerpos que incrementan la afinidad de unión por el agonista para  $\beta_2$ AR estabilizan un estado activo del receptor. Un ensayo funcional basado en fluorescencia que usa un receptor purificado marcado con monobromobimano (mBB) muestra que 1  $\mu$ M de los nanocuerpos 65, 67, 69, 71, 72 y 84 (rojo) estabilizan un estado más activo del  $\beta_2$ AR (unido al agonista completo isoproterenol) en comparación con el receptor en ausencia de nanocuerpos (negro). Este estado activo está caracterizado por una desactivación de la fluorescencia por mBB y un cambio hacia el rojo en la fluorescencia por mBB (Yao *et al.*, 2009).

#### 15 FIGURA 6. Efecto de Nb80 sobre la función y estructura de $\beta_2$ AR

(a) El diagrama ilustra el movimiento de la sonda de bimano sensible al entorno unida a Cys265<sup>6,27</sup> en el extremo citoplásmico de TM6 de un entorno más oculto hidrófobo a una posición más polar expuesta al disolvente durante la activación del receptor que da como resultado una disminución en la fluorescencia observada en la figura 6b-c.

20 (b)-(c) Espectros de emisión de fluorescencia que muestran los cambios conformacionales inducidos por ligandos de  $\beta_2$ AR marcado con monobromobimano reconstituido en partículas de lipoproteína de alta densidad (mBB- $\beta_2$ AR/HDL) en ausencia (línea continua negra) o presencia de agonista completo isoproterenol (ISO, línea discontinua ancha verde), agonista inverso ICI-118,551 (ICI, línea discontinua negra), heterotrímero G<sub>s</sub> (línea continua roja), nanocuerpo-80 (Nb80, líneas continuas azules) y combinaciones de G<sub>s</sub> con ISO (línea discontinua ancha roja), Nb80 con ISO (línea discontinua ancha azul) y Nb80 con ICI (línea discontinua azul).

25 (d)-(f) Curvas de unión al ligando para ISO que compite frente a [<sup>3</sup>H]-dihidroalprenolol ([<sup>3</sup>H]-DHA) para d,  $\beta_2$ AR/HDL reconstituido con heterotrímero G<sub>s</sub> en ausencia o presencia de GTP $\gamma$ S, e,  $\beta_2$ AR/HDL en ausencia y presencia de Nb80 y f,  $\beta_2$ AR-T4L/HDL en ausencia y presencia de Nb80. Las barras de error representan los errores estándar.

#### 30 FIGURA 7. Empaquetamiento del complejo agonista- $\beta_2$ AR-T4L-Nb80 en los cristales formados en fase cúbica lipídica.

Tres vistas diferentes de la estructura de  $\beta_2$ AR indicado en naranja, Nb80 en azul y el agonista en verde. No se pudo modelar lisozima T4 (T4L) debido a la mala densidad de electrones. Su posición probable se indica mediante el círculo azul claro con líneas discontinuas negras conectadas a los extremos intracelulares de TM5 y TM6 donde se fusiona en la construcción  $\beta_2$ AR-T4L. Se usó PyMOL (<http://www.pymol.org>) para la preparación de todas las cifras

#### 35 FIGURA 8. Comparación de las estructuras cristalinas estabilizadas con agonista inverso y agonista-Nb80 del $\beta_2$ AR.

La estructura de  $\beta_2$ AR-T4L ( $\beta_2$ AR-CZ) unido al agonista inverso carazolol se muestra en azul con el carazolol en amarillo. La estructura de  $\beta_2$ AR-T4L ( $\beta_2$ AR-Nb80) estabilizado con Nb80 y unido al agonista se muestra en naranja con el agonista en verde. Estas dos estructuras se alinearon usando la función de alineación de PyMol. (a) Vista lateral de las estructuras superpuestas que muestra cambios estructurales significativos en la proteína G e intracelular que se orientan hacia parte de los receptores. (b) Vista lateral tras 90 grados de rotación en el eje vertical. (c) Comparación de los dominios de unión al ligando extracelulares que muestra cambios estructurales modestos.

#### 45 FIGURA 9. Dominio intracelular estabilizado con Nb80 en comparación con las estructuras de opsina y $\beta_2$ AR inactivas.

(a) Vista lateral de  $\beta_2$ AR (naranja) con las CDR de Nb80 en azul claro (CDR1) y azul (CDR3) que interactúan con el receptor. (b) Vista más cercana que enfoca a las CDR 1 y 3 que entran en el  $\beta_2$ AR. Se muestran las cadenas laterales en TM3, 5, 6 y 7 en 4 Å de las CDR. La CDR3 más grande penetra 13 Å en el receptor. (c) Interacción de CDR1 y CDR3 vista desde el lado intracelular. (d) El  $\beta_2$ ART4L ( $\beta_2$ AR-Nb80) estabilizado con Nb80 y unido al agonista se superpone con la estructura inactiva unida a carazolol de  $\beta_2$ AR-T4L ( $\beta_2$ AR-Cz). La interacción de bloqueo iónico entre Asp3.49 y Arg3.50 del motivo DRY en TM3 se rompe en la estructura de  $\beta_2$ AR-Nb80. El extremo intracelular de TM6 se mueve hacia afuera y lejos del núcleo del receptor. La flecha indica un cambio de 11,4 Å de distancia entre el carbono  $\alpha$  de Glu6.30 en las estructuras de  $\beta_2$ AR-Cz y  $\beta_2$ AR-

Nb80. Los extremos intracelulares de TM3 y TM7 se mueven hacia el núcleo en 4 y 2,5 Å respectivamente, mientras que TM5 se mueve hacia afuera en 6 Å. (e) La estructura  $\beta_2$ AR-Nb80 superpuesta con la estructura de opsina cristalizada con el péptido terminal del extremo C de Gt (transducina).

5 **FIGURA 10. Dominio intracelular estabilizado con Nb80 de  $\beta_2$ AR en comparación con las estructuras de opsina.**

(a) Interacciones entre el  $\beta_2$ AR y Nb80. (B) Interacciones entre opsina y el péptido del extremo carboxílico de la transducina.

**FIGURA 11. Reordenamiento de las interacciones de empaquetamiento de segmentos transmembranarios tras la unión al agonista**

10 (a) Se observan interacciones de empaquetamiento que estabilizan el estado inactivo entre Pro211 en TM5, Ile121 en TM3, Phe282 en TM6 y Asn316 en TM5. (b) El movimiento hacia dentro de TM5 tras la unión al agonista altera el interrumpe el empaquetamiento de Ile121 y Pro211 dando como resultado un reordenamiento de las interacciones entre Ile121 y Phe282. Estos cambios contribuyen a una rotación y movimiento hacia afuera de TM6 y un movimiento hacia dentro de TM7.

15 **FIGURA 12. Secuencias de aminoácidos de los diferentes nanocuerpos producidos frente a  $\beta_2$ AR.** Las secuencias se han alineado usando herramientas de programas informáticos estándar, las CDR se han definido de acuerdo con la numeración IMGT (Lefranc *et al.*, 2003).

20 **FIGURA 13. Efecto de Nb80 sobre la estabilidad térmica del receptor  $\beta_2$ AR.** La comparación de las curvas de fusión de  $\beta_2$ AR unido a agonista (isoproterenol) solubilizado en detergente (DDM) en presencia y ausencia de Nb80. La temperatura de fusión aparente para  $\beta_2$ AR sin Nb80 es de 12,0 °C. La temperatura de fusión aparente para  $\beta_2$ AR con Nb80 es 24 °C.

**FIGURA 14. Efecto de Nb80 sobre la agregación inducida por la temperatura del receptor  $\beta_2$ AR.**

25 A. Se calentó  $\beta_2$ AR solubilizado en detergente (DDM) durante 10 minutos a 50 °C en presencia de Nb80 o isoproterenol y se analizó la agregación del receptor mediante SEC. B. Dependencia de la temperatura del receptor unido a isoproterenol en ausencia de Nb80.

**FIGURA 15. Nb80 tiene poco efecto sobre la unión de  $\beta_2$ AR al agonista inverso ICI-118.551**

30 Se reconstituyó  $\beta_2$ AR o  $\beta_2$ AR-T4L en partículas de HDL y se realizaron experimentos de unión por competición al agonista en ausencia o presencia de Nb80. Curvas de unión al ligando para el agonista inverso ICI-118551 que compite frente a [<sup>3</sup>H]-dihidroalprenolol ([<sup>3</sup>H]-DHA) para a,  $\beta_2$ AR/HDL en ausencia y presencia de Nb80, y b,  $\beta_2$ AR-T4L/HDL en ausencia y presencia de Nb80.

**FIGURA 16. Nb80 incrementa la afinidad del  $\beta_2$ AR por los agonistas, pero no por los antagonistas.**

35 Se realizaron experimentos de unión al ligando competitiva sobre membranas derivadas de células de insecto comerciales que contenían  $\beta_2$ AR de longitud completa en ausencia o presencia de Nb80. Curvas de desplazamiento de radio-ligando dependientes de la dosis en presencia de Nb80 y un nanocuerpo irrelevante (Irr Nb) para dos agonistas representativos (isoproterenol, procaterol) y dos antagonistas representativos (ICI-118.551 y carvedilol).

**FIGURA 17: Alineación de secuencias de  $\beta_1$ AR humano y  $\beta_2$ AR humano.**

Aminoácidos del adrenoreceptor  $\beta_2$  que interactúan con Nb80 en la interfaz  $\beta_2$ AR-Nb80 están subrayados.

**FIGURA 18: Nb80 se une selectivamente a la conformación activa del receptor  $\beta_1$ AR humano**

40 Curvas de unión al ligando para agonistas y agonistas inversos que compiten frente a [<sup>3</sup>H]-dihidroalprenolol ([<sup>3</sup>H]-DHA). A) Agonista isoproterenol (ISO) que se une a  $\beta_2$ AR en presencia y ausencia de Nb80. B) Agonista inverso ICI-118.551 (ICI) que se une a  $\beta_2$ AR en presencia y ausencia de Nb80. C) Agonista isoproterenol (ISO) que se une a  $\beta_1$ AR en presencia y ausencia de Nb80. D) Agonista inverso CGP20712A (CPG) que se une a  $\beta_1$ AR en presencia y ausencia de Nb80.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

### 45 DEFINICIONES

La presente invención se describirá con respecto a modos de realización particulares y con referencia a determinados dibujos pero la invención no está limitada a los mismos, sino únicamente por las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no se debe interpretar como limitante del alcance. Los dibujos descritos son únicamente esquemáticos y no limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos se puede exagerar y no dibujar a escala con propósitos ilustrativos. Si se usa el término "que comprende" en la

presente descripción y reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Si se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un nombre en singular, por ejemplo, "un" o "una", "el", este incluye un plural de ese nombre a menos que se indique específicamente otra cosa. Además, se usan los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Se ha de entender que los términos usados de este modo son intercambiables en circunstancias apropiadas y que los modos de realización de la invención descrita en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en el presente documento.

A menos que se defina de otro modo, las frases y términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de biología molecular y celular, genética e hibridación y química de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los procedimientos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan por toda la presente memoria a menos que se indique de otro modo. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992 y suplementos hasta 2002).

El término "dominio de unión a proteína" se refiere generalmente a cualquier molécula no natural o parte de la misma que se puede unir a una proteína o péptido usando interacciones intermoleculares específicas. Una variedad de moléculas pueden funcionar como dominios de unión a proteína, incluyendo, pero no limitadas a, moléculas proteicas (proteína, péptido, similar a proteína o que contiene proteína), moléculas de ácido nucleico (ácido nucleico, similar a ácido nucleico, que contiene ácido nucleico) y moléculas de hidrato de carbono (hidrato de carbono, similar a hidrato de carbono, que contiene hidrato de carbono). Se puede encontrar adicionalmente una descripción más detallada en la memoria descriptiva. Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido", "proteína", "péptido" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos derivatizados o modificados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen cadenas principales de péptidos modificados.

Como se usa en el presente documento, los términos "complejo multiproteico" o "complejo proteico" o simplemente "complejo" se refieren a un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Las proteínas en un complejo proteico están enlazadas mediante interacciones proteína-proteína no covalentes. La "estructura cuaternaria" es la disposición estructural de las proteínas plegadas asociadas en el complejo proteico. Un "complejo multimérico" se refiere a un complejo proteico como se define en el presente documento que puede comprender adicionalmente una molécula no proteica.

Como se usa en el presente documento, se usan indistintamente los términos "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido", "ácido polinucleico", "ácido nucleico" y hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribocimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, regiones de control, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular.

Como se usa en el presente documento, el término "ligando" o "ligando de receptor" significa una molécula que se une específicamente a un GPCR, intracelular o bien extracelularmente. Sin el propósito de ser limitativo, un ligando puede ser una proteína, un (poli)péptido, un lípido, una molécula pequeña, un andamiaje de proteína, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un nanocuerpo (todos como se define en el presente documento). Un ligando puede ser sintético o natural. Un ligando también incluye un "ligando natural", que es un ligando que es un ligando endógeno natural para un GPCR natural. A "modulador" es un ligando que incrementa o disminuye la actividad de señalización de un GPCR (es decir, por medio de una respuesta intracelular) cuando están en contacto, por ejemplo, se une a un GPCR que se expresa en una célula. Este término incluye agonistas, agonistas completos, agonistas parciales, agonistas inversos y antagonistas, de los cuales se puede encontrar una descripción más detallada en la memoria descriptiva.

El término "conformación" o "estado conformacional" de una proteína se refiere generalmente al intervalo de estructuras que puede adoptar una proteína en cualquier instante en el tiempo. Un experto en la técnica reconocerá que los determinantes de la conformación o estado conformacional incluyen la estructura primaria de una proteína como se refleja en una secuencia de aminoácidos de una proteína (incluyendo aminoácidos modificados) y el entorno circundante de la proteína. La conformación o estado conformacional de una proteína también hace referencia a rasgos estructurales, tales como estructuras secundarias de las proteínas (por ejemplo, hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$ , entre otras), estructura terciaria (por ejemplo, el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica) y estructura cuaternaria (por ejemplo, interacciones de una cadena polipeptídica con otras subunidades de proteínas).

Las modificaciones postraduccionales y otras con respecto a una cadena polipeptídica, tales como unión al ligando, fosforilación, sulfatación, glucosilación o uniones de grupos hidrófobos, entre otras, pueden influir en la conformación de una proteína. Además, los factores ambientales, tales como el pH, concentración salina, fuerza iónica y osmolalidad de la solución circundante e interacción con otras proteínas y cofactores, entre otros, pueden afectar la conformación de la proteína. El estado conformacional de una proteína se puede determinar mediante ensayo funcional por actividad o unión a otra molécula o bien por medio de procedimientos físicos, tales como cristalografía de rayos X, RMN o marcaje de espín, entre otros procedimientos. Para un análisis general de la conformación de la proteína y estados conformacionales, consúltese Cantor and Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*. W.H. Freeman and Company, 1980, and Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, 1993. Un "estado conformacional específico" es cualquier subconjunto del intervalo de conformaciones o estados conformacionales que puede adoptar una proteína.

Una "conformación funcional" o un "estado conformacional funcional", como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que las proteínas poseen diferentes estados conformacionales que tienen un intervalo dinámico de actividad, en particular, que varían desde ninguna actividad a una actividad máxima. Debe quedar claro que "un estado conformacional funcional" pretende cubrir cualquier estado conformacional de un GPCR, que tiene cualquier actividad, incluyendo ninguna actividad; y no pretende cubrir los estados desnaturalizados de proteínas.

Como se usa en el presente documento, los términos "región determinante de la complementariedad" o "CDR" en el contexto de los anticuerpos se refieren a regiones variables de las cadenas H (pesadas) o bien L (ligeras) (también abreviadas como VH y VL, respectivamente) y contiene las secuencias de aminoácidos que se pueden unir específicamente a dianas antigénicas. Estas regiones CDR explican la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante antigénica particular. Dichas regiones también se denominan "regiones hipervariables". Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos en las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha encontrado que las localizaciones posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticas en las regiones variables de la cadena pesada y ligera tienen localizaciones similares en las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas variables pesada y ligera de todos los anticuerpos canónicos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua con las demás (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligera (L) y pesada (H) respectivas. En particular, los nanocuerpos comprenden generalmente una única cadena de aminoácidos que se puede considerar que comprende 4 "regiones o secuencias estructurales" o FR y 3 "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Los nanocuerpos tienen 3 regiones CDR, cada una no contigua con las demás (denominadas CDR1, CDR2, CDR3). La delimitación de las secuencias de CDR y FR se basa en el sistema de numeración única IMGT para dominios V y dominios similares a V (Lefranc *et al.* 2003).

Un "epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítipo puede comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial, que es única para el epítipo. Generalmente un epítipo consiste en al menos 4, 5, 6, 7 de dichos aminoácidos, y más normalmente, consiste en al menos 8, 9, 10 de dichos aminoácidos. Los procedimientos de determinación de la conformación espacial de los aminoácidos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones.

Un "epítipo conformacional", como se usa en el presente documento, se refiere a un epítipo que comprende aminoácidos en una conformación espacial que es única para una conformación plegada en 3 dimensiones del polipéptido. Generalmente, un epítipo conformacional consiste en aminoácidos que son discontinuos en la secuencia lineal que se juntan en la estructura plegada de la proteína. Sin embargo, un epítipo conformacional también puede consistir en una secuencia lineal de aminoácidos que adopta una conformación que es única para una conformación plegada en 3 dimensiones del polipéptido (y no presente en un estado desnaturalizado). En complejos multiproteicos, los epítipos conformacionales consisten en aminoácidos que son discontinuos en las secuencias lineales de uno o más polipéptidos que juntan tras el plegamiento de los diferentes polipéptidos plegados y su asociación en una estructura cuaternaria única. De manera similar, los epítipos conformacionales también pueden consistir aquí en una secuencia lineal de aminoácidos de uno o más polipéptidos que se juntan y adoptan una conformación que es única para la estructura cuaternaria.

El término "especificidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un dominio de unión a proteína, en particular, una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, de unirse preferentemente a un antígeno, frente a un antígeno diferente, y no necesariamente implica alta afinidad. El término "afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere al grado en que un dominio de unión a proteína, en particular, una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, se une a un antígeno a fin de desplazar el equilibrio del dominio de unión a proteína y antígeno hacia la presencia de un complejo formado por su unión. De esta manera, por ejemplo, si se combinan un antígeno y anticuerpo (fragmento) en concentración relativamente igual, un anticuerpo (fragmento) de alta afinidad se unirá al antígeno disponible para desplazar el equilibrio hacia una alta concentración del complejo resultante. Se usa comúnmente la constante de disociación para describir la afinidad entre el dominio de unión a proteína y la diana antigénica. Típicamente, la constante de disociación es más baja que  $10^{-5}$  M. Preferentemente, la constante de disociación es más baja que  $10^{-6}$  M, más preferentemente, más baja que  $10^{-7}$  M. Más preferentemente, la constante de disociación es más baja que  $10^{-8}$  M.

Los términos "se une específicamente" y "unión específica", como se usan en el presente documento, se refieren generalmente a la capacidad de un dominio de unión a proteína, en particular, una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, de unirse preferentemente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes antígenos. En determinados modos de realización, una interacción de unión específica discriminará entre antígenos deseables e indeseables en una muestra, en algunos modos de realización más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10.000 veces). En el contexto del espectro de estados conformacionales de los GPCR, los términos se refieren particularmente a la capacidad de un dominio de unión a proteína (como se define en el presente documento) de reconocer preferentemente y/o unirse a un estado conformacional particular de un GPCR en comparación con otro estado conformacional. Por ejemplo, un dominio de unión a proteína selectivo de estado activo se unirá preferentemente a un GPCR en un estado conformacional activo y no se unirá o en un menor grado a un GPCR en un estado conformacional inactivo, y, de esta manera, tendrá una afinidad más alta por dicho estado conformacional activo. Los términos "se une específicamente", "se une selectivamente", "se une preferentemente" y los equivalentes gramaticales de los mismos se usan indistintamente en el presente documento. Los términos "específicos conformacionales" o "selectivos conformacionales" también se usan indistintamente en el presente documento.

Un "antígeno", como se usa en el presente documento, significa una molécula que puede desencadenar una respuesta inmunitaria en un animal. En el contexto del espectro de estados conformacionales de los GPCR, dicha molécula comprende un epítipo conformacional de un GPCR en un estado conformacional particular que no se forma o es menos accesible en otro estado conformacional de dicho GPCR.

Una "delección" se define aquí como un cambio en una secuencia de nucleótidos o bien aminoácidos en la que uno o más residuos de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, están ausentes en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico o polipéptido original. En el contexto de una proteína, una delección puede implicar la delección de aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o un fragmento de la misma puede contener más de una delección. En el contexto de un GPCR, una delección también puede ser una delección de bucle, o una delección terminal del extremo C y/o N.

Una "inserción" o "adición" es ese cambio en secuencias de nucleótidos o aminoácidos que ha dado como resultado la adición de uno o más residuos de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de una proteína original. "Inserción" se refiere generalmente a la adición de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, mientras que "adición" puede ser una inserción o hacer referencia a residuos de aminoácidos añadidos en un extremo N o C o ambos extremos. En el contexto de una proteína o un fragmento de la misma, una inserción o adición es normalmente de aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o fragmento de la misma puede contener más de una inserción.

Una "sustitución", como se usa en el presente documento, resulta del reemplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de una proteína original o un fragmento de la misma. Se entiende que una proteína o un fragmento de la misma puede tener sustituciones de aminoácidos conservadoras que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la actividad de la proteína. Por sustituciones conservativas se entiende combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu, met; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; cys, met; y phe, tyr, trp.

"Cristal" o "estructura cristalina", como se usa en el presente documento, se refiere a un material sólido, cuyos iones, moléculas o átomos constituyentes están dispuestos en un patrón de repetición de manera ordenada que se extiende en las tres dimensiones espaciales. El proceso de formación de una estructura cristalina a partir de un fluido o a partir de materiales disueltos en el fluido a menudo se denomina "cristalización" o "cristalogénesis". Los cristales de proteína casi siempre se hacen crecer en solución. El enfoque más común es disminuir gradualmente la solubilidad de sus moléculas componentes. El crecimiento de los cristales en solución está caracterizado por dos etapas: nucleación de un cristalito microscópico (que tiene posiblemente 100 moléculas únicamente), seguido del crecimiento de ese cristalito, idealmente hasta un cristal de calidad de difracción.

La "cristalografía de rayos X", como se usa en el presente documento, es un procedimiento de determinación de la disposición de los átomos en un cristal, en el que un haz de rayos X choca contra un cristal y se difracta en muchas direcciones específicas. A partir de los ángulos e intensidades de estos haces difractados, un cristalógrafo puede producir una imagen tridimensional de la densidad de electrones en el cristal. A partir de esta densidad de electrones, se pueden determinar las posiciones medias de los átomos en el cristal, así como sus enlaces químicos, su desordenación y otra información.

El término "coordenadas atómicas", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de coordenadas tridimensionales para los átomos en una estructura molecular. En un modo de realización, las coordenadas atómicas se obtienen usando cristalografía de rayos X de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica de la biofísica. Descrito brevemente, se pueden obtener los patrones de difracción de

rayos X mediante difracción de rayos X de un cristal. Se usan los datos de difracción para calcular un mapa de densidad de electrones de la celda unitaria que comprende el cristal; se usan dichos mapas para establecer las posiciones de los átomos (es decir, las coordenadas atómicas) en la celda unitaria. Los expertos en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas de estructura determinadas por cristalografía de rayos X contiene errores estándar. En otros modos de realización, se pueden obtener las coordenadas atómicas usando otros procedimientos de determinación de la estructura biofísicos experimentales que pueden incluir procedimientos de difracción de electrones (también conocida como cristalografía de electrones) y resonancia magnética nuclear (RMN). Aún en otros modos de realización, se pueden obtener las coordenadas atómicas usando herramientas de modelado molecular que se pueden basar en uno o más de algoritmos de plegamiento de proteínas desde el principio, minimización de la energía y el modelado basado en homología. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en las técnicas biofísicas y bioinformáticas.

La "resolución de la estructura" como se usa en el presente documento se refiere a determinar la disposición de los átomos o las coordenadas atómicas de una proteína, y a menudo se hace mediante un procedimiento biofísico, tal como cristalografía de rayos X. El término "compuesto" o "compuesto de prueba" o "compuesto candidato" o "compuesto candidato a fármaco" como se usa en el presente documento describe cualquier molécula, natural o bien sintética que se somete a prueba en un ensayo, tal como un ensayo de cribado o ensayo de descubrimiento de fármacos. Como tales, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos. Los compuestos incluyen análogos de hormonas, lípidos o polinucleótidos que están caracterizados por bajos pesos moleculares. Otros compuestos de prueba orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos pequeños o moléculas similares a péptido (peptidomiméticos) que comprenden desde aproximadamente 2 a aproximadamente 40 aminoácidos y polipéptidos más grandes que comprenden desde aproximadamente 40 a aproximadamente 500 aminoácidos, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o conjugados de anticuerpos. Los compuestos de prueba también pueden ser andamiajes de proteína. Para propósitos de alto rendimiento, se pueden usar colecciones de compuestos de prueba, tales como colecciones combinatorias o aleatorias que proporcionan un intervalo suficiente de diversidad. Los ejemplos incluyen, pero están limitados a, colecciones de compuestos naturales, colecciones de compuestos alostéricos, colecciones de péptidos, colecciones de fragmentos de anticuerpos, colecciones de compuestos sintéticos, colecciones basadas en fragmentos, colecciones de expresión en fago y similares. Se puede encontrar adicionalmente una descripción más detallada en la memoria descriptiva.

Como se usa en el presente documento, los términos "determinar", "medir", "evaluar", "supervisar" y "someter a ensayo" se usan indistintamente e incluyen tanto determinaciones cuantitativas como cualitativas.

El término "biológicamente activo", con respecto a un GPCR, se refiere a un GPCR que tiene una función bioquímica (por ejemplo, una función de unión, una función de transducción de señales o una capacidad de cambio de conformación como resultado de la unión al ligando) de un GPCR natural.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significan la cantidad necesaria para lograr el resultado o resultados deseados.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, se puede administrar el material a un individuo junto con el compuesto sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perniciosa con cualquiera de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La información estructural de los GPCR proporcionará información sobre los cambios estructurales, funcionales y bioquímicos implicados en la transferencia de señales desde el receptor a las proteínas que interactúan intracelularmente (proteínas G,  $\beta$ -arrestinas, etc.) y delimitará las formas de interferir en estas interacciones farmacológicamente pertinentes. Por lo tanto, los esfuerzos para obtener y cristalizar los GPCR son de gran importancia. Sin embargo, esta es una misión particularmente difícil debido a los desafíos bioquímicos en el trabajo con los GPCR y la inestabilidad inherente de estos complejos en soluciones de detergente. Además, la flexibilidad conformacional intrínseca de los GPCR complica el análisis estructural de alta resolución de los GPCR solos porque hacer crecer los cristales de calidad de difracción requiere proteínas conformacionalmente homogéneas estables (Kobilka *et al.* 2007). La presente solicitud proporciona nuevas herramientas experimentales y analíticas para capturar o "congelar" estados de conformación funcionales de un GPCR de interés, en particular, su estado conformacional activo, lo que permite el análisis estructural y funcional del GPCR, incluyendo el análisis estructural de alta resolución y muchas aplicaciones derivadas del mismo.

En el presente documento se divulga un dominio de unión a proteína que se puede unir específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR.

El dominio de unión a proteína puede ser cualquier molécula no natural o parte de la misma (como se define anteriormente en el presente documento) que se pueda unir específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR diana. Preferentemente, los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento son andamiajes de proteína. El término "andamiaje de proteína" se refiere generalmente a las unidades de

plegamiento que forman estructuras, particularmente estructuras de péptidos o proteínas, que comprenden estructuras para la unión de otra molécula, por ejemplo, una proteína (véase, por ejemplo, Skerra, J. 2000, para revisión). Un dominio de unión a proteína puede derivar de una molécula natural, por ejemplo, de componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo o se puede diseñar artificialmente por completo. Un dominio de unión a proteína se puede basar en inmunoglobulina o se puede basar en dominios presentes en proteínas, incluyendo pero no limitadas a proteínas microbianas, inhibidores de la proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas con superhélice antiparalela monocatenaria o proteínas con motivos de repetición. Los ejemplos de dominios de unión a proteína que se son conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a: anticuerpos, anticuerpos de cadena pesada (hcAb), anticuerpos de dominio único (sdAb), minicuerpos, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH o nanocuerpos), el dominio variable de los receptores de antígeno nuevos derivado de anticuerpos de tiburón (VNAR), alfacuerpos, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knottinas, dominios CH2 genotecnológicos (nanoanticuerpos), péptidos y proteínas, lipopéptidos (por ejemplo, pepducinas), ADN y ARN (véase, por ejemplo, Gebauer & Skerra, 2009; Skerra, 2000; Starovasnik *et al.*, 1997; Binz *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 1998; Dimitrov, 2009; Nygren *et al.* 2008; documento WO2010066740). Con frecuencia, cuando se genera un tipo particular de dominio de unión a proteína usando procedimientos de selección, se usan colecciones combinatorias que comprenden una secuencia consenso o estructural que contiene residuos de interacción potencial aleatoria para cribar para determinar la unión a una molécula de interés, tal como una proteína.

Los receptores acoplados a proteína G o "GPCR", como se usa en el presente documento, son polipéptidos que comparten un motivo estructural común, que tienen siete regiones de entre 22 a 24 aminoácidos hidrófobos que forman siete hélices alfa, cada una de las cuales cruza la membrana. Cada cruzamiento se identifica mediante un número, es decir, transmembrana-1 (TM1), transmembrana-2 (TM2), etc. Las hélices transmembranarias están unidas por regiones de aminoácidos entre la transmembrana-2 y la transmembrana-3, la transmembrana-4 y la transmembrana-5, y la transmembrana-6 y la transmembrana-7 en el exterior, o lado "extracelular", de la membrana celular, denominadas regiones "extracelulares" 1, 2 y 3 (EC1, EC2 y EC3), respectivamente. Las hélices transmembranarias también se unen mediante regiones de aminoácidos entre la transmembrana-1 y la transmembrana-2, la transmembrana-3 y la transmembrana-4 y la transmembrana-5 y la transmembrana-6 en el interior, o lado "intracelular", de la membrana celular, denominadas regiones "intracelulares" 1, 2 y 3 (IC1, IC2 e IC3), respectivamente. El extremo "carboxi" ("C") del receptor se encuentra en el espacio intracelular en la célula y el extremo "amino" ("N") del receptor se encuentra en el espacio extracelular fuera de la célula. Cualquiera de estas regiones es fácilmente identificable mediante análisis de la secuencia de aminoácidos primaria de un GPCR.

La clasificación y estructura del GPCR es generalmente bien conocida en la técnica y se puede encontrar un análisis adicional de los GPCR en Probst *et al.* 1992; Marchese *et al.* 1994; Lagerström & Schiöth, 2008; Rosenbaum *et al.* 2009; y los siguientes libros: Jurgen Wess (Ed) Structure-Function Analysis of G Protein-Coupled Receptors publicado por Wiley-Liss (1.º edición; 15 de octubre de 1999); Kevin R. Lynch (Ed) Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors publicado por John Wiley & Sons (marzo de 1998) y Tatsuya Haga (Ed), G Protein-Coupled Receptors, publicado por CRC Press (21 de septiembre de 1999); y Steve Watson (Ed) G-Protein Linked Receptor Factsbook, publicado por Academic Press (1.º edición; 1994).

Los GPCR se pueden agrupar basándose en la homología de secuencia en varias familias distintas. Aunque todos los GPCR tienen una arquitectura similar de siete hélices alfa que cruzan la membrana, las diferentes familias en esta clase de receptor no muestran homología de secuencia entre sí, sugiriendo de esta manera que la similitud de su estructura de dominio transmembranario podría definir los requisitos funcionales comunes. Fue posible una visión integral del repertorio de GPCR cuando estuvo disponible el primer borrador del genoma humano. Fredriksson y sus compañeros dividieron 802 GPCR humanos en familias basándose en criterios filogenéticos. Esto demostró que la mayoría de los GPCR humanos se pueden encontrar en cinco familias principales, denominado glutamato, rodopsina, adhesión, Frizzled/Taste2 y secretina (Fredriksson *et al.*, 2003).

El dominio de unión a proteína descrito en el presente documento se dirige preferentemente frente a o se puede unir específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, en el que dicho GPCR se elige del grupo que comprende un GPCR de la familia del glutamato de los GPCR, un GPCR de la familia de la rodopsina de los GPCR, un GPCR de la familia de la adhesión de los GPCR, un GPCR de la familia de Frizzled/Taste2 de los GPCR y un GPCR de la familia de la secretina de los GPCR. Preferentemente, el GPCR es una proteína de mamífero, o una proteína vegetal, o una proteína microbiana, o una proteína vírica, o una proteína de insecto. Incluso más preferentemente, el GPCR es una proteína humana.

Los miembros de la familia de la rodopsina (correspondiente a la clase A (Kolakowski, 1994) o clase 1 (Foord *et al.* (2005) en sistemas de clasificación más antiguos) tienen únicamente pequeños bucles extracelulares y la interacción de los ligandos se produce con residuos en la hendidura transmembranaria. Esto es con mucho el grupo más grande (>90 % de los GPCR) y contiene receptores para odorantes, moléculas pequeñas, tales como catecolaminas y aminor (neuro)péptidos y hormonas de glucoproteína. La rodopsina, un representante de esta familia, es el primer GPCR para el que se ha resuelto la estructura (Palczewski *et al.*, 2000).  $\beta_2$ AR, el primer receptor que interacciona con un ligando difusible para el que se ha resuelto la estructura (Rosenbaum *et al.*, 2007) también pertenece a esta familia. Basándose en el análisis filogenético, los GPCR de clase B o los receptores de clase 2 (Foord *et al.*, 2005) se han subdividido recientemente en dos familias: adhesión y secretina (Fredriksson *et al.*, 2003). Los receptores de

adhesión y secretina están caracterizados por un dominio extracelular en el extremo amínico relativamente largo implicado en la unión al ligando. Se sabe poco acerca de la orientación de los dominios transmembranarios, pero probablemente sea bastante diferente de los de rodopsina. Los ligandos para estos GPCR son hormonas, tales como glucagón, secretina, hormona liberadora de gonadotropinas y hormona paratiroidea. Los receptores de la familia del glutamato (receptores de clase C o clase 3) también tienen un dominio extracelular grande, que funciona como una "venus atrapamoscas", puesto que se puede abrir y cerrar con el agonista unido dentro. Los miembros de la familia son los receptores de glutamato metabotrópicos, sensores de  $Ca^{2+}$  y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)-B.

Los GPCR incluyen, sin limitación, receptores olfativos de serotonina, receptores de hormonas de glucoproteína, receptores de quimiocinas, receptores de adenosina, receptores de aminas biógenas, receptores de melanocortinas, receptores de neuropéptidos, receptores quimiotácticos, receptores de somatostatina, receptores opioides, receptores de melatonina, receptores de calcitonina, receptores de PTH/PTHrP, receptores de glucagón, receptores de secretina, receptores de latrotoxina, receptores de glutamato metabotrópicos, receptores de calcio, receptores GABA-B, receptores de feromonas, los receptores activados por proteasas, las rodopsinas y otros receptores de siete segmentos transmembranarios acoplados a proteína G. Los GPCR también incluyen estos receptores GPCR asociados entre sí como dímeros homoméricos o heteroméricos o como oligómeros de orden superior. Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que los codifican) de los GPCR están fácilmente disponibles, por ejemplo, por referencia a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

El GPCR se puede elegir del grupo que comprende los receptores adrenérgicos, preferentemente los receptores adrenérgicos  $\alpha$ , tales como los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , y los receptores adrenérgicos  $\beta$ , tales como los receptores adrenérgicos  $\beta_1$ , los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y los receptores adrenérgicos  $\beta_3$ ; o del grupo que comprende los receptores muscarínicos, preferentemente los receptores muscarínicos  $M_1$ , los receptores muscarínicos  $M_2$ , los receptores muscarínicos  $M_3$ , los receptores muscarínicos  $M_4$  y los receptores muscarínicos  $M_5$ ; o del grupo de los receptores de angiotensina, preferentemente el receptor de angiotensina II tipo 1, el receptor de angiotensina II tipo 2 y otros receptores de angiotensina II atípicos; todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

Un GPCR, como se usa en el presente documento, puede ser cualquier polipéptido natural o no natural (es decir, alterado por el hombre). El término "natural", en referencia a un GPCR significa un GPCR que se produce naturalmente (por ejemplo, y sin limitación, por un mamífero, más específicamente por un humano, o por un virus, o por una planta, o por un insecto, entre otros). Dichos GPCR se encuentran en la naturaleza. El término "no natural" en referencia a un GPCR significa un GPCR que no es natural. Los GPCR naturales que se han hecho constitutivamente activos a través de mutación y variantes de GPCR naturales son ejemplos de GPCR no naturales. El GPCR no natural puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a, al menos un 90 % idéntica a, al menos un 95 % idéntica a o al menos un 99 % idéntica a un GPCR natural. Tomando el receptor adrenérgico  $\beta_2$  como un ejemplo particular no limitante de un GPCR dentro del alcance de la presente invención, debe quedar claro a partir de lo anterior que además del receptor adrenérgico  $\beta_2$  humano (por ejemplo, la secuencia descrita por el número de acceso de GenBank NP\_000015), también se puede emplear el receptor adrenérgico  $\beta_2$  murino (por ejemplo, como se describe por el n.º de acceso de GenBank NM 007420) u otro receptor adrenérgico  $\beta_2$  de mamífero. Además, se pretende que el término englobe variantes polimórficas naturales y determinadas otras variantes activas del receptor adrenérgico  $\beta_2$  de una especie particular. Por ejemplo, un "receptor adrenérgico  $\beta_2$  humano" tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica al (por ejemplo, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a) "adrenoreceptor  $\beta_2$  humano" natural de número de acceso a Genbank NP\_000015. Adicionalmente, se apreciará que la presente invención también contempla GPCR con una delección de bucle, o una delección terminal del extremo C y/o N, o una sustitución, o una inserción o adición en relación con su secuencia de nucleótidos o aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos (como se define anteriormente en el presente documento, y véase también la sección de ejemplos). Se espera adicionalmente que los dominios de unión a proteína descritos en el presente documento se puedan unir generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos naturales o sintéticos de dicho GPCR.

Se pueden usar diversos procedimientos para determinar la unión específica entre el dominio de unión a proteína y un GPCR diana, incluyendo, por ejemplo, ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, expresión en fago y similares, que son práctica común en la técnica, por ejemplo, como se analiza en Sambrook *et al.* (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Se apreciará que para este propósito a menudo se usa un marcador o marca única, tal como un marcador de péptido, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente, o una marca de radiofrecuencia, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Debe quedar claro que los GPCR son proteínas de membrana conformacionalmente complejas que presentan un comportamiento funcional de espectro en respuesta a ligandos naturales y sintéticos. Definir la vía desde la unión al agonista hasta la activación de la proteína requiere una combinación de estructuras cristalinas de diferentes estados conformacionales del receptor en investigación en complejo con diversos ligandos naturales o sintéticos (incluyendo las estructuras de los estados unidos a agonista activos y complejos GPCR-proteína G), que proporcionará instantáneas junto con la vía de activación.

De esta manera, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento puede estabilizar preferentemente, o de otro modo, incrementar la estabilidad de un estado conformacional funcional particular de un GPCR. Preferentemente, el dominio de unión a proteína puede inducir la formación de un estado conformacional funcional en un GPCR tras unirse a dicho GPCR. Dicho estado de conformación funcional de dicho GPCR puede ser un estado conformacional basal, o un estado conformacional activo o un estado conformacional inactivo. Preferentemente, el dominio de unión a proteína puede estabilizar un GPCR en su estado conformacional activo y/o puede forzar el GPCR para adoptar su estado conformacional activo tras la unión.

La expresión "inducir" o "forzar" o "bloquear" o "atrapar" o "fijar" o "congelar" con respecto a un estado conformacional funcional de un GPCR (como se define en el presente documento), como se usa en el presente documento, se refiere a la retención o sujeción de un GPCR en un subconjunto de posibles conformaciones que de otro modo podría asumir, debido a los efectos de la interacción del GPCR con el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento. Por consiguiente, una proteína que se "atrapa conformacionalmente" o "fija conformacionalmente" o "bloquea conformacionalmente" o "congela conformacionalmente", como se usa en el presente documento, es una que se sujeta en un subconjunto de las posibles conformaciones que de otro modo podría asumir, debido a los efectos de la interacción del GPCR con el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento. En este contexto, un dominio de unión a proteína que se une específica o selectivamente a una conformación específica o estado conformacional de una proteína se refiere a un dominio de unión a proteína que se une con una afinidad más alta a una proteína en un subconjunto de conformaciones o estados conformacionales que a otras conformaciones o estados conformacionales que la proteína puede asumir. Un experto en la técnica reconocerá que los dominios de unión a proteína que se unen específica o selectivamente a una conformación específica o estado conformacional de una proteína estabilizarán esta conformación específica o estado conformacional.

El término "un estado conformacional funcional", como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que las proteínas, en particular las proteínas de membrana, tales como los GPCR, poseen muchos estados conformacionales diferentes que tienen un intervalo dinámico de actividad, en particular que varía desde ninguna actividad a una actividad máxima (revisado en Kobilka y Deupi, 2007). Debe quedar claro que "un estado conformacional funcional" no pretende cubrir los estados desnaturalizados de las proteínas. La versatilidad funcional de los GPCR se acopla inherentemente a la flexibilidad de estas proteínas que dan como resultado dicho espectro de conformaciones. El paisaje de energía conformacional está acoplado intrínsecamente a dichos factores, tales como la presencia de ligandos unidos (moléculas efectoras, agonistas, antagonistas, agonistas inversos...), el entorno lipídico o la unión de proteínas de interacción. Por ejemplo, se puede definir un "estado conformacional basal" como un estado de baja energía del receptor en ausencia de un ligando (como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, moléculas efectoras, agonistas, antagonistas, agonistas inversos). La probabilidad de que una proteína se someta a una transición a otro estado conformacional es una función de la diferencia de energía entre los dos estados y la altura de la barrera energética entre los dos estados. En el caso de una proteína de receptor, tal como un GPCR, se puede usar la energía de la unión al ligando para alterar la barrera energética entre los dos estados o bien para cambiar los niveles de energía relativos entre los dos estados, o ambos. El cambio de la barrera energética tendría un efecto sobre la tasa de transición entre los dos estados, mientras que el cambio de los niveles de energía tendría un efecto sobre la distribución del equilibrio de los receptores en dos estados. La unión de un agonista o agonista parcial reduciría la barrera energética y/o reduciría la energía del estado conformacional más activo en relación con el estado conformacional inactivo. Un agonista inverso incrementaría la barrera energética y/o reduciría la energía de la "conformación del estado inactivo" en relación con la "conformación activa". El acoplamiento del receptor a su proteína G podría alterar adicionalmente el paisaje de energía. Las actividades de las proteínas integrales de membrana, incluyendo los GPCR, también se ven afectadas por las estructuras de las moléculas de lípidos que las rodean en la membrana. Las proteínas de membrana no son entidades rígidas y se deforman para asegurar una buena adaptación hidrófoba a la bicapa lipídica circundante. Un parámetro importante es el espesor hidrófobo de la bicapa lipídica, definido por las longitudes de las cadenas de acilo graso de lípidos. Además, es probable que sea importante la estructura de la región de grupo de cabeza lipídico en la definición de las estructuras de las partes de una proteína de membrana que se localicen en la región de grupo de cabeza de lipídico. Entre otros lípidos, la palmitoilación y la unión de colesterol a los GPCR también pueden desempeñar un papel estructural en dentro de los receptores monoméricos y contribuir a la formación/estabilización de los oligómeros de receptor (Lee 2004; Chini y Parenti 2009).

Los "ligandos de receptor", o simplemente "ligandos", tal como se define anteriormente en el presente documento, pueden ser ligandos "ortostéricos" (tanto naturales como sintéticos), lo que significa que se unen al sitio activo del receptor y se clasifican adicionalmente de acuerdo con su eficacia o, en otras palabras, el efecto que tienen sobre la señalización del receptor a través de una vía específica. Como se usa en el presente documento, un "agonista" hace referencia a un ligando que, al unirse a un receptor, incrementa la actividad de señalización del receptor. Los agonistas completos pueden estimular al receptor al máximo; los agonistas parciales no pueden desencadenar actividad completa incluso en concentraciones de saturación. Los agonistas parciales también pueden funcionar como "bloqueadores" previniendo la unión de agonistas más robustos. Un "antagonista" hace referencia a un ligando que se une a un receptor sin estimular ninguna actividad. Un "antagonista" también se conoce como un "bloqueador" debido a su capacidad de prevenir la unión de otros ligandos y, por lo tanto, bloquear la actividad inducida por un

agonista. Adicionalmente, un "agonista inverso" hace referencia a un antagonista que, además de bloquear los efectos agonistas, reduce la actividad basal o constitutiva del receptor por debajo de la del receptor sin ligando.

La vista canónica de cómo los GPCR regulan la fisiología celular es que la unión de ligandos (por ejemplo, hormonas, neurotransmisores o estímulos sensoriales) estabiliza un estado conformacional activo del receptor, permitiendo así la interacción con las proteínas G heterotriméricas. Además de interactuar con las proteínas G, los GPCR unidos a un agonista se asocian con las cinasas de GPCR (GRK), que dan lugar a la fosforilación del receptor. Un resultado común de la fosforilación del GPCR mediante las GRK es una disminución de las interacciones del GPCR con las proteínas G y un incremento en las interacciones del GPCR con arrestinas, que adicionalmente impiden estéricamente la señalización de la proteína G, lo que resulta en la desensibilización del receptor. Como las arrestinas  $\beta$  apagan las señales de la proteína G, pueden iniciar simultáneamente un segundo conjunto paralelo de cascadas de señales, tales como la vía MAPK. Los GPCR también asocian con diversas proteínas fuera de las familias de las proteínas de interacción con GPCR generales (proteínas G, GRK, arrestinas y otros receptores). Estos compañeros selectivos de GPCR pueden mediar en la señalización del GPCR, organizar la señalización del GPCR a través de las proteínas G, dirigir el tráfico del GPCR, anclar los GPCR en áreas subcelulares particulares y/o influir en la farmacología del GPCR (Ritter y Hall 2009). En este sentido, los ligandos como se usa en el presente documento también pueden ser "ligandos sesgados" con la capacidad de estimular selectivamente un subconjunto de actividades de señalización de un receptor, por ejemplo, la activación selectiva de la función de arrestina  $\beta$  o proteína G. Dichos ligandos son conocidos como "ligandos sesgados", "agonistas sesgados" o "agonistas funcionalmente selectivos". Más particularmente, el ligando sesgado puede ser un sesgo imperfecto caracterizado por una estimulación del ligando de múltiples actividades del receptor con diferentes eficacias relativas de diferentes señales (selectividad no absoluta) o puede ser un sesgo perfecto caracterizado por una estimulación del ligando de una actividad del receptor sin ninguna estimulación de otra actividad del receptor conocida.

Las actividades de señalización de los GPCR (y, de esta manera, su comportamiento conformacional) también pueden verse afectadas por la unión de otra clase de ligandos conocidos como reguladores alostéricos. Los "reguladores alostéricos" o de otro modo "moduladores alostéricos", "ligandos alostéricos" o "moléculas efectoras" se unen en un sitio alostérico de un GPCR (es decir, un sitio regulador físicamente distinto del sitio activo de la proteína). A diferencia de los ligandos ortostéricos, los moduladores alostéricos son no competitivos debido a que se unen a receptores en un sitio diferente y modifican la función del receptor incluso si el ligando endógeno también se une. Debido a esto, los moduladores alostéricos no están limitados a simplemente apagar o encender un receptor, la forma en la que lo están mayoría de los fármacos. En su lugar, actúan más como un interruptor de dímeros, que ofrece el control sobre la intensidad de la activación o desactivación, mientras que permite que el cuerpo retenga su control natural sobre la iniciación de la activación del receptor. Los reguladores alostéricos que potencian la actividad de la proteína se denominan en el presente documento "activadores alostéricos" o "moduladores alostéricos positivos", mientras que los que disminuyen la actividad de la proteína se denominan en el presente documento "inhibidores alostéricos" o de otro modo "moduladores alostéricos negativos".

Preferentemente, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento se puede unir específicamente a un GPCR unido a un agonista y/o potenciar la afinidad de un GPCR por un agonista. Es preferente que el dominio de unión a proteína pueda incrementar la afinidad por el agonista en al menos dos veces, en al menos cinco veces, y más preferentemente en al menos diez veces tras la unión al receptor medida por una disminución en la  $CE_{50}$ ,  $CI_{50}$ ,  $K_d$  o cualquier otra medida de la afinidad o potencia conocida por un experto en la técnica.

Se apreciará que, al tener una estabilidad incrementada con respecto a la estructura y/o una actividad biológica particular de un GPCR, también puede ser una guía para la estabilidad de otros desnaturizantes o condiciones de desnaturación, incluyendo calor, un detergente, un agente caotrópico y un pH extremo. Por consiguiente, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento puede incrementar adicionalmente la estabilidad de un estado conformacional funcional de un GPCR en condiciones no fisiológicas inducidas por dilución, concentración, composición del tampón, calentamiento, refrigeración, congelación, detergente, agente caotrópico, pH. A diferencia de las proteínas solubles en agua, los estudios termodinámicos de la estabilidad y plegamiento de las proteínas de membrana han demostrado ser extremadamente difíciles y complicados por la dificultad de encontrar condiciones para el plegamiento reversible. El desplegamiento de las proteínas de membrana helicoidales inducido por la mayoría de los procedimientos, tales como los enfoques térmicos y químicos, es irreversible tal como fue revisado por Stanley y Fleming (2008). El término "termoestabilizar", "termoestabilizante", "incrementar la termoestabilidad de", como se usa en el presente documento, se refiere, por lo tanto, a las propiedades termodinámicas en lugar de funcionales de un GPCR y a la resistencia de la proteína con respecto a la desnaturación irreversible inducida por los enfoques térmicos y/o químicos, incluyendo, pero no limitados, calentamiento, refrigeración, congelación, desnaturizantes químicos, pH, detergentes, sales, aditivos, proteasas o temperatura. La desnaturación irreversible da lugar al desplegamiento irreversible de las conformaciones funcionales de la proteína, pérdida de actividad biológica y agregación de la proteína desnaturizada. El término "(termo)estabilizar", "incrementar la (termo)estabilidad de", como se usa en el presente documento, se aplica a los GPCR incluidos en partículas lipídicas o capas lipídicas (por ejemplo, monocapas lipídicas, bicapas lipídicas y similares) y a los GPCR que se han solubilizado en detergente.

Preferentemente, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento puede incrementar la termoestabilidad de un estado conformacional funcional de un GPCR, preferentemente, un estado conformacional activo de un GPCR. En relación con una estabilidad incrementada al calor, esto se puede determinar fácilmente midiendo la unión al ligando o usando procedimientos espectroscópicos, tales como fluorescencia, DC o dispersión de la luz que son sensibles al desplegamiento a temperaturas en incremento (véase también la sección de ejemplos). Es preferente que el dominio de unión a proteína pueda incrementar la estabilidad medida por un incremento en la estabilidad térmica de un GPCR en un estado conformacional funcional con al menos 2 °C, al menos 5 °C, al menos 8 °C y más preferentemente al menos 10 °C o 15 °C o 20 °C. También preferentemente el dominio de unión a proteína puede incrementar la estabilidad térmica de una conformación funcional de un GPCR en el complejo con un ligando, tal como, pero no restringido a un agonista, un agonista inverso, un antagonista y/o un modulador o un inhibidor del GPCR o la vía de señalización dependiente del GPCR. También preferentemente, el dominio de unión a proteína puede incrementar la estabilidad en presencia de un detergente o un caotrópico de un estado conformacional funcional de un GPCR. Preferentemente, el dominio de unión a proteína puede incrementar la estabilidad con respecto a la desnaturalización inducida por enfoques térmicos o químicos del estado conformacional activo de un GPCR. En relación con una estabilidad incrementada al calor, un detergente o a un caotrópico, se incubaba típicamente el GPCR durante un tiempo definido, en presencia de un detergente de prueba o un agente caotrópico de prueba y la estabilidad se determina usando, por ejemplo, unión al ligando o un procedimiento espectroscópico, opcionalmente a temperaturas en incremento como se analiza anteriormente. Todavía preferentemente, el dominio de unión a proteína puede incrementar la estabilidad con respecto a un pH extremo de un estado conformacional funcional de un GPCR. Preferentemente, el dominio de unión a proteína puede incrementar la estabilidad con respecto a un pH extremo el estado conformacional activo de un GPCR. En relación con un extremo de pH, se elige un pH de prueba típico, por ejemplo, en el intervalo de 6 a 8, el intervalo de 5,5 a 8,5, el intervalo de 5 a 9, el intervalo de 4,5 a 9,5, más específicamente en el intervalo de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el intervalo de 8,5 a 9,5 (pH alto).

Los dominios de unión a proteína descritos en el presente documento se pueden dirigir generalmente frente a cualquier GPCR deseado y se pueden dirigir en particular frente a cualquier epítipo conformacional de cualquier GPCR, preferentemente un estado conformacional funcional de cualquier GPCR, más preferentemente un estado conformacional activo de un GPCR (todos como se define anteriormente en el presente documento). Más particularmente, dicho epítipo conformacional puede ser parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o una estructura de bucle o dominio de cualquier GPCR deseado. Los dominios de unión a proteína se pueden dirigir frente a cualquier región extracelular adecuada, dominio, bucle u otro epítipo conformacional extracelular de un GPCR, pero se dirigen preferentemente frente a una de las partes extracelulares de los dominios transmembranarios o más preferentemente frente a uno de los bucles extracelulares que enlazan los dominios transmembranarios. De forma alternativa, los dominios de unión a proteína se pueden dirigir frente a cualquier región intracelular adecuada, dominio, bucle u otro epítipo conformacional intracelular de un GPCR, pero se dirigen preferentemente frente a una de las partes intracelulares de los dominios transmembranarios o más preferentemente frente a uno de los bucles intracelulares que enlazan los dominios transmembranarios. Un dominio de unión a proteína que se une específicamente a un epítipo "tridimensional" o "conformacional" se une específicamente a una estructura terciaria (es decir, tridimensional) de una proteína plegada, y se une a una afinidad mucho más reducida (es decir, en un factor de al menos 2, 5, 10, 50 o 100) a la forma lineal (es decir, desplegada, desnaturalizada) de la proteína. Se espera adicionalmente que los dominios de unión a proteína descritos en el presente documento se unan generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos naturales o sintéticos de dicho GPCR.

En un ejemplo específico, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento se puede unir específicamente a un epítipo conformacional intracelular de un GPCR. Preferentemente, el dominio de unión a proteína se puede unir específicamente a un epítipo conformacional que está comprendido en, localizado en o se solapa con el sitio de unión a proteína G de un GPCR. Más preferentemente, dichos dominios de unión a proteína pueden ocupar el sitio de unión a proteína G de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferentemente de un estado conformacional activo de un GPCR. Lo más preferentemente, dichos dominios de unión a proteína muestran un comportamiento similar a proteína G. El término "comportamiento similar a proteína G" como se usa en el presente documento se refiere a la propiedad de los dominios de unión a proteína de unirse preferentemente a un receptor unido a un agonista frente a, por ejemplo, un receptor unido a un agonista inverso. Los dominios de unión a proteína que muestran comportamiento similar a proteína G también potencian la afinidad del receptor por los agonistas, que se atribuye a la interacción cooperativa entre receptor ocupado por agonista y la proteína G (véase también la sección de ejemplos).

Preferentemente, el dominio de unión a proteína deriva de un sistema inmunitario innato o adaptativo. Preferentemente, dicho dominio de unión a proteína deriva de una inmunoglobulina. Preferentemente, el dominio de unión a proteína es un anticuerpo o un derivado del mismo. El término "anticuerpo" (Ab) se refiere generalmente a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina, o fragmento funcional de la misma, que se une específicamente a y reconoce un antígeno, y es conocido por el experto en la técnica. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) convencional comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable

de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Los términos de cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos monocatenarios y fragmentos de unión a antígeno. En algunos modos de realización, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno que incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o que consisten en un dominio VL o bien VH, y cualquier combinación de estos o cualquier otra porción funcional de un péptido de inmunoglobulina que se pueda unir al antígeno diana. El término "anticuerpos" también pretende incluir anticuerpos de cadena pesada o fragmentos funcionales de los mismos, tales como anticuerpos de dominio único, más específicamente, nanocuerpos, como se define adicionalmente el presente documento.

Preferentemente, dicho dominio de unión a proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad, preferentemente en una secuencia FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, o cualquier fragmento adecuado de la misma (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad). Los dominios de unión a proteína que comprenden 4 FR y 3 CDR son conocidos por el experto en la técnica y se han descrito, como un ejemplo no limitante, en Wesolowski *et al.* (2009).

Preferentemente, el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento deriva de un anticuerpo de camélido. Más preferentemente, el dominio de unión a proteína comprende una secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo o cualquier fragmento adecuado del mismo. Más específicamente, el dominio de unión a proteína es un nanocuerpo o cualquier fragmento adecuado del mismo. Un "nanocuerpo" (Nb), como se usa en el presente documento, se refiere al fragmento de unión a antígeno más pequeño o de un dominio variable único ("VHH") derivado de anticuerpo de cadena pesada natural y es conocido por el experto en la técnica. Derivan de anticuerpos únicamente de cadena pesada, observados en camélidos (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Desmyter *et al.* 1996). En la familia de los "camélidos", se encuentran inmunoglobulinas que carecen de cadenas de polipéptidos ligeras. Los "camélidos" comprenden camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y camélidos del nuevo mundo (por ejemplo, *Lama paccos*, *Lama glama*, *Lama guanicoe* y *Lama vicugna*).

Dicho anticuerpo de cadena pesada de dominio variable único se designa en el presente documento como un nanocuerpo o un anticuerpo VHH. Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™ son marcas comerciales de Ablynx NV (Bélgica). El pequeño tamaño y las propiedades biofísicas únicas de los Nb superan a los fragmentos de anticuerpos convencionales para el reconocimiento de epítomos no comunes u ocultos y para la unión en las cavidades o sitios activos de proteínas diana. Adicionalmente, los Nb se pueden diseñar como anticuerpos biespecíficos y bivalentes o se pueden unir a moléculas indicadoras (Conrath *et al.* 2001). Los Nb son proteínas de dominio único estables y rígidas que se pueden preparar fácilmente y sobreviven al aparato digestivo. Por lo tanto, se pueden usar Nb en muchas aplicaciones que incluyen el descubrimiento de fármacos y tratamiento (Saerens *et al.* 2008), pero también como una herramienta versátil y valiosa para la purificación, estudio funcional y cristalización de proteínas (Conrath *et al.* 2009).

Los nanocuerpos usados en los procedimientos descritos en el presente documento comprenden generalmente una cadena de aminoácidos única que se puede considerar que comprende 4 "secuencias estructurales" o FR y 3 "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR (como se define anteriormente en el presente documento). Los ejemplos no limitantes de nanocuerpos se describen en más detalle adicionalmente. Debe quedar claro que las regiones estructurales de nanocuerpos también pueden contribuir a la unión de sus antígenos (Desmyter *et al.* 2002; Korotkov *et al.* 2009).

Los ejemplos no limitantes de los nanocuerpos usados en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, nanocuerpos como se define en las SEQ ID NO: 1-29 (véase la fig. 12, tabla 1). La delimitación de las secuencias de CDR se basa en el sistema de numeración única IMGT para dominios V y dominios similares a V (Lefranc *et al.* 2003). En un modo de realización específico, los nanocuerpos anteriores pueden comprender al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 30-70 (véase la figura 12; tabla 2). Más específicamente, los nanocuerpos anteriores se pueden seleccionar del grupo que comprende las SEQ ID NO: 1-29 o un fragmento funcional de las mismas. Un "fragmento funcional" o un "fragmento adecuado", como se usa en el presente documento, puede comprender, por ejemplo, uno de los bucles de CDR. Preferentemente, dicho fragmento funcional comprende CDR3. Más específicamente, dichos nanocuerpos consisten en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29 y dicho fragmento funcional de dichos nanocuerpos consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 30-70. También se contempla en el presente documento una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de los nanocuerpos anteriores o fragmentos funcionales. Adicionalmente, también se contemplan en el presente documento vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los nanocuerpos anteriores o fragmentos funcionales de los mismos, así como células huésped que expresan dichos vectores de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos e inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión víricos, tales como baculovirus, virus del bosque Semliki y lentivirus o transfección transitoria en células de insecto o mamífero. Las células huésped adecuadas incluyen *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y similares. Las

células huésped de animales adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40 y similares. La clonación, expresión y/o purificación de los nanocuerpos se puede hacer de acuerdo con las técnicas conocidas por el experto en la técnica.

5 Se debe advertir que el término nanocuerpo como se usa en el presente documento en su sentido más amplio no está limitado a una fuente biológica específica o a un procedimiento específico de preparación. Por ejemplo, se pueden obtener generalmente los nanocuerpos usados en los procedimientos descritos en el presente documento: (1) aislando el dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada natural; (2) mediante expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VHH natural; (3) mediante "humanización" de un dominio VHH natural o  
10 mediante expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VHH humanizado; (4) mediante "camelización" de un dominio VH natural de cualquier especie animal, y, en particular, de una especie de mamífero, tal como de un ser humano o mediante expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VH camelizado; (5) mediante "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" como se describe en la técnica o mediante expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VH camelizado; (6) usando técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos conocidas de por sí; (7) preparando un ácido nucleico que codifica un nanocuerpo usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas de por sí, seguido de la expresión del ácido nucleico obtenido de esta manera; y/o (8) mediante cualquier combinación de uno o más de los anteriores.

Una clase preferente de nanocuerpos corresponde con los dominios VHH de anticuerpos de cadena pesada naturales dirigidos frente a un estado conformacional funcional de un GPCR. Aunque las colecciones vírgenes o sintéticas de nanocuerpos (para los ejemplos de dichas colecciones, véanse los documentos WO9937681, WO0043507, WO0190190, WO03025020 y WO03035694) pueden contener aglutinantes conformacionales frente a un GPCR en un estado conformacional funcional, un ejemplo preferente incluye la inmunización de un *Camelidae* con un GPCR en un estado conformacional funcional, opcionalmente unido a un ligando de receptor, para exponer el sistema inmunitario del animal con los epítopos conformacionales que son únicos para el GPCR (por ejemplo, GPCR unido a un agonista para producir anticuerpos dirigidos frente a un GPCR en su estado conformacional activo). De esta manera, como se describe adicionalmente en el presente documento, se pueden generar u obtener preferentemente dichas secuencias de VHH inmunizando adecuadamente una especie de camélido con un GPCR, preferentemente un GPCR en un estado conformacional funcional, más preferentemente un estado conformacional activo (es decir, para producir una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos frente a dicho GPCR), obteniendo una muestra biológica adecuada a partir de dicho camélido (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de linfocitos B) y generando secuencias de V<sub>H</sub>H dirigidas frente a dicho GPCR, partiendo de dicha muestra. Dichas técnicas serán evidentes para el experto. Aún otra técnica para obtener las secuencias de VHH deseadas implica adecuadamente inmunizar un mamífero transgénico que pueda expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para producir una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos frente a un GPCR en un estado conformacional funcional), obtener una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de linfocitos B) y luego generando secuencias de VHH dirigidas frente a dicho GPCR partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida de por sí. Por ejemplo, para este propósito, se pueden usar los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los procedimientos y técnicas adicionales descritos en el documento WO02085945 y en el documento WO04049794.

40 Por consiguiente, la aplicación engloba procedimientos de generación de dominios de unión a proteína descritos en el presente documento. Como un ejemplo no limitante, se proporciona un procedimiento de generación de nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR, que comprende

- (i) inmunizar a un animal con un GPCR, y
- 45 (ii) cribar para determinar nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de dicho GPCR.

Preferentemente, la inmunización de un animal se hace con un GPCR en presencia de un ligando de receptor, en la que dicho ligando induce un estado conformacional funcional particular de dicho GPCR. Por ejemplo, se pueden generar nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional activo de un GPCR inmunizando a un animal con un GPCR en presencia de un agonista que induce la formación de un estado conformacional activo de dicho GPCR (véase también la sección de ejemplos).

Para la inmunización de un animal con un GPCR, se puede producir y purificar el GPCR usando procedimientos convencionales que pueden emplear expresar una forma recombinante del GPCR en una célula huésped y purificar el GPCR usando cromatografía de afinidad y/o procedimientos basados en anticuerpos. Por ejemplo, se puede emplear el sistema baculovirus/Sf-9 para la expresión, aunque también se pueden usar otros sistemas de expresión (por ejemplo, sistemas bacterianos, de levaduras o de células de mamífero). Los procedimientos ejemplares para expresar y purificar los GPCR se describen, por ejemplo, en Kobilka (1995), Eroglu *et al* (2002), Chelikani *et al* (2006) y el libro "Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors" (Kevin R. Lynch (Ed.), 1998), entre muchos otros. También se puede reconstituir un GPCR en vesículas de fosfolípidos. Asimismo, se conocen procedimientos para reconstituir un GPCR activo en vesículas de fosfolípidos y se describen en: Luca *et al* (2003),

Mansoor *et al* (2006), Niu *et al.* (2005), Shimada *et al.* (2002), y Eroglu *et al.* (2003), entre otros. En determinados casos, se pueden reconstituir el GPCR y los fosfolípidos a densidad alta (por ejemplo, 1 mg de receptor por mg de fosfolípido). Las vesículas de fosfolípidos se pueden someter a prueba para confirmar que el GPCR está activo. En muchos casos, un GPCR puede estar presente en la vesícula de fosfolípidos en ambas orientaciones (en la orientación normal y en la orientación "al revés" en la que los bucles intracelulares están fuera de la vesícula). Otros procedimientos de inmunización con un GPCR incluyen, sin limitación, el uso de células completas que expresan un GPCR, la vacunación con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un GPCR (por ejemplo, vacunación con ADN), inmunización con virus o partículas similares a virus que expresan un GPCR, entre otros.

Se puede inmunizar cualquier animal adecuado, por ejemplo, un animal de sangre caliente, en particular, un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca, tiburón o cerdo o un ave, tal como un pollo o pavo, usando cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica adecuada para generar una respuesta inmunitaria.

El cribado para determinar nanocuerpos, como un ejemplo no limitante, que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de dicho GPCR, se puede realizar, por ejemplo, cribando un conjunto, colección o colección de células que expresan anticuerpos de cadena pesada en su superficie (por ejemplo, linfocitos B obtenidos a partir de un camélido inmunizado adecuadamente) o bacteriófagos que presentan una fusión de genIII y nanocuerpo en su superficie, cribando una colección (virgen o inmunitaria) de secuencias de VHH o secuencias de nanocuerpo, o cribando una colección (virgen o inmunitaria) de secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de VHH o secuencias de nanocuerpo, pudiéndose realizar todo de una manera conocida de por sí, y comprendiendo adicionalmente el procedimiento opcionalmente uno o más de otras etapas adecuadas, tales como, por ejemplo y sin limitación, una etapa de maduración de la afinidad, una etapa expresión de la secuencia de aminoácidos deseada, una etapa de cribado para determinar la unión y/o la actividad frente al antígeno deseado (en este caso, el GPCR), una etapa de determinar la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos deseada, una etapa de introducción de una o más sustituciones de humanización, una etapa de formateo en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, una etapa de cribado para determinar las propiedades biológicas y/o fisiológicas deseadas (es decir, usando un ensayo adecuado conocido en la técnica) y/o cualquier combinación de una o más de dichas etapas, en cualquier orden adecuado.

Una clase particularmente preferente de los dominios de unión a proteína comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH natural, pero que se ha "humanizado", es decir, reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de VHH natural (y, en particular, en las secuencias estructurales) por uno o más de los residuos de aminoácidos que se producen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Esto se puede realizar de una manera conocida de por sí, que será evidente para el experto en la técnica basándose en la descripción adicional en el presente documento y la técnica anterior en la humanización. De nuevo, se debe advertir que se pueden obtener dichos nanocuerpos humanizados de cualquier manera adecuada conocida de por sí (es decir, como se indica en los puntos (1) - (8) anteriores) y, de esta manera, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VHH natural como material de partida. Los nanocuerpos humanizados pueden tener diversas ventajas, tales como una inmunogenia reducida, en comparación con los dominios VHH naturales correspondientes. Dicha humanización implica generalmente la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de un VHH natural con los residuos de aminoácidos que se producen en la misma posición en un dominio VH humano, tales como un dominio VH3 humano. Se deben elegir las sustituciones de humanización de tal manera que los nanocuerpos humanizados resultantes todavía retengan las propiedades favorables de los nanocuerpos como se define en el presente documento. El experto podrá seleccionar las sustituciones de humanización o combinaciones adecuadas de sustituciones de humanización que optimicen o logren un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización, por un lado, y las propiedades favorables de dominios VHH naturales, por otro lado.

Otra clase particularmente preferente de dominios de unión a proteína comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural, pero que se ha "camelizado", es decir, reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácidos que se producen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Dichas sustituciones "de camelización" se insertan preferentemente en las posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfase VH-VL y/o en los llamados residuos con rasgos de camélido, como se define en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento WO9404678). Preferentemente, la secuencia de VH que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el nanocuerpo camelizado es preferentemente una secuencia VH de un mamífero, más preferentemente la secuencia de VH de un ser humano, tal como una secuencia VH3. Sin embargo, se debe advertir que se pueden obtener dichos nanocuerpos camelizados de cualquier manera adecuada conocida de por sí (es decir, como se indica en los puntos (1) - (8) anteriores) y, de esta manera, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VH natural como material de partida.

Por ejemplo, se puede realizar tanto la "humanización" como la "camelización" proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifique un dominio VH o dominio VHH natural, respectivamente, y luego cambiando, de manera

conocida de por sí, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifique un nanocuerpo "humanizado" o "camelizado", respectivamente. Este ácido nucleico se puede expresar de una manera conocida de por sí para proporcionar el nanocuerpo deseado. De forma alternativa, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH o dominio VHH natural, respectivamente, se puede diseñar la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo humanizado o camelizado deseado, respectivamente, y luego sintetizar *de novo* usando técnicas para la síntesis de péptidos conocida de por sí. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio VH o dominio VHH natural, respectivamente, se puede diseñar una secuencia de nucleótidos que codifique el nanocuerpo humanizado o camelizado deseado, respectivamente y luego sintetizar *de novo* usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas de por sí, después de lo cual el ácido nucleico obtenido de esta manera se puede expresar de una manera conocida de por sí, para proporcionar el nanocuerpo deseado. Otros procedimientos y técnicas adecuados para obtener nanocuerpos y/o ácidos nucleicos que codifican los mismos, partiendo de secuencias de VH naturales o preferentemente secuencias de VHH, serán evidentes para el experto, y, por ejemplo, pueden comprender combinar una o más partes de una o más secuencias de VH naturales (tales como una o más secuencias de FR y/o secuencias de CDR), una o más partes de una o más secuencias de VHH naturales (tales como una o más secuencias de FR o secuencias de CDR), y/o una o más secuencias sintéticas o semisintéticas, de una manera adecuada, para proporcionar un nanocuerpo o una secuencia de nucleótidos o ácidos nucleicos que codifique la misma.

También está en el alcance de la invención usar análogos, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos naturales o sintéticos (denominados colectivamente en el presente documento "análogos") de los nanocuerpos, y, en particular, análogos de los nanocuerpos de las SEQ ID NO: 1-29 (véase la tabla 1, fig. 12). Generalmente, en dichos análogos, uno o más residuos de aminoácidos pueden haber sido reemplazados, eliminados y/o añadidos, en comparación con los nanocuerpos como se define en el presente documento. Se pueden hacer dichas sustituciones, inserciones, deleciones o adiciones en una o más de las regiones estructurales y/o en una o más de las CDR, y, en particular, análogos de las CDR de los nanocuerpos de las SEQ ID NO: 1-29, correspondiéndose dicha CDR con las SEQ ID NO: 30-70 (véase la tabla 2, fig. 12). Los análogos, como se usa en el presente documento, son secuencias en las que cada o cualquier región estructural y cada o cualquier región determinante de la complementariedad muestra al menos un 80 % de identidad, preferentemente al menos un 85 % de identidad, más preferentemente un 90 % de identidad, incluso más preferentemente un 95 % de identidad con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir FR1\_análogo frente a FR1\_referencia, CDR1\_análogo frente a CDR1\_referencia, FR2\_análogo frente a FR2\_referencia, CDR2\_análogo frente a CDR2\_referencia, FR3\_análogo frente a FR3\_referencia, CDR3\_análogo frente a CDR3\_referencia, FR4\_análogo frente a FR4\_referencia) medida en una alineación de BLASTp (Altschul *et al.*; 1987; FR and CDR definitions according to IMGT unique numbering system for V-domains and V-like domains (Lefranc *et al.* 2003)).

Por medio de ejemplos no limitantes, una sustitución puede ser, por ejemplo, una sustitución conservadora (como se describe en el presente documento) y/o un residuo de aminoácido se puede reemplazar por otro residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la misma posición en otro dominio VHH. De esta manera, se incluyen en el alcance de la invención una cualquiera o más de sustituciones, deleciones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que mejoren las propiedades del nanocuerpo o bien que al menos no se alejen demasiado de las propiedades deseadas o del equilibrio o combinación de las propiedades deseadas del nanocuerpo (es decir, en la medida en que el nanocuerpo ya no es adecuado para su uso previsto). Un experto en la técnica podrá generalmente determinar y seleccionar sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y, opcionalmente, después de un grado limitado de experimentación rutinaria, que, por ejemplo, puede implicar introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de los nanocuerpos obtenidos de esta manera.

Por ejemplo, y dependiendo del organismo huésped usado para expresar el dominio de unión a proteína descrito en el presente documento, preferentemente dichas deleciones y/o sustituciones en el nanocuerpo se pueden diseñar de tal manera que se elimine uno o más sitios para la modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glucosilación), como está en la capacidad del experto en la técnica. De forma alternativa, se pueden diseñar las sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (como se describe en el presente documento), por ejemplo, para permitir la pegilación específica de sitio.

Los ejemplos de modificaciones, así como los ejemplos de residuos de aminoácidos en la secuencia de dominio de unión a proteína, preferentemente la secuencia de nanocuerpo, que se pueden modificar (es decir, bien en la cadena principal de proteína, pero preferentemente en una cadena lateral), procedimientos y técnicas que se pueden usar para introducir dichas modificaciones y las ventajas y usos potenciales de dichas modificaciones serán evidentes para el experto. Por ejemplo, dicha modificación puede implicar la introducción (por ejemplo, mediante unión covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o restos en o sobre el nanocuerpo, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas a los nanocuerpos. Los ejemplos de dichos grupos funcionales y de técnicas para introducirlos serán evidentes para el experto en la técnica y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y técnicas mencionados en la técnica anterior general citada anteriormente en el presente documento, así como los grupos funcionales y técnicas conocidos de por sí para la modificación de proteínas farmacéuticas, y, en particular, para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFv y

anticuerpos de dominio único), para los que se hace referencia, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.º ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Dichos grupos funcionales, por ejemplo, se pueden unir directamente (por ejemplo, covalentemente) a un nanocuerpo u opcionalmente por medio de un enlazador o espaciador adecuado, como será evidente de nuevo para el experto en la técnica. Una de las técnicas más ampliamente usados para incrementar la semivida y/o reducir la inmunogenia de proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados del mismo (tales como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, se puede usar cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitados a anticuerpos de dominio (único) y ScFv); se hace referencia a, por ejemplo, Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en el documento WO04060965. También están disponibles comercialmente diversos reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, EE. UU. Preferentemente, se usa pegilación dirigida a sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, Yang *et al.*, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este propósito, se puede unir PEG a un residuo de cisteína que se produce de manera natural en un nanocuerpo, se puede modificar un nanocuerpo para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o se puede fusionar una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG a los extremos N y/o C de un nanocuerpo, todo usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas de por sí por el experto. Preferentemente, para los nanocuerpos y proteínas usados en los procedimientos descritos en el presente documento, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo, en el intervalo de 20.000-80.000. Otra modificación normalmente menos preferente comprende glucosilación por enlace N o por enlace O, normalmente como parte de la modificación cotraduccional y/o postraduccional, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el nanocuerpos o polipéptido. Otra técnica para incrementar la semivida de un nanocuerpo puede comprender la genotecnología en nanocuerpos bifuncionales (por ejemplo, uno nanocuerpos frente al GPCR diana y uno frente a una proteína sérica, tal como albúmina) o en fusiones de nanocuerpos con péptidos (por ejemplo, un péptido frente a una proteína sérica, tal como albúmina).

Aún otra modificación puede comprender la introducción de uno o más marcadores detectables u otros restos o grupos generadores de señales, dependiendo del uso previsto del dominio de unión a proteína marcado, en particular, el nanocuerpo. Los marcadores adecuados y técnicas para su unión, uso y detección serán evidentes para el experto, y, por ejemplo, incluyen, pero no están limitados a, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina y metales fluorescentes, tales como Eu u otros metales de la serie de los lantánidos), marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes o marcadores bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y su análogos), radioisótopos, metales, quelatos de metales o cationes de metales u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para su uso en el diagnóstico *in vivo*, *in vitro* o *in situ* y la formación de imágenes, así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicero-fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotina-vidin-peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa). Otros marcadores adecuados serán evidentes para el experto, y, por ejemplo, incluyen restos que se pueden detectar usando RMN o espectroscopia ESR. Dichos polipéptidos y nanocuerpos marcados, se pueden usar, por ejemplo, para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos de por sí, tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos sándwich", etc.), así como en propósitos de formación de imágenes y diagnóstico *in vivo*, dependiendo de la elección del marcador específico. Como será evidente para el experto, otra modificación puede implicar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo, para quelar uno de los metales o cationes metálicos a los que se hace referencia anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen, por ejemplo, sin limitación, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que sea una parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina (estrept)avidina. Se puede usar dicho grupo funcional para enlazar el nanocuerpo a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que esté unido a la otra mitad del par de unión, es decir, a través de la formación del par de unión. Por ejemplo, se puede conjugar un nanocuerpo con biotina y enlazar a otra proteína, polipéptido, compuesto o vehículo conjugado a avidina o estreptavidina. Por ejemplo, se puede usar dicho nanocuerpo conjugado como un indicador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico donde se conjuga un agente que produce señales detectables con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, también se pueden usar dichos pares de unión para unir el nanocuerpo a un vehículo, incluyendo vehículos adecuados para propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitante son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000). También se pueden usar dichos pares de unión para enlazar un agente terapéuticamente activo al nanocuerpo descrito en el presente documento.

En un modo de realización particular, el nanocuerpo usado en los procedimientos descritos en el presente documento es bivalente y se forma uniendo, químicamente o mediante técnicas de ADN recombinante, entre sí dos dominios únicos monovalentes de las cadenas pesadas. En otro modo de realización particular, el nanocuerpo es biespecífico y se forma uniendo entre sí dos dominios variables de las cadenas pesadas, cada uno con una

especificidad diferente. De manera similar, los polipéptidos que comprenden nanocuerpos multivalentes o multiespecíficos se incluyen aquí como ejemplos no limitantes. Preferentemente, un nanocuerpo monovalente es tal que se unirá a una parte, región, dominio, bucle extracelular o de otro epítipo extracelular de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferentemente un estado conformacional activo de un GPCR, con una afinidad de menos de 500 nM, preferentemente de menos de 200 nM, más preferentemente de menos de 10 nM, tal como de menos de 500 pM. De forma alternativa, un nanocuerpo monovalente es tal que se unirá a una parte región, dominio, bucle intracelular o de otro epítipo intracelular de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferentemente un estado conformacional activo de un GPCR, con una afinidad de menos de 500 nM, preferentemente de menos de 200 nM, más preferentemente de menos de 10 nM, tal como de menos de 500 pM.

Además, también se puede dirigir adecuadamente cualquier nanocuerpo multivalente o multiespecífico (como se define en el presente documento) frente a dos o más partes, regiones, dominios, bucles extracelulares o intracelulares diferentes u otros epítopos extracelulares o intracelulares en el mismo antígeno, por ejemplo, frente a dos bucles extracelulares o intracelulares diferentes o frente a dos partes extracelulares o intracelulares diferentes de los dominios transmembranarios. Dichos nanocuerpos multivalentes o multiespecíficos también pueden tener (o genomanipularse y/o seleccionarse frente a su) avidéz incrementada y/o selectividad mejorada por el GPCR deseado, y/o por cualquier otra propiedad deseada o combinación de propiedades deseadas que se pueden obtener mediante el uso de dichos nanocuerpos multivalentes o multiespecíficos. En un modo de realización particular, dichos nanocuerpos multivalentes o multiespecíficos también pueden tener (o genomanipularse y/o seleccionarse frente a su) eficacia mejorada en la modulación de la actividad de señalización de un GPCR (véase también más adelante en el presente documento). Se apreciará que los nanocuerpos multivalentes o multiespecíficos adicionalmente se pueden dirigir adecuadamente a un antígeno diferente, tal como, pero no limitando a, un ligando que interacciona con un GPCR o una o más proteínas de señalización en dirección 3'.

También se divulga en el presente documento un complejo que comprende (i) un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, (ii) un GPCR en un estado conformacional funcional y opcionalmente (iii) un ligando de receptor. Un "ligando de receptor" o un "ligando", como se define en el presente documento, puede ser un compuesto pequeño, una proteína, un péptido, un andamiaje de proteína, un ion, un ácido nucleico, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o un anticuerpo, o cualquier fragmento adecuado derivado de los mismos y similares. Preferentemente, el ligando es de la clase de los agonistas y el receptor está en un estado conformacional activo. El ligando también puede ser un agonista inverso, un antagonista o un ligando sesgado. Los ligandos pueden ser ortostéricos o alostéricos. Los ligandos también incluyen moduladores alostéricos, potenciadores, moduladores alostéricos negativos e inhibidores. Pueden tener actividad biológica por sí mismos o pueden modular la actividad únicamente en presencia de otro ligando. Neubig *et al* (2003) describen muchas de las clases de ligandos.

Preferentemente, se proporciona un complejo en el que el dominio de unión a proteína se une al GPCR; más preferentemente, el dominio de unión a proteína se une al GPCR, en el que dicho GPCR se une a un ligando de receptor. Para ilustrar esto adicionalmente, y sin el propósito de ser limitativo, un complejo ternario estable que contiene un nanocuerpo, un GPCR y un agonista se puede purificar mediante cromatografía de afinidad o filtración en gel a partir de una mezcla, que contiene (1) un nanocuerpo que es específico para la conformación activa de ese GPCR, (2) el receptor solubilizado en detergente y (3) un agonista.

Preferentemente, el complejo es cristalino. Así, también se proporciona en el presente documento un cristal del complejo, así como procedimientos de preparación de dicho cristal, que se describen en mayor detalle a continuación. Preferentemente, se contempla una forma cristalina de un complejo que comprende (i) un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, (ii) un GPCR en un estado conformacional funcional, más preferentemente un estado conformacional activo y opcionalmente (iii) un ligando de receptor, en la que dicha forma cristalina se obtiene mediante el uso de un dominio de unión a proteína descrito en el presente documento.

El complejo también puede estar en una forma solubilizada, por ejemplo, después de la solubilización acuosa con un detergente. De forma alternativa, el complejo se puede inmovilizar en un soporte sólido. Se describen adicionalmente ejemplos no limitantes de soportes sólidos, así como procedimientos y técnicas para la inmovilización, en la descripción detallada. En otro ejemplo, el complejo puede estar en una "composición celular", que incluye un organismo, un tejido, una célula, una línea celular y una composición de membrana derivada de dicho organismo, tejido, célula o célula. Dicha composición de membrana también pretende incluir cualquier composición liposomal que pueda comprender lípidos naturales o sintéticos o una combinación de los mismos. Los ejemplos de composiciones liposomales o de membrana incluyen, pero no están limitadas a orgánulos, preparaciones de membrana, lipopartículas similares a virus, capas lipídicas (bicapas y monocapas), vesículas lipídicas, lipopartículas de alta densidad (por ejemplo, nanodiscos) y similares. Se apreciará que una composición celular, o una composición liposomal o similar a membrana puede comprender lípidos naturales o sintéticos.

Por consiguiente, en el presente documento se divulga adicionalmente una composición celular, que incluye una composición liposomal o de membrana derivada de la misma (todo como se define anteriormente en el presente documento) que comprende un dominio de unión a proteína y/o un complejo como se describe en el presente documento.

Preferentemente, la composición celular que proporciona y/o que expresa el dominio de unión a proteína puede estabilizar y/o inducir un estado conformacional funcional de un GPCR tras la unión de dicho dominio de unión a

proteína. Se entenderá que es esencial retener suficiente funcionalidad de las proteínas respectivas, para las que están disponibles procedimientos y técnicas y el documento JS/GPCR/349b conocido por el experto en la técnica. También se apreciará que dicha composición celular puede proporcionar y/o expresar un GPCR diana de manera endógena o de manera exógena.

- 5 Las preparaciones de GPCR formados a partir de fragmentos de membrana o extractos en detergente de membrana se revisan en detalle en Cooper (2004). Se proporcionan adicionalmente ejemplos no limitantes de preparaciones de receptores solubilizados en la sección de ejemplos.

La transfección de las células diana (por ejemplo, células de mamífero) se puede llevar a cabo siguiendo los principios esbozados por Sambrook y Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3.º edición, volumen 3, capítulo 16, sección 16.1-16.54). Además, también se puede realizar la transducción vírica usando reactivos, tales como vectores adenovíricos. La selección del sistema de vectores víricos apropiado, regiones reguladoras y célula huésped es de conocimiento común en el nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Las células resultantes transfectadas resultantes se mantienen en cultivo o congeladas para su uso posterior de acuerdo con prácticas estándar. Preferentemente, las células son células eucariotas, por ejemplo, células de levadura o líneas de células cultivadas, por ejemplo, líneas celulares de mamífero, preferentemente líneas celulares humanas, que expresan un GPCR de interés. Las líneas celulares preferentes que expresan funcionalmente el dominio de unión a proteína y/o el GPCR incluyen células de insecto (por ejemplo, SF-9), líneas celulares humanas (por ejemplo, HEK293), líneas de células de roedor (por ejemplo, CHO-K1), líneas de células de camélido (Dubca).

Se pueden usar los dominios de unión a proteína o los complejos o la composición celular como se describe anteriormente en el presente documento en una variedad de contextos y aplicaciones, que se describirán en más detalle a continuación.

#### Cristalización y resolución de la estructura de un GPCR

La cristalización de las proteínas de membrana, incluyendo los GPCR, sigue siendo un desafío formidable. Aunque parece que los procedimientos de expresión y purificación permiten la generación de cantidades en miligramos, lograr la estabilidad con estas moléculas es tal vez el obstáculo más difícil de superar. La purificación necesita una liberación del GPCR de la bicapa lipídica mediante solubilización en detergente, un procedimiento durante el que las superficies hidrófobas de la proteína se recubren con monómeros de tensioactivo para formar un complejo proteína-detergente (PDC). Sin embargo, la cinta de detergente formada alrededor de la proteína es un mal reemplazo para la bicapa lipídica, tanto como se pierda la presión lateral ejercida sobre la proteína por los lípidos circundantes. De esta manera, a menudo la solubilización de las proteínas de membrana da como resultado la desestabilización, desplegamiento y agregación posterior. Los GPCR distintos de rodopsina típicamente tienen una mala estabilidad en detergentes y son propensos a la agregación y proteólisis. Los esfuerzos para cristalizar los GPCR se han visto frustrados por otras características intrínsecas de las proteínas integrales de membrana. Las siete hélices transmembranarias hidrófobas de los GPCR son malas superficies para los contactos cristalinos, y los dominios extracelulares e intracelulares a menudo son relativamente cortos y/o mal estructurados. Además de la rodopsina (un GPCR atípico

en términos de estabilidad y abundancia natural), los primeros cristales de GPCR se obtuvieron a partir de  $\beta$ 2AR unido a un fragmento Fab que reconoció un epítipo compuesto de los extremos carboxílico y amínico del tercer bucle intracelular de que conecta los TM 5 y 6 (Rasmussen, 2007). En el segundo enfoque, el tercer bucle intracelular se reemplazó por lisozima T4 ( $\beta$ 2AR-T4L; Rosenbaum, 2007). Finalmente, la notable versatilidad de los GPCR como moléculas de señalización se puede atribuir a su estructura tridimensional flexible y dinámica. Desafortunadamente, dicho comportamiento dinámico es particularmente difícil para el análisis estructural de alta resolución. Hacer crecer los cristales de calidad de difracción requiere una proteína estable, conformacionalmente homogénea. Como tales, los cristales de calidad de difracción de un GPCR natural no unido son difíciles de obtener, incluso cuando esta meta se logra, la estructura cristalina se representa únicamente una de las muchas conformaciones naturales. Muchos de estos problemas se pueden resolver mediante el uso de dominios de unión a proteína, en nanocuerpos particulares, como se describe en el presente documento como herramientas para estabilizar, purificar y cristalizar estados conformacionales específicos de GPCR para el análisis estructural de alta resolución.

50 De esta manera, uno de los objetivos es usar dominios de unión a proteína, como se describe en el presente documento como herramientas para estabilizar las proteínas de GPCR y adicionales para usar estos dominios de unión a proteína como ayudas de cocristalización para los GPCR, o, en otras palabras, para facilitar la cristalogénesis de los GPCR, preferentemente en un estado conformacional funcional.

55 Por consiguiente, en el presente documento también se divulga el uso de un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, o un complejo que comprende el dominio de unión a proteína o una composición celular que proporciona el dominio de unión a proteína, para estabilizar un GPCR en un estado conformacional funcional, en particular en un estado conformacional activo; y/o para inducir la formación de un estado conformacional (preferentemente, activo) funcional particular en un GPCR. Se apreciará que dicho dominio de unión a proteína es una herramienta muy útil para purificar, cristalizar y/o resolver la estructura de un GPCR en

un estado conformacional funcional, en particular en su estado conformacional activo. Como se esboza claramente anteriormente en el presente documento, debe quedar claro que los dominios de unión a proteína tal como se describe en el presente documento que se van a usar para purificar, estabilizar, cristalizar y/o resolver la estructura de un GPCR se pueden dirigir frente a cualquier GPCR deseado y se pueden unir específicamente a o reconocer un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, de cualquier GPCR deseado. En particular, dicho epítipo conformacional puede ser parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o una estructura de bucle o dominio de cualquier GPCR deseado.

En primer lugar, los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento pueden incrementar la termoestabilidad de los receptores solubilizados en detergente, estabilizados en un estado conformacional particular, protegiéndolos de la degradación proteolítica y/o agregación y facilitando la purificación y concentración de las muestras homogéneas del receptor correctamente plegado. Las personas de experiencia ordinaria en la técnica reconocerán que dichas muestras son el punto de partida preferente para la generación de cristales de difracción.

La cristalización del receptor purificado es otro importante cuello de botella en el procedimiento de determinación de la estructura macromolecular mediante cristalografía de rayos X. La cristalización con éxito requiere la formación de núcleos y su posterior crecimiento en cristales de tamaño adecuado. El crecimiento de los cristales se produce generalmente de manera espontánea en una solución sobresaturada como resultado de la nucleación homogénea. Se pueden cristalizar proteínas en un experimento de cribado de matriz dispersa típico, en el que se muestrean extensivamente los precipitantes, aditivos y concentración de proteína, y se pueden identificar las condiciones de sobresaturación adecuadas para la nucleación y el crecimiento de los cristales para una proteína particular. Se relaciona con el enfoque de cribado de matriz dispersa generar una variación estructural en la propia proteína, por ejemplo, añadiendo ligandos que se unen a la proteína, o haciendo diferentes mutaciones, preferentemente en residuos superficiales de la proteína diana o tratando de cristalizar diferentes especies ortólogas de la proteína diana (Chang 1998). Un hallazgo inesperado es la utilidad de los dominios de unión a proteína, tales como nanocuerpos, como se describe en el presente documento, que se unen específicamente a un GPCR para introducir un grado de variación estructural tras la unión mientras que preservan el pliegue global del GPCR. Diferentes nanocuerpos generarán diferentes estructuras cuaternarias que proporcionan nuevas interfaces distintas para la formación de la red cristalina que da como resultado múltiples formas cristalinas mientras que preservan el pliegue global del GPCR.

Debido a que la cristalización implica una pérdida desfavorable de la entropía conformacional en la molécula que se va a ensamblar en la red cristalina, los procedimientos que reducen la entropía conformacional de la diana todavía en solución deben incrementar la probabilidad de cristalización reduciendo la penalización entrópica neta de la formación de la red. El enfoque de "reducción de la entropía superficial" ha demostrado ser altamente eficaz (Derewenda 2004). Asimismo, los compañeros de unión, tales como iones, ligandos de moléculas pequeñas y péptidos pueden reducir la heterogeneidad conformacional uniéndose a y estabilizando un subconjunto de estados conformacionales de una proteína. Aunque dichos compañeros de unión son eficaces, no todas las proteínas tienen un compañero de unión conocido, e incluso cuando se conoce un compañero de unión, su afinidad, solubilidad y estabilidad química pueden no ser compatibles con los ensayos de cristalización. Por lo tanto, sorprendentemente se encontró que se pueden usar los dominios de unión a proteína, en particular, los nanocuerpos, como se describe en el presente documento como herramientas para incrementar la probabilidad de obtener cristales bien ordenados minimizando la heterogeneidad conformacional en el GPCR diana mediante la unión a una conformación particular del receptor.

La cristalización de los GPCR para los estudios estructurales de alta resolución es particularmente difícil debido a la superficie anfipática de estas proteínas de membrana. Incluidos en la bicapa de la membrana, los sitios de contacto de la proteína con las cadenas de acilo de los fosfolípidos son hidrófobos, mientras que las superficies polares están expuestas a los grupos de cabeza polares de los lípidos y de las fases acuosas. Para obtener cristales tridimensionales bien ordenados, un prerrequisito para el análisis estructural de rayos X a alta resolución, los GPCR se solubilizan con la ayuda de detergentes y se purifican como complejos proteína-detergente. La micela de detergente cubre la superficie hidrófoba de la proteína de membrana en una manera similar a cinta (Hunte y Michel 2002; Ostermeier *et al.* 1995). Los complejos GPCR-detergente forman cristales tridimensionales en los que los contactos entre las moléculas de proteína adyacentes se hacen mediante las superficies polares de la proteína que sobresale desde la micela detergente (Day *et al.* 2007). Obviamente, la micela de detergente requiere espacio en la red cristalina. Aunque las interacciones atractivas entre las micelas pueden estabilizar el empaquetamiento cristalino (Rasmussen *et al.* 2007; Dunn *et al.* 1997), estas interacciones no dan lugar a contactos cristalinos rígidos. Debido a que muchas proteínas de membrana, incluyendo los GPCR contienen dominios hidrófilos relativamente pequeños o altamente flexibles, una estrategia para incrementar la probabilidad de obtener cristales bien ordenados es para agrandar la superficie polar de la proteína y/o reducir su flexibilidad. Así, se pueden usar los nanocuerpos descritos en el presente documento para ampliar las superficies polares de la proteína, complementando la cantidad de superficie de proteína que puede facilitar los contactos primarios entre las moléculas en la red cristalina. Los nanocuerpos descritos en el presente documento también pueden reducir la flexibilidad de sus regiones extracelulares para hacer crecer cristales bien ordenados. Los nanocuerpos son especialmente adecuados para este propósito debido a que se componen de un dominio globular rígido único y carecen de regiones de enlazador flexibles a diferencia de los anticuerpos convencionales o fragmentos derivados, tales como los Fab.

El complejo que comprende el dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y el GPCR diana en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, se puede cristalizar usando cualquiera de una variedad de procedimientos de cristalización especializados para proteínas de membrana, muchos de los cuales se revisan en Caffrey (2003). En términos generales, los procedimientos son procedimientos basados en lípidos que incluyen añadir lípidos al complejo GPCR-nanocuerpo antes de la cristalización. Se han usado previamente dichos procedimientos para cristalizar otras proteínas de membrana. Muchos de estos procedimientos, incluyendo el procedimiento de cristalización en fase cúbica lipídica y el procedimiento de cristalización en bicelas, explotan las propiedades de autoensamblado espontáneas de los lípidos y detergentes como vesículas (procedimiento de fusión de vesículas), micelas discoidales (procedimiento en bicelas) y cristales líquidos o mesofases (procedimiento *in meso* o en fase cúbica). Los procedimientos de cristalización en fases cúbicas lipídicas se describen, por ejemplo, en: Landau *et al.* 1996; Gouaux 1998; Rummel *et al.* 1998; Nollert *et al.* 2004. Los procedimientos de cristalización en bicelas se describen, por ejemplo, en: Faham *et al.* 2005; Faham *et al.* 2002.

En el presente documento se describe adicionalmente el uso de un dominio de unión a proteína como se describe anteriormente en el presente documento para resolver una estructura de un GPCR. La estructura de una proteína, en particular un GPCR, incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria y, si procede, cuaternaria de dicha proteína. La "resolución de la estructura" como se usa en el presente documento se refiere a determinar la disposición de los átomos o las coordenadas atómicas de una proteína, y a menudo se hace mediante un procedimiento biofísico, tal como cristalografía de rayos X.

En la cristalografía de rayos X, los datos de difracción, cuando está propiamente ensamblada, dan la amplitud de la transformada de Fourier en 3D de la densidad de electrones de la molécula en la celda unitaria. Si se conocen las fases, la densidad de electrones se puede obtener simplemente mediante síntesis de Fourier. Para un complejo proteico, el éxito para derivar la información de fase del reemplazo molecular (MR) solo es cuestionable cuando la fracción de proteínas con una estructura conocida (los modelos de búsqueda) es baja (menos de un 50 % del contenido de aminoácidos) y/o cuando los cristales presentan una calidad de difracción limitada. Aunque la combinación del ajuste de fase de reemplazo isomorfo múltiple (MIR) y RM ha demostrado ser exitosa para los complejos proteicos (por ejemplo, Ostermeier *et al.* 1995; Li *et al.* 1997; Hunte *et al.* 2000), el requisito para producir un buen derivado de átomo pesado es casi siempre problemático. Durante la última década, los enfoques de MIR clásicos han sido desbancados generalmente por el uso de los datos de dispersión anómalos que usan principalmente la incorporación (MAD o SAD) de selenometionina (SeMet) (Hendrickson 1991). De hecho, los datos experimentales anómalos que usan energías de límite de Se proporcionan generalmente información de fase menos sesgada y superior en comparación con los datos de ajuste de fase de MR basado en modelos o bien MIR. Un ejemplo se refiere al uso de nanocuerpos para el ajuste de fase de los complejos de GPCR-nanocuerpo mediante MR o MAD. Los nanocuerpos generalmente se expresan de manera robusta y son adecuados para la incorporación de SeMet. El ajuste de fase de un complejo GPCR-nanocuerpo introduciendo todos los sitios SeMet en el nanocuerpo solo obvia la necesidad de incorporar los sitios SeMet en el GPCR.

En muchos casos, obtener un cristal de calidad de difracción es la principal barrera para resolver su estructura de resolución atómica. De esta manera, se pueden usar los dominios de unión a proteína como se describe anteriormente en el presente documento, en particular, los nanocuerpos, para mejorar la calidad de difracción de los cristales de modo que se pueda resolver la estructura cristalina de la proteína de GPCR.

Existe un gran interés en la información estructural para ayudar a guiar el descubrimiento de fármacos de GPCR. Para los GPCR cuyas estructuras ya han sido resueltas, estos esfuerzos de modelado han demostrado ser imprecisos al nivel requerido por los diseñadores de fármacos por ordenador. Con las estructuras de estados inactivos de  $\beta_2$ AR, el receptor  $\beta_1$ AR y el A2A, los químicos farmacéuticos tienen ahora datos experimentales para guiar el desarrollo de ligandos para diversas dianas terapéuticas activas. Sin embargo, se puede limitar el valor de estas estructuras de alta resolución para el cribado por ordenador. Los recientes estudios de acoplamiento molecular que usan la estructura cristalina de  $\beta_2$ AR como una plantilla identificaron seis nuevos ligandos de  $\beta_2$ AR que se unían con afinidades que variaban desde 9 nM a 4  $\mu$ M; sin embargo, cada compuesto presentó actividad agonista inverso. Más allá de la cristalización de más GPCR, se deben desarrollar procedimientos para adquirir estructuras de receptores unidos a diferentes clases de ligandos que incluyen agonistas, antagonistas, reguladores alostéricos y/o proteínas G. Por ejemplo, los cristales de receptor unido a agonista pueden proporcionar representaciones tridimensionales de los estados activos de los GPCR. Estas estructuras ayudarán a clarificar los cambios conformacionales que conectan los sitios de interacción a proteína G y de unión al ligando, y dan lugar a hipótesis mecanicistas más precisas y, con el tiempo, nuevos tratamientos. Dada la flexibilidad conformacional inherente a los GPCR activados por ligando y la mayor heterogeneidad presentada por los receptores unidos a agonista, la estabilización de dicho estado no es fácil. Dichos esfuerzos se pueden beneficiar de la estabilización de la conformación del receptor unido a agonista mediante la adición de dominios de unión a proteína que son específicos para un estado conformacional activo del receptor. Son especialmente adecuados los nanocuerpos que muestran comportamiento similar a proteína G y presentan propiedades cooperativas con respecto a la unión al agonista, como se proporcionan en el presente documento (véase la sección de ejemplos).

De acuerdo con esto, en el presente documento se proporciona un procedimiento de determinación de una estructura cristalina de un GPCR en un estado conformacional funcional, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, un GPCR diana y opcionalmente un ligando de receptor, y
- (ii) formar un complejo del dominio de unión a proteína, el GPCR, y opcionalmente el ligando de receptor, y
- (iii) cristalizar dicho complejo de la etapa (ii) para formar un cristal

5 en el que la estructura cristalina se determina de un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente el estado conformacional activo.

Dicha determinación de la estructura cristalina se puede efectuar mediante un procedimiento biofísico, tal como cristalografía de rayos X. El procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa de obtención de las coordenadas atómicas del cristal (como se define anteriormente en el presente documento).

10 Captura y/o purificación de un GPCR en un estado conformacional funcional

Aún otro ejemplo hace referencia a un procedimiento para capturar y/o purificar un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, haciendo uso de cualquiera de los dominios de unión a proteína descritos anteriormente, o complejos o composiciones celulares que comprenden dichos dominios de unión a proteína. La captura y/o purificación de un GPCR, en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, permitirá la cristalización posterior, caracterización de ligandos y cribado de compuestos, inmunizaciones, entre otros. En la práctica, dichos procedimientos y técnicas incluyen, sin limitación, procedimientos basados en afinidad, tales como cromatografía de afinidad, purificación por afinidad, inmunoprecipitación, detección de proteínas, inmunoquímica, expresión en superficie, entre otros, y son bien conocidos por el experto en la técnica.

20 De esta manera, un ejemplo particular se refiere al uso de un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, o un complejo o una composición celular que comprende el mismo como se describe anteriormente en el presente documento, para capturar un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente para capturar un GPCR en su estado conformacional activo. Opcionalmente, pero no necesariamente, la captura de un GPCR en su estado conformacional funcional como se describe anteriormente puede incluir capturar un GPCR en un estado conformacional funcional en el complejo con un ligando de receptor o una o más proteínas de interacción en dirección 3'.

De acuerdo con esto, en el presente documento también se proporciona un procedimiento de captura de un GPCR en un estado conformacional funcional, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 30 (i) proporcionar un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y un GPCR diana, y,
- (ii) formar un complejo del dominio de unión a proteína y el GPCR,

en el que se captura un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo.

Más específicamente, en el presente documento también se contempla un procedimiento de captura de un GPCR en un estado conformacional funcional, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 35 (i) aplicar una solución que contiene un GPCR en una pluralidad de estados conformacionales a un soporte sólido que posee inmovilizado un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, y
- (ii) formar un complejo del dominio de unión a proteína y el GPCR, y
- (iii) eliminar moléculas débilmente unidas o no unidas,

40 en el que se captura un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo.

Se apreciará que cualquiera de los procedimientos como se describe anteriormente puede comprender adicionalmente la etapa de purificar el complejo del dominio de unión a proteína y el GPCR en su estado conformacional funcional.

45 Aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico

Tradicionalmente, se usan moléculas pequeñas para el desarrollo de fármacos dirigidos frente a los GPCR, no solo debido a que las compañías farmacéuticas tengan motivos históricos para trabajar con ellas, pero, lo más importante, debido a las restricciones estructurales de los GPCR de familia 1, que tienen el sitio de unión al ligando en la hendidura transmembranaria (Nat Rev Drug Discov. (2004) The state of GPCR research in 2004. Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 3(7):575, 577-626). Por este motivo, ha demostrado ser

difícil o imposible generar anticuerpos monoclonales frente a esta clase diana. Los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento, en particular, los nanocuerpos, pueden resolver este problema particular por medio de su propiedad intrínseca de unión por medio de bucles de CDR prolongados en las cavidades.

5 Por consiguiente, en el presente documento se divulga adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y al menos uno de un vehículo, adyuvante o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

10 Un "vehículo", o "adyuvante", en particular, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "adyuvante farmacéuticamente aceptable" es cualquier excipiente, diluyente, vehículo y/o adyuvante adecuado que, por sí mismos, no inducen la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición ni tampoco desencadenan protección. Así, los vehículos farmacéuticamente aceptables son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos, y son conocidos por el experto en la técnica.

15 Los vehículos o adyuvantes adecuados típicamente comprenden uno o más de los compuestos incluidos en la siguiente lista no exhaustiva: macromoléculas grandes metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos ácticos), ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Los vehículos o adyuvantes pueden ser, como un ejemplo no limitante, solución de Ringer, solución de dextrosa o solución de Hank. También se pueden usar soluciones no acuosas, tales como aceites fijos y oleato de etilo. Un excipiente preferente es dextrosa al 5 % en solución salina. El excipiente puede contener cantidades escasas de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química, incluyendo tampones y conservantes.

20 La administración de un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento o una composición farmacéutica del mismo puede ser por medio de administración oral, inhalada o parenteral. Por ejemplo, se puede administrar el dominio de unión a proteína a través de administración intratecal o intracerebroventricular. Se puede administrar el compuesto activo solo o preferentemente formulado como una composición farmacéutica. Una cantidad eficaz para tratar una determinada enfermedad o trastorno que expresa el antígeno reconocido por el dominio de unión a proteína depende de los factores normales, tales como la naturaleza y gravedad del trastorno que se está tratando y el peso del mamífero. Sin embargo, una dosis unitaria estará habitualmente en el intervalo de 0,1 mg a 1 g, por ejemplo, 0,1 a 500 mg, por ejemplo, 0,1 a 50 mg, o 0,1 a 2 mg de dominio de unión a proteína o una composición farmacéutica del mismo. Las dosis unitarias se administrarán habitualmente una vez al mes, una vez a la semana, quincenalmente, una vez o más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, o 4 veces al día, más normalmente 1 a 3 veces al día. Es preferente en gran medida que el dominio de unión a proteína o una composición farmacéutica del mismo se administre en forma de una composición de dosis unitaria, tal como una composición oral, parenteral, o inhalada de dosis unitaria. Dichas composiciones se preparan por mezcla y se adaptan adecuadamente para la administración oral, inhalada o parenteral, y como tales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas para chupar, polvos reconstituibles, soluciones inyectables e infusibles o suspensiones o supositorios o aerosoles. Los comprimidos y cápsulas para su administración oral se presentan normalmente en una dosis unitaria, y contienen excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes de compresión, lubricantes, disgregantes, colorantes, saborizantes y agentes humectantes. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Las cargas adecuadas para su uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Los disgregantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón, tales como glicolato sódico de almidón. Los lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Los agentes humectantes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen laurilsulfato de sodio. Estas composiciones orales sólidas se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de mezcla, cargas, formación de comprimidos o similares. Se pueden usar operaciones de mezcla repetidas para distribuir el agente activo a través de las composiciones que emplean grandes cantidades de cargas. Por supuesto, dichas operaciones son convencionales en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar, por ejemplo, en forma de elixires, jarabes, emulsiones, soluciones, suspensiones acuosas u oleosas o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo, sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, tales como ésteres de glicerina, propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y, si se desea, agentes saborizantes o colorantes convencionales. Las formulaciones orales también incluyen formulaciones de liberación lenta convencionales, tales como comprimidos o gránulos que tienen un recubrimiento entérico. Preferentemente, las composiciones para su inhalación se presentan para su administración al aparato respiratorio como un inhalador o un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para su insuflación, solo o en combinación con un vehículo inerte, tal como lactosa. En dicho caso, las partículas de compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micrómetros, preferentemente de menos de 10 micrómetros, por ejemplo, entre 1 y 5 micrómetros, tal como entre 2 y 5 micrómetros. Una dosis inhalada favorecida estará en el intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo, de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg. Para su administración parenteral, se preparan formas de dosis unitaria fluidas que contienen un compuesto descrito en el presente documento y un vehículo estéril. El compuesto activo, dependiendo del vehículo y la

concentración, se puede suspender o bien disolver. Las soluciones parenterales se preparan habitualmente disolviendo el compuesto en un vehículo y esterilizando mediante filtración antes de cargarlas en un vial o ampolla adecuado y sellando. Ventajosamente, los adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes tamponadores también se disuelven en el vehículo. Para potenciar la estabilidad, la composición se puede congelar después de cargarse en el vial y eliminar el agua al vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y esterilizarse mediante exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un tensioactivo o agente humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. En su caso, las pequeñas cantidades de broncodilatadores, por ejemplo, aminas simpaticomiméticas, tales como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina y efedrina; derivados de xantina, tales como teofilina y aminofilina y corticosteroides, tales como prednisolona y estimulantes adrenales, tales como ACTH. Como es práctica común, las composiciones normalmente estarán acompañadas de instrucciones escritas o impresas para su uso en el tratamiento médico en cuestión.

Se puede realizar la administración de los dominios de unión a proteína, en particular, nanocuerpos, en las células como se describe para péptidos, polipéptidos y proteínas. Si el antígeno es extracelular o un dominio extracelular, el dominio de unión a proteína puede ejercer su función uniéndose a este dominio, sin necesidad de administración intracelular. Los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento pueden seleccionar como diana epítomos conformacionales intracelulares de GPCR de interés. Para usar estos dominios de unión a proteína como tratamientos eficaces y seguros dentro de una célula, la administración intracelular se puede potenciar mediante sistemas de administración o transducción de proteínas conocidos en la técnica. Los dominios de transducción de proteínas (PTD) han atraído considerable interés en el campo de la administración de fármacos por su capacidad para desplazarse a través de membranas biológicas. Los PTD son secuencias relativamente cortas (1-35 aminoácidos) que confieren esta actividad de desplazamiento aparente a las proteínas y otras cargas macromoleculares a las que están conjugados, complejados o condensados (Sawant y Torchilin 2010). Por ejemplo, se ha usado ampliamente el péptido TAT derivado del VIH (YGRKKRRQRRR) para la administración intracelular de diversos agentes que varían desde moléculas pequeñas a proteínas, péptidos, gama de nanovehículos farmacéuticos y agentes de formación de imágenes. De forma alternativa, también se pueden usar mecanismos endocíticos mediados por receptor para la administración de fármacos intracelular. Por ejemplo, la vía de internalización mediada por el receptor de transferrina es una vía de absorción celular eficaz que se ha explotado para la administración específica de sitio de fármacos y proteínas (Qian *et al.* 2002). Esto se logra químicamente mediante conjugación de transferrina con proteínas o fármacos terapéuticos o bien genéticamente mediante infusión de proteínas o péptidos terapéuticos en la estructura de transferrina. Las proteínas que existen de manera natural (tales como la proteína de unión a hierro transferrina) son muy útiles en esta área de selección de fármacos, puesto que estas proteínas son biodegradable, no tóxicas y no inmunogénicas. Por otra parte, pueden lograr la selección específica de sitio debido a las altas cantidades de sus receptores presentes en la superficie celular. Todavía otros sistemas de administración incluyen, sin el propósito de ser limitativos, sistemas de administración basadas en liposomas y polímeros.

Se puede someter a prueba la eficacia de los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento y de composiciones que comprenden los mismos usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido de por sí, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico implicado.

En el presente documento se divulga adicionalmente el uso del dominio de unión a proteína o la composición farmacéutica como se describe anteriormente en el presente documento para modular la actividad de señalización del GPCR.

Los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento se pueden unir al GPCR para activar o incrementar la señalización del receptor; o, de forma alternativa, para disminuir o inhibir la señalización del receptor. También se pueden unir los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento al GPCR de tal manera que bloqueen la actividad constitutiva del GPCR. También se pueden unir los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento al GPCR de tal manera que medien en la modulación alostérica (por ejemplo, se unan al GPCR en un sitio alostérico). De esta manera, los dominios de unión a proteína pueden modular la función del receptor uniendo diferentes regiones del receptor (por ejemplo, en sitios alostéricos). Por ejemplo, se hace referencia a George *et al.* (2002), Kenakin (2002) y Rios *et al.* (2001). También se pueden unir los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento al GPCR de tal manera que prolonguen la duración de la señalización mediada por GPCR o que potencien la señalización del receptor incrementando la afinidad del ligando por el receptor. Adicionalmente, también se pueden unir los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento a los GPCR de tal manera que inhiban o potencien el ensamblaje de homómeros o heterómeros funcionales de GPCR.

En un ejemplo particular, el dominio de unión a proteína o la composición farmacéutica como se describe anteriormente en el presente documento bloquea la señalización mediada por proteína G.

En otro ejemplo, se contempla el dominio de unión a proteína o la composición farmacéutica como se describe anteriormente en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionadas con GPCR,

tal como cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad cardiovascular.

Determinados de los dominios de unión a proteína descritos anteriormente pueden tener utilidad terapéutica y se pueden administrar a un sujeto que tiene una afección a fin de tratar al sujeto frente a la afección. La utilidad terapéutica para un dominio de unión a proteína se puede determinar mediante el GPCR al que se une el dominio de unión a proteína en esa señalización por medio de ese GPCR que se enlaza a la afección. En determinados casos, se puede activar el GPCR en la afección mediante unión al ligando. En otros ejemplos, se puede mutar el GPCR para que sea constitutivamente activo, por ejemplo. Se puede emplear un dominio de unión a proteína objeto para el tratamiento de una afección mediada por GPCR, tal como esquizofrenia, jaqueca, reflujo, asma, broncoespasmo, hipertrofia prostática, úlceras, epilepsia, angina de pecho, alergia, rinitis, cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, glaucoma y apoplejía. Se encuentran afecciones relacionadas con GPCR ejemplares adicionales en la base de datos del On-line Mendelian Inheritance in Man del sitio web de la malla multimedia mundial del NCBI. Así, en el presente documento también está previsto el uso de un dominio de unión a proteína o de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con GPCR.

En un ejemplo más específico, el dominio de unión a proteína se puede unir al receptor adrenérgico  $\beta_2$ , en cuyo caso se puede emplear en el tratamiento de una afección que requiera la relajación del músculo liso del útero o sistema vascular. De esta manera, se puede usar dicho dominio de unión a proteína para la prevención o alivio de dolores del parto prematuros en el embarazo, o en el tratamiento de asma crónica o aguda, urticaria, psoriasis, rinitis, conjuntivitis alérgica, actinitis, alergia al polen o mastocitosis, afecciones que se han enlazado al adrenoreceptor  $\beta_2$ . En estos ejemplos, se puede emplear el dominio de unión a proteína como agentes coterapéuticos para su uso en combinación con otras sustancias farmacéuticas, tales como sustancias farmacéuticas antiinflamatorias, broncodilatadoras o antihistamínicas, particularmente en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias obstructivas o inflamatorias, tales como las mencionadas anteriormente, por ejemplo, como potenciadores de la actividad terapéutica de dichos fármacos o como un medio para reducir la dosificación requerida o efectos secundarios potenciales de dichos fármacos. Se puede mezclar un dominio de unión a proteína objeto con la otra sustancia farmacéutica en una composición farmacéutica fija o se puede administrar por separado, antes, simultáneamente con o después de la otra sustancia farmacéutica. En términos generales, estos protocolos implican administrar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno relacionado con GPCR una cantidad eficaz de un dominio de unión a proteína que modula un GPCR para modular el GPCR en el huésped y tratar al individuo frente al trastorno.

En algunos ejemplos, si se desea una reducción de la actividad de un determinado GPCR, se pueden administrar uno o más compuestos que disminuyen la actividad del GPCR, mientras que si se desea un incremento de la actividad de un determinado GPCR, se pueden administrar uno o más compuestos que incrementan la actividad de la actividad del GPCR.

Una variedad de individuos son tratables de acuerdo con los procedimientos objeto. Generalmente, dichos individuos son mamíferos, si estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están en la clase de los mamíferos, incluyendo los órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchos ejemplos, los individuos serán seres humanos. Los procedimientos de tratamiento de los sujetos se realizan típicamente en individuos con dichos trastornos o en individuos con un deseo de evitar dichos trastornos.

El dominio de unión a proteína o el complejo como se describe en el presente documento también puede ser útiles para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad relacionada con GPCR, tal como cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad cardiovascular.

#### Identificación de compuestos que seleccionan como diana selectivamente un GPCR en un estado conformacional funcional

En el procedimiento de cribado de compuestos, la optimización de compuestos activos y el descubrimiento de fármacos, existe un requisito para los ensayos de cribado especialmente ricos en información, menos costosos, más eficaces y más rápidos que proporcionan información simultánea sobre diversas características compuestos y sus efectos sobre diversas vías celulares (es decir, eficacia, especificidad, toxicidad y metabolismo de fármacos). De esta manera, existe una necesidad de cribar rápida y económicamente un gran número de compuestos a fin de identificar nuevos ligandos específicos de un GPCR de interés, preferentemente ligandos específicos de conformación, que pueden ser nuevos fármacos candidatos potenciales. La presente invención resuelve este problema proporcionando dominios de unión a proteína que estabilizan y/o bloquean un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, que luego se pueden usar como inmunógenos o reactivos de selección para el cribado en una variedad de contextos. Una ventaja importante de los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento es que un GPCR se puede mantener en una conformación funcional estabilizada, preferentemente en una conformación del estado activo. Por ejemplo, los compuestos de colección que se unen selectivamente esta conformación activa del receptor tienen una propensión más alta de comportarse como agonistas debido a que la estabilización ortostérica o alostérica de la conformación activa del GPCR desencadena respuestas biológicas. Otra ventaja es que el dominio de unión a proteína incrementa

la termoestabilidad de la conformación activa del GPCR, protegiendo de esta manera el GPCR frente a la desnaturalización irreversible o térmica inducida por las condiciones no naturales usadas en el cribado de compuestos y el descubrimiento de fármacos, sin la necesidad de depender de GPCR mutantes con estabilidad incrementada. Otra ventaja importante de los dominios de unión a proteína selectivos de conformación como se describe en el presente documento es que permiten cribar rápida y fiablemente y diferenciar entre agonistas de receptor, agonistas inversos, antagonistas y/o moduladores, así como inhibidores de los GPCR y las vías dependientes de GPCR, incrementando así la probabilidad de identificar un ligando con las propiedades farmacológicas deseadas.

Para ilustrar esto adicionalmente, es un concepto bien establecido que la mayoría de los GPCR presenten afinidad de unión al agonista más alta cuando están complejados con la proteína G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por agonista y la proteína G (Delean *et al.* 1980). Los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento, en particular, los nanocuerpos, pueden estabilizar un estado conformacional activo de un GPCR (y, de esta manera, mostrar comportamiento similar a proteína G) y estados conformacionales inactivos desestabilizantes, incrementando de esta manera la afinidad del GPCR por los agonistas y disminuyendo la afinidad por los agonistas inversos o antagonistas. De ello se deduce que los dominios de unión a proteína, tales como los nanocuerpos, como se describe en el presente documento, que reconocen la conformación funcional activa del GPCR se pueden usar eficazmente en ensayos de cribado de alto rendimiento para cribar para determinar agonistas debidos a que incrementan la afinidad del receptor por los agonistas, en relación con los agonistas inversos o antagonistas. Recíprocamente, los dominios de unión a proteína, en particular, nanocuerpos, que estabilizan la conformación del estado inactivo de un GPCR incrementarán la afinidad por un agonista inverso o un antagonista y disminuirán la afinidad por un agonista. Por ejemplo, se pueden usar dichos dominios de unión a proteína para cribar para determinar dichos agonistas inversos. De esta manera, en el presente documento también se contemplan los dominios de unión a proteína, particularmente los nanocuerpos que reconocen estados conformacionales funcionales particulares, modulando de esta manera las afinidades por los agonistas y agonistas inversos de manera recíproca.

De esta manera, en el presente documento se divulga adicionalmente el uso de los dominios de unión a proteína, o los complejos, o las composiciones celulares, todo como se describe anteriormente en el presente documento, en los programas de cribado y/o identificación para compañeros de unión específicos de conformación de un GPCR, que, en definitiva, podría dar lugar a nuevos candidatos a fármacos potenciales.

En el presente documento se contempla un procedimiento de identificación de compuestos que se pueden unir selectivamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar un GPCR y un dominio de unión a proteína que se pueda unir específicamente a un estado conformacional funcional de dicho GPCR como se describe anteriormente en el presente documento, y
- (ii) proporcionar un compuesto de prueba, y
- (iii) evaluar si el compuesto de prueba se une al estado conformacional funcional del GPCR, y
- (iv) seleccionar un compuesto que se une selectivamente al estado conformacional funcional del GPCR.

Preferentemente, el procedimiento anterior comprende adicionalmente una etapa de formación de un complejo que comprende el dominio de unión a proteína y el GPCR en un estado conformacional funcional, más preferentemente en un estado conformacional activo.

De esta manera, en el presente documento también se contempla un procedimiento de identificación de compuestos que se pueden unir selectivamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar un complejo que comprende un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y un GPCR en un estado conformacional funcional, y
- (ii) proporcionar un compuesto de prueba, y
- (iii) evaluar si el compuesto de prueba se une al estado conformacional funcional del GPCR, y
- (iv) seleccionar un compuesto que se une al estado conformacional funcional del GPCR.

Preferentemente, el dominio de unión a proteína, como se usa en cualquiera de los procedimientos anteriores puede estabilizar y/o inducir un estado conformacional funcional de un GPCR tras la unión. Preferentemente, dicho estado conformacional funcional de un GPCR se selecciona del grupo que consiste en un estado conformacional basal, o un estado conformacional activo o un estado conformacional inactivo (como se define anteriormente en el presente documento). Lo más preferentemente, dicho estado conformacional funcional de un GPCR es un estado conformacional activo.

Preferentemente, el dominio de unión a proteína como se usa en cualquiera de los procedimientos de cribado anteriores comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas. Preferentemente, dicho dominio de unión a proteína deriva de un anticuerpo de camélido. Más preferentemente, dicho dominio de unión a proteína comprende una secuencia de nanocuerpo, o cualquier fragmento de la misma. En particular, dicho nanocuerpo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-29, o cualquier fragmento adecuado de la misma.

Otras preferencias para los dominios de unión a proteína y/o los complejos son como se define anteriormente.

En un ejemplo preferente, el dominio de unión a proteína, el GPCR o el complejo que comprende el dominio de unión a proteína y el GPCR, como se usa en cualquiera de los procedimientos de cribado anteriores, se proporcionan como células enteras, o extractos (orgánulos) de células, tales como extractos de membrana o fracciones de los mismos, o se pueden incorporar en las capas lipídicas o vesículas (que comprenden lípidos naturales y/o sintéticos), lipopartículas de alta densidad, o cualquier nanopartícula, tal como nanodiscos, o se proporcionan como VLP, de modo que se retenga suficiente funcionalidad de las proteínas respectivas. Las preparaciones de GPCR formados a partir de fragmentos de membrana o extractos en detergente de membrana se revisan en detalle en Cooper (2004). De forma alternativa, también se pueden solubilizar los GPCR y/o el complejo en detergentes. Se proporcionan adicionalmente ejemplos no limitantes de preparaciones de receptores solubilizados en la sección de ejemplos.

A menudo es preferente un cribado de alto rendimiento de las dianas de GPCR para compañeros de unión específicos de conformación. Esto se facilitará mediante inmovilización de un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento, un GPCR en un estado conformacional funcional o un complejo que los comprende, sobre una superficie sólida adecuada o soporte que se puede disponer en matrices o de otro modo multiplexar. Los ejemplos no limitantes de soportes sólidos adecuados incluyen microesferas, columnas, portaobjetos, chips o placas.

Más particularmente, los soportes sólidos se pueden particular (por ejemplo, microesferas o gránulos, usados generalmente en columnas de extracción) o en forma de hoja (por ejemplo, membranas o filtros, portaobjetos de vidrio o plástico, placas de ensayo de microtitulación, tira reactiva, dispositivos de llenado capilar o similares) que pueden ser fibras o tubos planos, plisados o huecos. Las siguientes matrices se dan como ejemplos y no son exhaustivas, tales ejemplos pueden incluir sílice (sílice amorfa porosa), es decir, la serie FLASH de cartuchos que contienen sílice irregular de 60 A (32-63  $\mu\text{m}$  o 35-70  $\mu\text{m}$ ) suministrados por Biotage (una división de Dyax Corp.), soportes de agarosa o poliacrilamida, por ejemplo, el intervalo de productos de Sepharose suministrados por Amersham Pharmacia Biotech, o los soportes de Affi-Gel suministrados por Bio-Rad. Además, existen polímeros macroporosos, tales como los soportes Affi-Prep estables con la presión suministrados por Bio-Rad. Otros soportes que se pueden utilizar incluyen; dextrano, colágeno, poliestireno, metacrilato, alginato de calcio, vidrio poroso controlado, aluminio, titanio y cerámica porosa. De forma alternativa, la superficie sólida puede comprender parte de un sensor dependiente de la masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón superficial. Los ejemplos adicionales de soportes disponibles comercialmente se analizan, por ejemplo, en Protein Immobilisation, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1991).

La inmovilización puede ser covalente o bien no covalente. En particular la inmovilización no covalente o adsorción sobre una superficie sólida del dominio de unión a proteína, el GPCR o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteína y dicho GPCR, como se describe en el presente documento se puede producir por medio de un recubrimiento de superficie con cualquiera de un anticuerpo, o estreptavidina o avidina, o un ion de metal, que reconoce una marca molecular unida al dominio de unión a proteína o el GPCR, de acuerdo con técnicas estándar conocidas por el experto (por ejemplo, marca de biotina, marca de histidina, etc.).

En particular, el dominio de unión a proteína, el GPCR o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteína y dicho GPCR, como se describe en el presente documento, se pueden unir a una superficie sólida mediante reticulación covalente usando técnicas químicas de acoplamiento convencionales. Una superficie sólida puede comprender de manera natural residuos reticulables adecuados para la unión covalente o se puede recubrir o derivatizar para introducir grupos reticulables adecuados de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo particular, se retiene suficiente funcionalidad de la proteína inmovilizada seguido del acoplamiento covalente directo a la matriz por medio de un resto reactivo que no contiene un brazo espaciador químico. Se analizan ejemplos adicionales e información más detallada sobre los procedimientos de inmovilización de anticuerpos (fragmentos) sobre soportes sólidos en Jung *et al.* (2008); de manera similar, se revisan los procedimientos de inmovilización al receptor de membrana en Cooper (2004).

Los avances en biología molecular, particularmente a través de mutagénesis dirigida de sitio, posibilitan la mutación de residuos de aminoácidos específicos en una secuencia de proteínas. La mutación de un aminoácido particular (en una proteína con estructura conocida o deducida) a una lisina o cisteína (u otro aminoácido deseado) puede proporcionar un sitio específico para el acoplamiento covalente, por ejemplo. También es posible volver a genomanipular una proteína específica para alterar la distribución de los aminoácidos disponibles en la superficie implicados en el acoplamiento químico (Kallwass *et al.*, 1993), en el efecto que controla la orientación de la proteína

acoplada. Se puede aplicar un enfoque similar a los dominios de unión a proteína descritos en el presente documento, así como a los GPCR estabilizados conformacionalmente, estén o no comprendidos en un complejo, de modo que se proporciona un medio de inmovilización orientada sin la adición de otras colas de péptidos o dominios que contienen aminoácidos naturales o bien no naturales. En el caso de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un nanocuerpo, es preferente la introducción de mutaciones en la región estructural, minimizando la interrupción de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo (fragmento).

Convenientemente, se pueden usar las proteínas inmovilizadas en procedimiento de inmuoadsorción, tales como inmunoensayos, por ejemplo, ELISA, o procedimientos de purificación de inmuoafinidad poniendo en contacto las proteínas inmovilizadas con una muestra de prueba de acuerdo con procedimientos estándar convencionales en la técnica. De forma alternativa, y particularmente para los propósitos de alto rendimiento, se pueden disponer en matrices o de otro modo multiplexar las proteínas inmovilizadas. Preferentemente, se usan las proteínas inmovilizadas para el cribado y selección de compuestos que se unen específicamente a un GPCR en un estado conformacional funcional, en particular, un GPCR en un estado conformacional activo.

Se apreciará que se puede inmovilizar el dominio de unión a proteína o bien el GPCR en un estado conformacional funcional, o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteína y dicho GPCR, dependiendo del tipo de aplicación o el tipo de cribado que se necesita hacer. Además, la elección del dominio de unión a proteína que estabiliza el GPCR (que selecciona como diana un epítipo conformacional particular del GPCR), determinará la orientación del GPCR y, por consiguiente, el resultado deseado de la identificación de compuestos, por ejemplo, compuestos que se unen específicamente a partes extracelulares, partes intramembranales o partes intracelulares de dicho GPCR estabilizado conformacionalmente.

De forma alternativa, se puede inmovilizar el compuesto de prueba (o una colección de compuestos de prueba) sobre una superficie sólida, tal como una superficie de chip, mientras que el dominio de unión a proteína, el GPCR o el complejo se proporcionan, por ejemplo, en una solución de detergente o en una preparación similar a membrana.

Más preferentemente, ni el dominio de unión a proteína, ni el GPCR, ni el compuesto de prueba se inmovilizan, por ejemplo, en protocolos de selección de expresión en fago en solución, o ensayos de unión de radioligando.

Se pueden usar diversos procedimientos para determinar la unión entre el GPCR estabilizado y un compuesto de prueba, incluyendo, por ejemplo, ensayos de inmuoadsorción enzimática (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos basados en chips, inmunocitofluorescencia, tecnología del doble híbrido en levadura y expresión en fago que son práctica común en la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Otros procedimientos de detección de la unión entre un compuesto de prueba y un GPCR incluyen ultrafiltración con procedimientos de espectroscopia de masas con pulverización iónica/HPLC u otros procedimientos (bio)físicos y analíticos.

También se pueden usar procedimientos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, bien conocido por los expertos en la técnica. Se apreciará que se puede detectar un compuesto de prueba unido usando un marcador o marca única asociada con el compuesto, tal como un marcador de péptido, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente, o una marca de radiofrecuencia, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Además de establecer la unión a un GPCR en un estado conformacional funcional, también será deseable determinar el efecto funcional de un compuesto sobre el GPCR. En particular, se pueden usar los dominios de unión a proteína o los complejos o las composiciones celulares como se describe en el presente documento para cribar compuestos que modulan (incrementan o disminuyen) la actividad biológica del GPCR. La modulación deseada en la actividad biológica dependerá del GPCR de elección. Los compuestos que se van a someter a prueba puede ser cualquier compuesto químico pequeño, o una macromolécula, tal como una proteína, un azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los compuestos de prueba serán compuestos químicos pequeños, péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos. Se apreciará que en algunos casos es preferente el cribado de alto rendimiento de compuestos de prueba y que los procedimientos como se describe anteriormente se pueden usar como un procedimiento de "cribado de la colección", un término bien conocido por los expertos en la técnica. De esta manera, el compuesto de prueba puede ser una colección de compuestos de prueba. En particular, los ensayos de cribado de alto rendimiento para compuestos terapéuticos, tales como agonistas, antagonistas o agonistas inversos y/o moduladores forman parte de la invención. Para los propósitos de alto rendimiento, se pueden usar colecciones de compuestos como colecciones de compuestos alostéricos, colecciones de péptidos, colecciones de anticuerpos, colecciones basadas en fragmentos, colecciones de compuestos sintéticos, colecciones de compuestos naturales, colecciones de expresión en fago y similares. Las metodologías para preparar y cribar dichas colecciones son conocidas en la técnica.

En un ejemplo preferente, los procedimientos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una colección de péptidos o química combinatoria que contiene un gran número de ligandos terapéuticos potenciales. Luego se criban dichas "colecciones combinatorias" o "colecciones de compuestos" en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento para identificar los miembros de la colección (particularmente subclases o especies químicas)

que presentan una actividad característica deseada. Una "colección de compuestos" es una colección de productos químicos almacenados normalmente usados en última instancia en el cribado de alto rendimiento. Una "colección combinatoria" es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o bien síntesis biológica, combinando una serie de "bloques de construcción" químicos, tales como reactivos. La preparación y el cribado de colecciones combinatorias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los compuestos identificados de esta manera pueden servir como "compuestos activos" convencionales o se pueden usar por sí mismos como tratamientos reales o potenciales. De esta manera, en un ejemplo adicional, los procedimientos de cribado como se describe anteriormente en el presente documento comprenden adicionalmente modificar un compuesto de prueba que ha demostrado que se une a un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo y determinar si el compuesto de prueba modificado se une al GPCR cuando reside en la conformación particular.

El compuesto de prueba se puede proporcionar como una muestra biológica. En particular, la muestra puede ser cualquier muestra adecuada tomada de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de fluido corporal, tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo. De forma alternativa, la muestra es extracto de células o tejido.

Los compuestos se pueden unir al GPCR diana que resulta en la modulación (activación o inhibición) de la función biológica del GPCR, en particular la señalización del receptor en dirección 3'. Esta modulación de la señalización del GPCR se puede producir orto o alostéricamente. Los compuestos se pueden unir al GPCR diana para activar o incrementar la señalización del receptor; o, de forma alternativa, para disminuir o inhibir la señalización del receptor. Los compuestos también se pueden unir al GPCR diana de tal manera que bloqueen la actividad constitutiva del GPCR. Los compuestos también se pueden unir al complejo diana de tal manera que medien en la modulación alostérica (por ejemplo, se unen al GPCR en un sitio alostérico). De esta manera, los compuestos pueden modular la función del receptor uniendo diferentes regiones del GPCR (por ejemplo, en sitios alostéricos).

Por ejemplo, se hace referencia a George *et al.* (2002), Kenakin (2002) y Rios *et al.* (2001). También se pueden unir los compuestos al GPCR diana de tal manera que prolonguen la duración de la señalización mediada por GPCR o que potencien la señalización del receptor incrementando la afinidad del ligando por el receptor. Adicionalmente, los compuestos también se pueden unir al complejo diana de tal manera que inhiban o potencien el ensamblaje de homómeros o heterómeros funcionales de GPCR.

Por ejemplo, se puede determinar si el compuesto altera la unión del GPCR a un ligando de receptor (tal como se define en el presente documento). Se puede someter a ensayo la unión de un GPCR a su ligando usando procedimientos de unión al ligando estándar conocidos en la técnica como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede radiomarcarse o marcarse con fluorescencia un ligando. El ensayo se puede llevar a cabo en células enteras o en membranas obtenidas a partir de las células o receptor solubilizado en agua con un detergente. El compuesto estará caracterizado por su capacidad de alterar la unión del ligando marcado (véase también la sección de ejemplos). El compuesto puede disminuir la unión entre el GPCR y su ligando o puede incrementar la unión entre el GPCR y su ligando, por ejemplo, en un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces.

De esta manera, el complejo como se usa en cualquiera de los procedimientos de cribado anteriores puede comprender adicionalmente un ligando de receptor. Preferentemente, el ligando de receptor se escoge del grupo que comprende una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, un producto natural y similares. Más preferentemente, el ligando de receptor es un agonista completo, o un agonista parcial, o un agonista inverso, o un antagonista, tal como se describe anteriormente en el presente documento.

Los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento, particularmente los nanocuerpos, también pueden ser útiles para la identificación de compuestos activos y el diseño de peptidomiméticos. El uso de un péptido biológicamente pertinente o estructura de proteína como punto de partida para la identificación de compuestos activos representa uno de los enfoques más poderosos en el descubrimiento moderno de fármacos. Los peptidomiméticos son compuestos cuyos elementos esenciales (farmacóforo) imitan una proteína o péptido natural o en el espacio 3D y que retienen la capacidad de interactuar con la diana biológica y producir el mismo efecto biológico. Los peptidomiméticos están diseñados para obviar algunos de los problemas asociados con un péptido natural: por ejemplo, estabilidad frente a la proteólisis (duración de la actividad) y mala biodisponibilidad. Determinadas otras propiedades, tales como la potencia o selectividad del receptor a menudo se pueden mejorar sustancialmente. Por medio de un ejemplo no limitante, los nanocuerpos como se describe en el presente documento se pueden unir con bucles de CDR largos profundamente en el núcleo del receptor para ejercer un efecto biológico. Estos péptidos y sus estructuras concomitantes en el complejo nanocuerpo-GPCR pueden servir como puntos de partida para la identificación de compuestos activos y el diseño de peptidomiméticos.

Por consiguiente, los dominios de unión a proteína, en particular, los nanocuerpos como se describe en el presente documento, pueden ser útiles en ensayos de cribado. Los ensayos de cribado para el descubrimiento de fármacos pueden ser ensayos en fase de solución o en fase sólida, por ejemplo, un ensayo de unión, tal como ensayos de unión de radioligando. En los ensayos de alto rendimiento, es posible cribar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un único día en formatos de 96, 384 o 1536 pocillos. Por ejemplo, se puede usar cada pocillo

de una placa de microtitulación para realizar un ensayo por separado frente a un modulador potencial seleccionado, o, si se van a observar los efectos de la concentración o tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden someter a prueba un único modulador. De esta manera, una única placa de microtitulación estándar puede someter a ensayo aproximadamente 96 moduladores. Es posible someter a ensayo muchas placas por día; son posibles hoy en día cribados de ensayo de hasta aproximadamente 6.000, 20.000, 50.000 o más compuestos diferentes.

Adicionalmente, también puede ser útiles los dominios de unión a proteína, tales como los nanocuerpos como se describe en el presente documento, en ensayos basados en células. Los ensayos basados en células también son críticos para evaluar el mecanismo de acción de nuevas dianas biológicas y la actividad biológica de los compuestos químicos. Los ensayos basados en células actuales para los GPCR incluyen medidas de activación de vías (liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , generación de AMPc o actividad transcripcional); mediciones de tráfico de proteínas marcando los GPCR y elementos en dirección 3' con GFP; y medidas directas de las interacciones entre proteínas usando la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o enfoques del doble híbrido en levadura. Introducir los dominios de unión a proteína, en particular, los nanocuerpos como se describe en el presente documento, dentro de la célula en el compartimento pertinente de la célula (intra o extracelularmente) mediante cualquier medio bien conocido y comúnmente usado en la técnica, puede dar lugar a nuevos o mejores ensayos basados en células.

En particular, existe una necesidad de "desorfanizar" los GPCR para los que no se ha identificado un ligando de activación natural. La estabilización de los GPCR en un estado conformacional funcional usando los dominios de unión a proteína como se describe en el presente documento posibilita enfoques de cribado que se pueden usar para identificar ligandos de GPCR "huérfanos" si se desconoce el ligando natural. Se pueden identificar los ligandos de GPCR huérfanos a partir de muestras biológicas, tales como extracto de sangre o tejido o a partir de las colecciones de ligandos. Por ejemplo, se han adoptado diversos enfoques para "desorfanizar" incluyendo cribado de matrices frente a las familias de ligandos conocidos.

Se puede someter a prueba la eficacia de los compuestos y/o composiciones que comprenden los mismos usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido de por sí, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico implicado.

Por consiguiente, se proporciona en un ejemplo específico, un soporte sólido al que se inmoviliza un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y/o un complejo que comprende un dominio de unión a proteína y un GPCR en un estado conformacional funcional como se describe en el presente documento para su uso en cualquiera de los procedimientos de cribado anteriores.

El compuesto de prueba como se usa en cualquiera de los procedimientos de cribado anteriores se puede seleccionar del grupo que comprende un polipéptido, un péptido, una molécula pequeña, un producto natural, un peptidomimético, un ácido nucleico, un lípido, lipopéptido, un hidrato de carbono, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, tal como Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o bien VH, un anticuerpo de cadena pesada (hCAb), un anticuerpo de dominio único (sdAb), un minicuerpo, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH o nanocuerpo), el dominio variable de los receptores de antígeno nuevos derivado de anticuerpos de tiburón (VNAR), un andamiaje de proteína que incluye un alfacorectina, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPs), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knottinas, dominios CH2 genotecnológicos (nanoanticuerpos), como se define anteriormente en el presente documento.

Opcionalmente el compuesto de prueba se puede enlazar covalente o no covalentemente a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados y técnicas para su unión, que los usan y detectan, serán evidentes para el experto en la técnica, e incluyen, pero no están limitados a, cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen microesferas magnéticas (por ejemplo, dynabeads), colorantes fluorescentes (por ejemplo, todos los colorantes Alexa Fluor, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores colorimétricos, tales como microesferas de oro coloidal o vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios para detectar dichos marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. De esta manera, por ejemplo, se pueden detectar marcadores radiactivos usando contadores de centelleo o película fotográfica, se pueden detectar marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida.

Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente disponiendo la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido mediante la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado. Se describieron anteriormente otros marcadores detectables adecuados en el contexto de un dominio de unión a proteína.

Preferentemente, el compuesto de prueba es un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, como se describe anteriormente, incluyendo un nanocuerpo. Por ejemplo, y sin el propósito de ser limitativo, el compuesto de

prueba puede ser un anticuerpo (tal como se define en el presente documento en su sentido más amplio) que se ha sido producido frente a un complejo que comprende un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento y un GPCR (incluyendo variantes, como se describe anteriormente en el presente documento) en un estado conformacional funcional, preferentemente en un estado conformacional activo. Los procedimientos para producir anticuerpos *in vivo* son conocidos en la técnica. Preferentemente, la inmunización de un animal se hará de una manera similar a la descrita anteriormente en el presente documento (inmunización con GPCR en presencia de ligando de receptor; véase también la sección de ejemplos) con un GPCR en presencia de un dominio de unión a proteína que estabiliza un estado conformacional funcional, más preferentemente un dominio de unión a proteína que estabiliza un estado activo. La solicitud también se refiere a procedimientos para seleccionar anticuerpos específicos para un GPCR en un estado conformacional funcional, preferentemente un estado conformacional activo, que implica el cribado de colecciones de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, expresados en bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas u otros sistemas de expresión sobre un complejo que contiene un GPCR y un dominio de unión a proteína que estabiliza un estado conformacional funcional del GPCR.

En el presente documento se divulga adicionalmente un kit que comprende un dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento o un complejo o una composición celular como se describe en el presente documento. El kit puede comprender adicionalmente una combinación de reactivos, tales como tampones, marcas moleculares, construcciones de vectores, material de muestra de referencia, así como soportes sólidos adecuados y similares. Dicho kit puede ser útil para cualquiera de las aplicaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender (una colección de) compuestos de prueba útiles para las aplicaciones de cribado de compuestos.

Finalmente, en el presente documento se proporciona el uso de cualquier dominio de unión a proteína como se describe en el presente documento para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión específica a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR específico, en particular, un estado conformacional activo de un GPCR y para construir dominios de unión a proteína artificiales basándose en dichas secuencias de aminoácidos. Se apreciará que en los dominios de unión a proteína descritos en el presente documento se conocen las regiones estructurales y las regiones determinantes de la complementariedad, y el estudio de los derivados del dominio de unión a proteína, que se unen al mismo epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR, en particular un estado conformacional activo de un GPCR, permitirá deducir los aminoácidos esenciales implicados en la unión a dicho epítipo conformacional. Este conocimiento se puede usar para construir un dominio de unión a proteína mínimo y para crear derivados del mismo, que se puede hacer rutinariamente mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Los siguientes ejemplos pretenden promover una comprensión adicional de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en el presente documento con referencia a modos de realización ilustrados, se debe entender que la invención no se limita a los mismos. Los expertos en la técnica y que tengan acceso a las enseñanzas en el presente documento reconocerán modificaciones y modos de realización adicionales dentro del alcance de la misma. Por lo tanto, la presente invención está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

## EJEMPLOS

### 40 **Dominios de unión a proteína que estabilizan estados conformacionales funcionales de $\beta_2$ AR humano**

#### Ejemplo 1. Inmunización, construcción de la colección y cribado inicial

Para obtener nanocuerpos maduros *in vivo* frente a  $\beta_2$ AR, se inmunizó una llama (*Llama glama*) con  $\beta_2$ AR recombinante truncado en Gly365 ( $\beta_2$ AR-365) para excluir una respuesta inmunitaria al extremo carboxílico. Se expresó  $\beta_2$ AR-365 en células de insecto y el antígeno se reconstituyó como se describe previamente (Day *et al*, 2007). Después de seis administraciones semanales del receptor unido a agonista truncado reconstituido, los linfocitos se aislaron de la sangre de llama inmunizada y se preparó una colección de fagos y se cribó como se describe en materiales y procedimientos con respecto a los ejemplos (véase más a continuación). Dos cribados identificaron nanocuerpos conformacionales que reconocían el  $\beta_2$ AR natural, pero no el receptor desnaturalizado.

#### Ejemplo 2. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales mediante ELISA

En un primer cribado se comparó la unión de los nanocuerpos sobre el antígeno  $\beta_2$ AR natural y desnaturalizado por calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, se recubrió un pocillo con vesículas de fosfolípido que contenían  $\beta_2$ AR-365 unido a agonista (0,1 mg de proteína/pocillo). A continuación, se incubó esta placa a 80 °C durante 2 horas. A continuación, otro pozo de la misma placa se recubrió con vesículas de fosfolípido que contenían  $\beta_2$ AR-365 unido a agonista (0,1 mg de proteína/pocillo) sin calentamiento. Todos los nanocuerpos se pudieron unir selectivamente al receptor natural, pero no al receptor inactivado por calor, lo que indica que 16 aglutinantes reconocen epítopos conformacionales.

#### Ejemplo 3. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales mediante inmunotransferencia

En un siguiente cribado se comparó la especificidad de los nanocuerpos por un receptor  $\beta_2$ AR unido a agonista natural, frente a un receptor unido a agonista inverso natural, frente a un receptor desnaturalizado con SDS mediante análisis inmunotransferencia. El cribado identificó 16 nanocuerpos conformacionales diferentes que reconocen el  $\beta_2$ AR-365 unido a agonista natural, pero no el agonista inverso, o el receptor desnaturalizado por calor (fig. 2 (inmunotransferencias)).

#### Ejemplo 4. Selección de nanocuerpos con comportamiento similar a proteína G

El cribado inicial identificó 16 clones que reconocieron el  $\beta_2$ AR unido a agonista natural, pero no el receptor desnaturalizado por calor. El próximo objetivo fue identificar nanocuerpos que tenían comportamiento similar a proteína G. Los  $\beta_2$ AR se acoplan preferentemente a Gs y la unión al agonista potencia las interacciones de proteína G. Por otra parte, en presencia de Gs, el  $\beta_2$ AR se une con afinidad más alta al agonista. Por lo tanto, se observó en (1) el efecto del agonista sobre el nanocuerpo que se une al  $\beta_2$ AR usando cromatografía de exclusión por tamaño, (2) el efecto de los nanocuerpos sobre la afinidad de unión del agonista por  $\beta_2$ AR en las membranas y (3) el efecto de nanocuerpos sobre los cambios conformacionales de  $\beta_2$ AR, como se supervisa mediante el fluoróforo monobromobimano (mBB) sensible al entorno.

#### Ejemplo 5. Los nanocuerpos con comportamiento similar a proteína G se unen específicamente al receptor unido a agonista purificado.

Los nanocuerpos purificadas se incubaron con  $\beta_2$ AR solubilizado en detergente purificado en presencia de un agonista o un agonista inverso que estabiliza una conformación inactiva. Luego la mezcla se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que separa proteínas basándose en su tamaño. Siete nanocuerpos se unieron a  $\beta_2$ AR purificado y migraron como un complejo en SEC únicamente en presencia de agonista y no un agonista inverso (se muestra un ejemplo en la fig. 1A, fig. 3 y fig. 4). Los nanocuerpos restantes no se unieron con afinidad suficiente alta para cambiar la movilidad del  $\beta_2$ AR en SEC.

#### Ejemplo 6. Los nanocuerpos con comportamiento similar a proteína G potencian la afinidad de $\beta_2$ AR por agonistas.

Muchos GPCR presentan afinidad de unión al agonista más alta cuando se complejan con la proteína G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por agonista y la proteína G. Los experimentos de SEC proporcionan pruebas de que 7 nanocuerpos se unen preferentemente al  $\beta_2$ AR ocupado por agonista y, por lo tanto, pueden estabilizar un estado activo de una manera similar a la proteína G Gs. Los experimentos de unión por competición al agonista se realizaron en presencia y ausencia de estos 7 nanocuerpos. La afinidad del  $\beta_2$ AR por el agonista (isoproterenol) se potenció 2-30 veces en presencia de los nanocuerpos 65, 67, 69, 71, 72, 80 y 84 (fig. 1B y tabla 1). Por el contrario, Nb80 no incrementa la afinidad del  $\beta_2$ AR o  $\beta_2$ AR -T4L por el agonista inverso ICI-118,551 (ICI) (figura 15).

#### Ejemplo 7. Nb80 y la proteína G inducen cambios conformacionales similares en el dominio citoplásmico de TM6.

La estructura cristalina reciente de la opsina, así como los estudios biofísicos sobre rodopsina (Park *et al.* 2008) y el  $\beta_2$ AR (Yao *et al.* 2009) muestran que el extremo citoplásmico del segmento transmembranario 6 (TM6) sufre cambios conformacionales tras la unión al agonista que se requieren para el acoplamiento de la proteína G. Para investigar el efecto de los nanocuerpos sobre el movimiento del dominio citoplásmico de TM6 se marcó  $\beta_2$ AR purificado en C265 con monobromobimano (mBB- $\beta_2$ AR). Se mostró previamente que tanto la unión al agonista como el acoplamiento de la proteína G indujo cambios en la fluorescencia de mBB-  $\beta_2$ AR compatibles con un movimiento hacia fuera de TM6 (Yao *et al.* 2008) como se observa en la estructura cristalina de opsina (Park *et al.* 2008). En mBB- $\beta_2$ AR, la adición de agonista junto con proteína G da como resultado cambios fluorescentes más grandes que el agonista o bien la proteína G sola. Esto es compatible con las interacciones cooperativas observados en ensayos de unión por competición al agonista (Yao *et al.* 2009). De manera similar, se observaron cambios relativamente pequeños en la fluorescencia en mBB- $\beta_2$ AR con la adición del agonista isoproterenol solo o bien Nb80 solo; sin embargo, se observaron cambios más grandes cuando tanto el agonista como el nanocuerpos se añadieron juntos (fig. 1C). Se observaron resultados comparables para los nanocuerpos 65, 67, 69 71, 72 y 84 (fig. 5).

#### Ejemplo 8. Caracterización del estado activo de $\beta_2$ AR estabilizado por nanocuerpo

Luego se compararon el efecto de Nb80 con Gs sobre la estructura de  $\beta_2$ AR y la afinidad de unión al agonista.  $\beta_2$ AR se marcó en el extremo citoplásmico de TM6 en C265 con monobromobimano y se reconstituyó en partículas de HDL. TM6 se mueve en relación con TM3 y TM5 tras la activación del agonista (fig. 6A), y se ha demostrado previamente que el entorno alrededor del bimano enlazado covalentemente a C265 cambia con tanto la unión al agonista como el acoplamiento de la proteína G, dando como resultado una disminución en la intensidad del bimano y un cambio rojo en  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (Yao *et al.* 2009). El cambio en la fluorescencia con bimano es compatible con los movimientos de TM6 similares a los observados en la rodopsina mediante espectroscopia DEER y en la estructura de la opsina de pH bajo. Como se muestra en la fig. 6B, tanto el agonista de catecolamina isoproterenol como Gs estabilizan una conformación similar a activa, pero el efecto de Gs es mayor en presencia de isoproterenol, en consonancia con las interacciones cooperativas de agonista y Gs sobre la estructura de  $\beta_2$ AR. Nb80 solo tiene un efecto sobre la fluorescencia con bimano y  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de  $\beta_2$ AR no unido a ligando que es similar a la de Gs (fig. 6C). Este

efecto no se observó en  $\beta_2$ AR unido al agonista inverso ICI-118.551. El efecto de Nb80 se incrementó en presencia de 10  $\mu$ M de isoproterenol. Estos resultados muestran que Nb80 no reconoce la conformación inactiva del  $\beta_2$ AR, pero se une eficazmente al  $\beta_2$ AR ocupado por agonista y produce un cambio en la fluorescencia con bimanio que es indistinguible de la observada en presencia de Gs e isoproterenol.

5 Las figuras 6D y 6E muestran el efecto de Gs y Nb80 en la afinidad del agonista por  $\beta_2$ AR. Se reconstituyó  $\beta_2$ AR en partículas de HDL y se realizaron experimentos de unión por competición al agonista en ausencia o presencia de Nb80 y Gs. En ausencia de cualquiera de las proteínas, isoproterenol tiene una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 107 nM. En presencia de Gs se observan dos estados de afinidad, porque no todo el  $\beta_2$ AR se acopla a Gs. En el estado acoplado a Gs, la afinidad de isoproterenol se incrementa en 100 veces ( $K_i = 1,07$  nM) (fig 6D y tabla 4). De manera similar, en presencia de Nb80 la afinidad de isoproterenol se incrementa en 95 veces ( $K_i = 1,13$  nM) (fig. 6E y tabla 4). Estos datos de unión sugieren que Nb80 estabiliza una conformación en el  $\beta_2$ AR WT que es muy similar a la estabilizada por Gs, de tal manera que el acoplamiento energético del agonista y unión a Gs se imita fielmente por Nb80.

15 Se obtuvo el análisis estructural de alta resolución del estado inactivo del  $\beta_2$ AR con una proteína de fusión  $\beta_2$ AR-T4L. Se mostró previamente que  $\beta_2$ AR-T4L tiene una afinidad más alta por isoproterenol que  $\beta_2$ AR WT (Rosenbaum *et al.* 2007). Sin embargo, en presencia de Nb80 la afinidad se incrementó 60 veces, lo que da como resultado una afinidad ( $K_i = 0,56$  nM) comparable a la de  $\beta_2$ AR WT unido a Nb80 (fig 6F y tabla 4). Aunque no se puede estudiar el acoplamiento de la proteína G en  $\beta_2$ AR-T4L debido al impedimento estérico por T4L, los resultados muestran que T4L no previene la unión de Nb80, y los valores de  $K_i$  prácticamente idénticos por la unión al agonista a  $\beta_2$ AR natural y  $\beta_2$ AR-T4L en presencia de Nb80 sugieren que Nb80 estabiliza una conformación similar en estas dos proteínas.

#### Ejemplo 9. Los nanocuerpos facilitan la cristalización de $\beta_2$ AR unido a agonista.

25 El  $\beta_2$ AR se cristalizó originalmente unido al agonista inverso carazolol usando dos enfoques diferentes. Los primeros cristales se obtuvieron a partir de  $\beta_2$ AR unido a un fragmento Fab que reconoce un epítipo compuesto de los extremos carboxílico y amínico del tercer bucle intracelular que conecta las TM 5 y 6 (Rasmussen *et al.* 2007). En el segundo enfoque, el tercer bucle intracelular se reemplazó por lisozima T4 ( $\beta_2$ AR-T4L) (Rosenbaum *et al.* 2007). Los esfuerzos para cristalizar el complejo  $\beta_2$ AR-Fab y  $\beta_2$ AR-T4L unidos a diferentes agonistas no produjeron cristales de calidad suficiente para la determinación estructural.

30 Por lo tanto, se intentó cristalizar  $\beta_2$ AR-T4L y  $\beta_2$ AR unido a agonista en el complejo con Nb80. Aunque se obtuvieron cristales de ambos complejos en bicelas lipídicas y fase cúbica lipídica (LCP), se obtuvo difracción de alta resolución a partir de cristales de  $\beta_2$ AR-T4L-Nb80 que se hicieron crecer en LCP. Estos cristales se hicieron crecer a pH 8,0 en PEG400 al 39-44 %, Tris 100 mM, DMSO al 4 % y 1,2,3-heptanotriol al 1 %.

#### Ejemplo 10. Nb80 contribuye al empaquetamiento de $\beta_2$ AR en una red cristalina.

35 Se obtuvo difracción de alta resolución a partir de cristales de  $\beta_2$ AR-T4L-Nb80 que se hicieron crecer en LCP. Estos cristales se hicieron crecer a pH 8,0 en PEG400 al 39-44 %, Tris 100 mM, DMSO al 4 % y 1,2,3-heptanotriol al 1 %.

40 Se obtuvo un conjunto de datos combinados establecidos a 3,5 Å a partir de 23 cristales (tabla 5). La estructura se resolvió mediante reemplazo molecular usando la estructura de  $\beta_2$ AR unido a carazolol y un nanocuerpo como modelos de búsqueda. La figura 7 muestra el empaquetamiento del complejo  $\beta_2$ AR-T4L-Nb80 en la red cristalina. Nb80 se une al extremo citoplásmico del  $\beta_2$ AR, con el bucle de la tercera región determinante de la complementariedad (CDR) que se proyecta hacia el núcleo del receptor. Los complejos  $\beta_2$ AR-nanocuerpo se disponen con las bicapas lipídicas aproximadamente paralelas al plano *bc* del cristal. Dos moléculas de nanocuerpo relacionadas con simetría interaccionan dos veces a lo largo del eje *a* para generar una red estrechamente empaquetada en esta dirección. En la bicapa, las moléculas de receptor interaccionan en una disposición antiparalela con TM1,2,3 y 4 de una molécula de  $\beta_2$ AR que se empaqueta frente a TM4 y 5 de la molécula adyacente. También se realizan contactos entre la hélice 8 y TM5 del vecino de la red paralelo a lo largo del eje *b*, y entre la porción extracelular de TM1 y el extremo citoplásmico de TM6 de un tercer vecino antiparalelo. El empaquetamiento es más débil a lo largo del eje *c*, que se puede deber en parte a las interacciones no específicas del T4L con moléculas de receptor y/o nanocuerpo vecinas. No existe densidad de electrones interpretable para el T4L, pero dados los extremos visibles de TM5 y TM6, la posición de T4L está altamente limitada. Presumiblemente T4L adopta un número de orientaciones con respecto al receptor, y tal vez una gama de conformaciones internas debido a su movimiento de bisagra (Zhang *et al.* 1995), que promedia su densidad. No obstante, T4L probablemente contribuye a la estructura del cristal puesto que no se han podido producir cristales del complejo  $\beta_2$ AR-nanocuerpo natural en estas condiciones, aunque es posible que el bucle flexible que conecta TM5 y TM6 en el receptor natural prevenga la formación de la red.

#### Ejemplo 11. Estructura de un estado activo estabilizado con nanocuerpo de $\beta_2$ AR.

La figura 8 compara la estructura de  $\beta_2$ AR inactiva (de la estructura  $\beta_2$ AR-T4L unida a carazolol) con el estado activo de  $\beta_2$ AR. Las mayores diferencias se encuentran en la cara citoplásmica del receptor, con el desplazamiento hacia el exterior de TM5 y TM6 y un movimiento hacia el interior de TM7 y TM3 en el complejo  $\beta_2$ AR-T4L-Nb80

respecto a la estructura inactiva (figura 8A, B). Existen cambios relativamente pequeños en la superficie extracelular (fig. 8C). El segundo bucle intracelular (ICL2) entre TM3 y TM4 adopta una hélice alfa de dos vueltas, similar a la observada en la estructura  $\beta$ 1AR de pavo (Warne *et al.* 2008). La ausencia de esta hélice en la estructura de  $\beta$ 2AR inactivo puede reflejar los contactos de la red cristalina que implican ICL2.

5 La figura 9A-C muestra con mayor detalle la interacción de Nb80 con el lado citoplásmico del  $\beta$ 2AR. Una secuencia de ocho aminoácidos de CDR 3 penetra en un hueco hidrófobo formado por los aminoácidos de segmentos TM 3, 5, 6 y 7. Una secuencia de cuatro aminoácidos de CDR1 proporciona interacciones estabilizantes adicionales con extremos citoplásmicos de segmentos TM 5 y 6. La figura 9D compara la superficie citoplásmica de conformaciones activas e inactivas del  $\beta$ 2AR. CDR3 ocupa una posición similar a la del péptido carboxiterminal de la transducina en opsina (Scheerer *et al.* 2008) (fig. 10). La mayoría de las interacciones entre Nb80 y el AR  $\beta$ 2 están mediadas por los contactos hidrófobos.

Al comparar las estructuras activas e inactivas, el cambio más grande se observa en TM6, con un movimiento de 11,4Å de la hélice en Glu2686,30 (parte del cierre iónico) (los superíndices en esta forma indican la numeración de Ballesteros-Weinstein de residuos de GPCR conservados (Ballesteros y Weinstein 1995) (fig. 9D). Este gran cambio se efectúa mediante un pequeño giro a la derecha de TM6 en el turno anterior a la Pro2886,50 conservada, permitido por el enlace de hidrógeno del esqueleto interrumpido en la prolina y reempaquetamiento de Phe2826,44 (véase a continuación), que gira la hélice hacia el exterior.

Los cambios en el  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80 activo con relación a  $\beta$ 2AR-T4L unido a carazolol inactivo son notablemente similares a los observados entre rodopsina y opsina (Scheerer *et al.* 2008; Park *et al.* 2008) (fig. 9E, fig. 10). El puente salino en el cierre iónico entre Arg1313,50 altamente conservada y Asp/Glu1303,49 se rompe. En la opsina, Arg1353,50 interacciona con Tyr2235,58 en TM5 y un carbonilo del esqueleto del péptido transducina. Arg1313,50 de  $\beta$ 2AR interacciona asimismo con un carbonilo del esqueleto de CDR3 de Nb80. Sin embargo, Nb80 se opone a una interacción entre Arg1313,50 y Tyr2195,58, a pesar de que la tirosina ocupa una posición similar en la opsina y la conformación activa de  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80. Al igual que en la opsina, Tyr326 7,53 de la secuencia NPxxY altamente conservada se mueve en el espacio ocupado por TM6 en el estado inactivo. En  $\beta$ 2AR-T4L unido a carazolol inactivo se observó una red de interacciones de enlaces de hidrógeno que implican aminoácidos altamente conservados en las TM 1, 2, 6 y 7 y varias moléculas de agua (Rosenbaum *et al.* 2007). Mientras que la resolución del  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80 es inadecuada para detectar aguas, es evidente que los cambios estructurales que se observan alterarían sustancialmente esta red.

En contraste con los cambios relativamente grandes observados en los dominios citoplásmicos de  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80, los cambios en el hueco de unión al agonista son bastante sutiles. Trp6,48 está altamente conservada en los GPCR de familia A, y se ha propuesto que su estado rotámero desempeña un papel en la activación de GPCR (conmutador de rotámeros) (Shi *et al.* 2002). No se observa ningún cambio en el rotámero cadena lateral de Trp2866,48 en TM6, que se encuentra cerca de la base del hueco de unión a ligando, aunque su posición se desplaza ligeramente debido a reordenamientos de residuos cercanos Ile1213,40 y Phe2826,44. Aunque existen pruebas espectroscópicas de cambios en el entorno de Trp6,48 tras la activación de la rodopsina (Ahuja *et al.* 2009), no se observa un cambio de rotámero en las estructuras cristalinas de la rodopsina y opsina a bajo pH. Por otra parte, recientes experimentos de mutagénesis en el receptor de histamina demuestran que Trp6,48 no se requiere para la activación del receptor 5HT4 por la serotonina (Pellissier *et al.* 2009).

Es interesante especular cómo los pequeños cambios alrededor del hueco de unión al agonista se acoplan a cambios estructurales mucho más grandes en las regiones citoplásmicas de TM 5, 6 y 7 que facilitan la unión de Nb80 y Gs. Un enlace conformacional potencial se muestra en la figura 11. Las interacciones agonistas pueden estabilizar una conformación de receptor activo que incluye un movimiento hacia dentro de 2,1 Å de TM5 en la posición 2075,46 y un movimiento hacia dentro de 1,4 Å de Pro2115,50 conservada respecto a la estructura inactiva. En el estado inactivo, las posiciones relativas de TM5, TM3, TM6 y TM7 se estabilizan por interacciones entre Pro2115,50, Ile1213,40, Phe2826,44 y Asn3187,45. La posición de Pro2115,55 observada en el estado activo es incompatible con esta red de interacciones, e Ile1213,40 y Phe2826,44 se vuelven a colocar, con una rotación de TM6 alrededor de Phe2826,44 lo que da lugar a un movimiento hacia fuera del extremo citoplásmico de TM6.

Aunque algunos de los cambios estructurales observados en los dominios citoplásmicos del complejo  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80 surgen de interacciones específicas con Nb80, el hecho de que Nb80 y Gs inducen o estabilizan cambios estructurales similares en el  $\beta$ 2AR, como se determina por espectroscopia de fluorescencia y por afinidad de unión al agonista, sugiere que Nb80 y Gs reconocen conformaciones estabilizadas de agonistas similares. La observación de que los dominios citoplásmicos de rodopsina y el  $\beta$ 2AR sufren cambios estructurales similares tras la activación proporciona un apoyo adicional a que el  $\beta$ 2AR-T4L-Nb80 unido a agonista representa una conformación activa y es consistente con un mecanismo conservado de activación de la proteína G.

Sin embargo, el mecanismo por el que los agonistas inducen o estabilizan estos cambios conformacionales probablemente difiere para diferentes ligandos y para diferentes GPCR. Los equilibrios conformacionales de rodopsina y  $\beta$ 2AR difieren, como se muestra por el hecho de que la rodopsina puede adoptar una conformación totalmente activa en ausencia de una proteína G mientras que  $\beta$ 2AR no puede. Por tanto, las energías de activación y el muestreo conformacional pueden diferir entre los diferentes GPCR, lo que probablemente da lugar a la variedad

de eficacias de ligandos presentadas por estos receptores. Un agonista solo tiene que interrumpir una interacción intramolecular clave necesaria para estabilizar el estado inactivo, ya que la actividad constitutiva del receptor puede resultar de mutaciones individuales de aminoácidos de diferentes regiones de GPCR (Parnot *et al.* 2002). Por tanto, la interrupción de estas interacciones estabilizantes por agonistas o bien por mutaciones reduce la barrera energética que separa los estados inactivo y activo e incrementa la probabilidad de que un receptor pueda interactuar con una proteína G.

En conclusión, estos resultados anteriores demuestran la capacidad para generar nanocuerpos que reconocen y estabilizan un estado unido a agonista de un GPCR. En el caso del  $\beta_2$ AR, este estado estabilizado de nanocuerpo es funcionalmente similar al estado estabilizado por la proteína G Gs. Finalmente, los nanocuerpos facilitaron la formación de cristales de calidad de difracción. Este enfoque se aplica ahora a otros GPCR y otras proteínas de membrana.

#### Ejemplo 12. Nb80 estabiliza la conformación de estado activo de los miembros de la familia de receptores adrenérgicos

Se pueden usar nanocuerpos de estabilización del estado activo que son reactivos de forma cruzada con receptores relacionados como una herramienta para estabilizar un estado conformacional de estos receptores relacionados. Para demostrar este principio, se analizó si Nb80 se une selectivamente a la conformación activa del receptor de  $\beta_1$ AR humano.  $\beta_1$ AR y  $\beta_2$ AR son receptores adrenérgicos relacionados estrechamente. Usando el servidor PISA (Krissinel y Henrick, 2007) y en base a la estructura cristalina del complejo de Nb80- $\beta_2$ AR, se identificaron 30 residuos AA  $\beta_2$ AR que interactúan con Nb80 en la interfaz  $\beta_2$ AR-Nb80. Una alineación de secuencias de aminoácidos (figura 17) indica que 28 de estos 30 residuos implicados en la interacción de Nb80 se conservan entre  $\beta_1$ AR y  $\beta_2$ AR. Los residuos de interfaz restantes son lisinas en  $\beta_2$ AR y se han sustituido con argininas en  $\beta_1$ AR correspondientes a sustituciones conservadas (mostrado en cuadros grises en la figura 17). Por tanto, parece que ambos receptores comparten un sitio de unión muy similar para Nb80. Basándose en este análisis, también se midió el efecto de Nb80 sobre la afinidad de  $\beta_1$ AR para el agonista isoproterenol y el agonista inverso CGP20712A (figura 18). Al igual que para  $\beta_2$ AR, Nb80 también indujo un incremento en la afinidad de isoproterenol por  $\beta_1$ AR (figura 18, paneles A y C). Nb80 no cambia la afinidad por el antagonista CGP20712A (figura 18, panel D), lo que demuestra la estabilización selectiva de la conformación de estado activo de  $\beta_1$ AR por Nb80. No se observó dicho efecto de Nb80 sobre los receptores no relacionados, como el receptor D1 de dopamina (datos no mostrados).

#### Ejemplo 13. Los nanocuerpos de estabilización del estado activo de $\beta_2$ AR son herramientas excelentes para la mejora del cribado de agonistas.

Muchos GPCR presentan una mayor afinidad de unión al agonista cuando se complejan con la proteína G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre receptor ocupado por agonista y la proteína G. Los nanocuerpos con comportamiento similar a proteína G probablemente potencian la afinidad de  $\beta_2$ AR por los agonistas (véase el ejemplo 6). Este comportamiento puede tener implicaciones importantes en el descubrimiento de nuevos agonistas. Por ejemplo, los Nb con comportamiento similar a proteína G pueden incrementar la afinidad aparente de los GPCR por los agonistas, en comparación con los antagonistas. Esto puede provocar un sesgo hacia los agonistas entre los resultados positivos cuando una colección de compuestos se criba frente a dicho complejo GPCR-Nb. Para evaluar la aplicabilidad de este enfoque, se analizó el efecto del nanocuerpo Nb80 de estabilización del estado activo de  $\beta_2$ AR sobre la interacción de  $\beta_2$ AR con varios ligandos de  $\beta_2$ AR bien conocidos en experimentos de unión a radioligando por competición (véase materiales y procedimientos). Se sometieron a prueba diez agonistas y cinco antagonistas: (-)isoproterenol HCl (agonista), (-)-alprenolol (antagonista), salbutamol (agonista parcial), ICI118551 (agonista inverso), carvedilol (antagonista), CGP12177A (antagonista), xinafoato de salmeterol (agonista completo), sal de hemisulfato de terbutalina (agonista parcial), clorhidrato de dobutamina (agonista parcial), sal de hemisulfato de metaproterenol (agonista), clorhidrato de procaterol (agonista), clorhidrato de ritodrina (agonista), bromhidrato de fenoterol (agonista completo), fumarato de formoterol dihidratado (agonista) y sal de maleato de timolol (antagonista), todos adquiridos por medio de Sigma Aldrich.

Se realizaron experimentos de unión por competición a ligando en presencia y ausencia de 500 nM de Nb80 en membranas comerciales que contienen  $\beta_2$ AR de humano de longitud completa. Se usó 3H-dihidroalprenolol (DHA) como radioligando competidor. Los ejemplos representativos de experimentos de unión por competición a ligando se muestran en la figura 16. Para todos los compuestos, se obtuvieron los valores de CI50 en presencia de exceso de Nb80 y se compararon con los obtenidos de CI50 en presencia de un nanocuerpo irrelevante (control negativo). (Tabla 6). De acuerdo con los ejemplos 6, 8 y 12, se observó un incremento en la potencia para todos los agonistas cuando  $\beta_2$ AR está en complejo con Nb80. Dicho efecto no se observa para los antagonistas o agonistas inversos.

#### Ejemplo 14. Cribado de la colección de compuestos usando un nanocuerpo de estabilización del estado activo de $\beta_2$ AR.

El bloqueo del GPCR en una conformación particular tiene una ventaja sobre el uso de una diana no conformacionalmente estabilizada (que representa un repertorio de conformaciones) en el ensayo de cribado con el objetivo de identificar los compuestos frente a esa conformación particular, la denominada conformación diana 'quimiomodulable'. El Nb80 selectivo conformacional permite el uso de receptores naturales minimizando en

consecuencia el riesgo potencial de cambios conformacionales artificiales como resultado de mutagénesis dirigida a sitio.

5 Con el fin de demostrar si Nb80 facilita la identificación de ligandos que se unen selectivamente a  $\beta$ 2AR en su conformación activa, se criba una colección de fragmentos que consiste en aproximadamente 1500 distintos  
 10 compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) para detectar agonistas usando un ensayo de unión a radioligando por competición. Para este ensayo, las membranas que contienen  $\beta$ 2AR de longitud completa se preincuban con Nb80 o un Nb irrelevante (control negativo) y se añaden a placas de 96 pocillos que contienen compuestos de la colección y 2 nM de radioligando 3H-dihidroalprenolol (DHA) (véase materiales y procedimientos). Los compuestos de la colección que desplazan significativamente el radioligando en la muestra que contiene  $\beta$ 2AR en complejo con  
 15 Nb80 en comparación con la muestra que contiene el nanocuerpo irrelevante son compuestos que se unen preferentemente a la conformación activa del receptor. Los compuestos de la colección que se unen selectivamente a la conformación activa del receptor tienen una alta propensión a comportarse como agonistas porque la estabilización ortostérica o alostérica de la conformación activa del GPCR provoca respuestas biológicas. Los compuestos de la colección seleccionados se tienen que cribar adicionalmente para detectar el agonismo midiendo, por ejemplo, mediante el acoplamiento a proteína G, eventos de señalización en dirección 3' o rendimiento fisiológico.

#### Ejemplo 15: Termoestabilización del receptor $\beta$ 2AR con nanocuerpos.

20 Los estudios estructurales y funcionales sobre proteínas de membrana se han visto obstaculizados desde hace tiempo por su inestabilidad en detergente. Aunque parece que los procedimientos de expresión y purificación permiten la generación de cantidades en miligramos, lograr la estabilidad con estas moléculas es tal vez el obstáculo más difícil de superar. La purificación necesita una liberación de la proteína de membrana de la bicapa lipídica mediante solubilización en detergente, un procedimiento durante el que las superficies hidrófobas de la proteína se recubren con monómeros de tensioactivo para formar un complejo proteína-detergente. Sin embargo, la cinta de detergente formada alrededor de la proteína es un mal reemplazo para la bicapa lipídica. De esta manera, a menudo  
 25 la solubilización de las proteínas de membrana da como resultado la desestabilización, desplegamiento y agregación posterior. La termoestabilización de proteínas de membrana se puede lograr a través de mutagénesis dirigida a sitio (Zhou y Bowie, 2000; Magnini *et al.*, 2008). Aquí se muestra que la unión de nanocuerpos selectivos conformacionales representa una alternativa innovadora para la termoestabilización de GPCR solubilizados con detergente.

30 Se analizó el efecto de los nanocuerpos selectivos conformacionales sobre la termoestabilidad y la posterior agregación del receptor  $\beta$ 2AR usando un ensayo de estabilidad térmica fluorescente (fig 13) y cromatografía de exclusión por tamaño (fig 14). Para estos experimentos, se expresó el  $\beta$ 2AR recombinante en células de insecto Sf9, se solubilizó en dodecilmaltósido al 1 %, NaCl 100 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, e inhibidores de la proteasa, y se purificó por cromatografía de afinidad FLAG-M1 (véase Material en Procedimientos a los Ejemplos).

35 El ensayo de estabilidad térmica fluorescente hace uso del fluorocromo específico de tiol N-[4-(7-dietilamino-4-metil-3-cumarinilo)fenil]maleimida (CPM) para medir la reactividad química de las cisteínas naturales incrustadas en la proteína interior como un sensor para la integridad global del estado plegado de proteínas de membrana (Alexandrov *et al.*, 2008). Para el ensayo de estabilidad térmica fluorescente, se preincubó receptor solubilizado en detergente (en dodecilmaltósido al 0,1 %, NaCl 100 mM y Hepes 20 mM pH 7,5) con isoproterenol (10 mM) en presencia o ausencia de un exceso molar 2:1 de Nb80 durante 1 hora a TA. A continuación, se mezclaron las muestras con fluoróforo CPM y se incubaron durante 2 min a temperaturas que varían desde 10 °C a 94 °C y se recogió la emisión de fluorescencia. Se realizaron experimentos por triplicado y dieron como resultado curvas de fusión que se asemejan a los perfiles de estabilidad obtenidos para el GPCR APJ (Alexandrov *et al.*, 2008). Las transiciones de desplegamiento se podrían describir por un modelo simple de dos estados, incluyendo el estado natural (plegado) y el estado desnaturalizado, que representan las mesetas inferior y superior de las curvas de fusión. La comparación de la curva de fusión del receptor unido a agonista con la curva de fusión del receptor unido a agonista en complejo con Nb80 indica que el nanocuerpo estabiliza la conformación activa de  $\beta$ 2AR incrementando la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del receptor unido a agonista en 12 °C.

50 También se analizó el efecto de Nb80 sobre el desplegamiento térmico y la agregación del receptor unido a agonista mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para este experimento, se preincubó el receptor solubilizado en dodecilmaltósido con isoproterenol (10  $\mu$ M) en presencia o ausencia de un exceso molar 2:1 de Nb80 durante 45 minutos a TA. A continuación, se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperaturas crecientes y posteriormente se analizaron mediante SEC (figura 14). La comparación de los diferentes cromatogramas indica que Nb80 protege el receptor unido a agonista frente a la agregación inducida por temperatura.

#### **Dominios de unión a proteína de estabilización de estados conformacionales funcionales del receptor de tipo 1a de la angiotensina II de rata (AT1aR)**

#### Ejemplo 16. Inmunización, construcción de la colección y cribado inicial

Para obtener nanocuerpos madurados *in vivo* frente a rata AT1aR, se inmunizaron dos llamas (*Llama glama*) con una fusión recombinante AT1aR-T4lisozima (T4L) truncada después de Lys318 para excluir una respuesta inmunitaria en el extremo terminal carboxilo. Se expresó AT1aR en células de insecto (Shluka *et al.* 2006) y se reconstituyó el antígeno en vesículas lipídicas como se describe previamente (Day *et al.* 2007). Se inmunizó una llama con receptor unido a angiotensina (agonista no sesgado), se inmunizó una llama con el ligando sesgado con  $\beta$ -arrestina TRV023 (Violin *et al.* 2010) unido al receptor. Después de seis administraciones semanales del receptor unido a agonista truncado reconstituido, se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó una colección de fagos y se cribó como se describe en Materiales y procedimientos para los Ejemplos. ELISA en fase sólida identificaron los nanocuerpos que reconocen el receptor AT1a.

#### 10 Ejemplo 17. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales por ELISA

En un primer cribado se compara la unión de los nanocuerpos purificados en el antígeno AT1aR de rata natural y desnaturalizado con calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, se recubre un pocillo con receptor. A continuación, se incuba esta placa a 80 °C durante 2 horas. A continuación, se recubre otro pocillo vacío de la misma placa con receptor sin calentamiento. Los nanocuerpos que se pueden unir selectivamente al receptor nativo, pero no al receptor inactivado con calor reconocen los epítotos conformacionales.

#### 15 Ejemplo 18. Selección de nanocuerpos específicos de estado conformacional por inmunotransferencia por puntos

En un cribado posterior, se compara la unión de los nanocuerpos que unen epítotos conformacionales a un receptor AT1aR unido a agonista frente a un receptor unido a antagonista por análisis de inmunotransferencia por puntos. Este cribado identifica los nanocuerpos que reconocen selectivamente una conformación de un (estado activo) unido a agonista frente al receptor (estado inactivo) unido a antagonista.

#### 20 Ejemplo 19. Cribado para los nanocuerpos AT1aR que estabilizan selectivamente una conformación activa del receptor.

Además del ensayo de unión para determinar la especificidad la AT1aR (ELISA), se evalúan nanocuerpos purificados en un experimento de competición con radioligando similar a los ensayos de radioligandos descritos en los ejemplos 6,12 y 13. Se considera que los nanocuerpos que incrementan la afinidad de AT1aR para un agonista estabilizan una conformación activa del receptor.

#### 25 **Dominios de unión a proteína que estabilizan estados conformacionales funcionales del receptor muscarínico M3 de rata**

##### Ejemplo 20. Inmunización, construcción de la colección y cribado inicial.

Para obtener nanocuerpos madurados *in vivo* frente a M3R de rata, se inmunizó una llama (*Llama glama*) con una fusión recombinante M3R-T4lisozima (M3R-T4L) truncada en ambos sitios N y C terminales para excluir una respuesta inmunitaria en los extremos terminales. En M3R-T4L, el 3° bucle intracelular se reemplazó por T4lisozima. M3R-T4L se expresó en células de insecto y el antígeno se reconstituyó como se describe previamente (Day *et al.* 2007). Después de seis administraciones semanales del receptor unido a antagonista (tiotropio) reconstituido, se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó una colección de fagos y se cribó como se describe en Materiales y procedimientos para los Ejemplos.

##### Ejemplo 21. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales por ELISA

En un primer cribado se compara la unión de los nanocuerpos purificados en el antígeno M3R de rata natural y desnaturalizado con calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, se recubre un pocillo con receptor. A continuación, se incuba esta placa a 80 °C durante 2 horas. A continuación, se recubre otro pocillo vacío de la misma placa con receptor sin calentamiento. Los nanocuerpos que se pueden unir selectivamente al receptor nativo, pero no al receptor inactivado con calor reconocen los epítotos conformacionales.

##### Ejemplo 22. Selección de nanocuerpos específicos de estado conformacional por inmunotransferencia por puntos

En un cribado posterior, se compara la unión de los nanocuerpos que unen epítotos conformacionales a un receptor M3 unido a agonista frente a un receptor unido a antagonista por análisis de inmunotransferencia por puntos. Este cribado identifica los nanocuerpos que reconocen selectivamente una conformación de un (estado activo) unido a agonista frente al receptor (estado inactivo) unido a antagonista.

##### Ejemplo 23. Cribado para los nanocuerpos M3R que estabilizan selectivamente una conformación activa del receptor.

Además del ensayo de unión para determinar la especificidad la M3R (ELISA), se evalúan nanocuerpos purificados en un experimento de competición con radioligando similar a los ensayos de radioligandos descritos en los ejemplos 6,12 y 13. Se considera que los nanocuerpos que incrementan la afinidad de M3R para un agonista estabilizan una conformación activa del receptor.

Materiales y procedimientos para los ejemplos*Preparación de  $\beta$ 2AR*

Se expresó el  $\beta$ 2AR truncado después del aminoácido 365 ( $\beta$ 2AR-365) que tiene una marca de epítipo Flag amino terminal en células de insecto Sf9 y se purificó por anticuerpo secuencial M1 y cromatografía de afinidad de alprenolol como se describe previamente (Kobilka 1995). Se inmovilizó el  $\beta$ 2AR-365 purificado en una columna de Flag (Sigma) y se equilibró con 10 volúmenes de columna de una mezcla de 5 mg/ml de DOPC (Avanti Polar Lipids) y 0,5 mg/ml de lípido A (Sigma) en octilglucósido al 1 % (p/v) (Anatrace), NaCl 100 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y agonista 1  $\mu$ M (por ejemplo, isoproterenol). A continuación, se eluyó el  $\beta$ 2AR en el mismo tampón que contiene EDTA. Se ajustó la concentración del  $\beta$ 2AR a 5 mg/ml. Esto implicó normalmente diluir la proteína con el mismo tampón, pero en ocasiones requirió concentrar la proteína hasta dos veces con una celda de ultrafiltración Amicon (100 kDa de poro). A continuación, se dializó la proteína frente a solución salina tamponada con fosfato que contiene agonista 1  $\mu$ M a 4°C para eliminar el detergente. Se almacenó la proteína reconstituida a -80 °C antes de su uso para inmunización.

*Preparación de AT1aR*

Se truncó el AT1aR con la fusión T4lisozima en el tercer bucle después del aminoácido 318 (AT1aR-318). Esta construcción tiene una marca de epítipo Flag amino terminal y una etiqueta C terminal de 10 histidinas. Se expresó AT1aR-318 en células de insecto Tni y se solubilizó en Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 1 M y MNG al 0,5 % durante 2 h a temperatura ambiente. Se purificó el receptor por cromatografía de afinidad con anticuerpo Ni-NTA y FLAG-M1 secuencial. Se reconstituyó el AT1aR purificado en una mezcla de 5 mg/ml de DOPC (Avanti Polar Lipids) y 0,5 mg/ml de lípido A (Sigma) en octilglucósido al 1 % (p/v) (Anatrace), NaCl 100 mM, Hepes 20 mM pH 7,5 y agonista 100  $\mu$ M (por ejemplo, angiotensina II). Se ajustó la concentración del AT1aR eluido a 1-2 mg/ml. A continuación, se dializó la proteína frente a solución salina tamponada con fosfato que contiene agonista 100  $\mu$ M a 4°C para eliminar el detergente. Se almacenó la proteína reconstituida a -80 °C antes de su uso para inmunización.

*Preparación del receptor M3*

Se expresó el receptor muscarínico M3 con una marca de epítipo FLAG amino terminal y una marca de hexahistidina carboxiterminal en células de insecto Sf9 en presencia de atropina 1 $\mu$ M (Vasudevan *et al.* 1995). Receptor tenía el bucle intracelular 3 eliminado (M3R $\Delta$ i3) o bien sustituido con T4 lisozima (M3R-T4L). Se centrifugaron las células y después se lisaron mediante choque osmótico, y se solubilizó la proteína en dodecilmaltósido al 1 %, hemisuccinato de colesterol al 0,1 %, cloruro de sodio 750 mM, HEPES 20 mM pH 7,5. A continuación, se purificó el receptor solubilizado por cromatografía de afinidad con níquel, seguido de cromatografía de afinidad FLAG. A continuación, se separó la proteína purificada por cromatografía de exclusión por tamaño para seleccionar el receptor monomérico, que se reconstituyó como se describe (Day *et al.* 2007).

*Selección de nanocuerpo frente a  $\beta$ 2AR*

Una sola llama recibió seis administraciones semanales del  $\beta$ 2AR truncado reconstituido. Se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó el ARN total a partir de estas células. Se amplificaron las secuencias de codificación del repertorio de nanocuerpos mediante una RT-PCR y se clonaron en el vector de presentación de fagos pMES4 (GenBank GQ907248) (Conrath *et al.* 2001). Se enriquecieron los fagos específicos de  $\beta$ 2AR por selección *in vitro* sobre placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) recubiertas con el receptor  $\beta$ 2AR-365 reconstituido. Se recuperaron los fagos unidos a antígeno de los pocillos recubiertos de antígeno, con trietilamina pH 11 y neutralizados con Tris-HCl pH 7 o bien por la adición de células de *E. coli* TG1 de recién cultivadas. Después de dos ciclos de biofijación, se seleccionaron aleatoriamente 96 colonias individuales y se redujeron los nanocuerpos como proteína marcada con His soluble en el periplasma de las células TG1. Los ELISA en fase sólida identificaron 16 nanocuerpos conformacionales diferentes que reconocen el  $\beta$ 2AR-365 unido a agonista natural, pero no el receptor desnaturalizado con calor.

*Selección de nanocuerpos frente a AT1aR*

Una única llama recibió seis administraciones semanales del AT1aR-318 reconstituido unido a su agonista angiotensina. Otra única llama recibió seis administraciones semanales de AT1aR-318 unido a un agonista sesgado TRV023.

Después de la inmunización, se aislaron los linfocitos de cada llama por separado de la sangre. Se preparó el ARN total a partir de estas células. De cada muestra, se amplificaron las secuencias codificantes del repertorio de nanocuerpos por RT-PCR y se clonaron por separado (Conrath *et al.* 2001) en el vector de presentación en fagos pMESy4-vector para generar dos colecciones independientes. pMESy4 es un derivado de pMES4 (GenBank GQ907248) que lleva una His6tag C terminal seguido de los aminoácidos EPEA (De Genst *et al.* 2010). *J. Mol. Biol.* 402: 326-343.

Se enriqueció el fago específico de AT1aR por selección *in vitro* en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) recubiertas con el receptor AT1aR truncado reconstituido (una variante del receptor recombinante sin la inserción

T4L) unido a la angiotensina o a TRV023, respectivamente. Se recuperó el fago unido a antígeno de los pocillos recubiertos con antígeno por digestión con tripsina. Después de dos ciclos de biofijación, se seleccionaron aleatoriamente 92 colonias individuales (46 en AT1aR-angiotensina y 46 en AT1aR-TRV023) y se produjeron los nanocuerpos como una proteína marcada con HisS-EPEA en el periplasma de las células TG1.

#### 5 Selección de nanocuerpos frente a M3R

Una sola llama recibió seis administraciones semanales de M3R-T4L truncado reconstituido unido al antagonista tiotropio. Después de la inmunización, se aislaron los linfocitos de esta llama de la sangre y se preparó el ARN total a partir de estas células. Se amplificaron las secuencias codificantes del repertorio de nanocuerpos por RT-PCR y se clonaron (Conrath *et al.* 2,001) en el vector de presentación en fagos pMESy4-vector.

- 10 Para enriquecer los fagos específicos de M3R diferentes, se siguieron diferentes estrategias de selección SB-carbenicilina *in vitro* usando diferentes formatos del antígeno en presencia del agonista carbacol o del antagonista bencilato de quinuclidinilo (QNB). Los formatos de antígeno incluyen partículas similares a virus (VLP) que llevan el receptor M3RΔi3 de rata (es decir, el receptor M3 con una delección en el 3º bucle intracelular), membranas de células CHO humanas que contienen M3R (Perkin Elmer), M3R-T4L reconstituido recombinante, o M3RΔi3
- 15 reconstituido recombinante. Opcionalmente, se capturaron VLP que llevan el receptor M3RΔi3 de rata o las membranas de M3R humanas por aglutinina de germen de trigo recubierta en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc). Se recuperó el fago unido a antígeno de los pocillos recubiertos con antígeno por una digestión con tripsina. De forma alternativa, se eluye el fago seleccionado en el antígeno unido a agonista usando un exceso de antagonista o viceversa.
- 20 Después de dos ciclos de biofijación, se seleccionaron aleatoriamente 180 colonias y se produjeron los nanocuerpos como proteína marcada con His-EPEA soluble en el periplasma de las células TG1. Un ELISA en fase sólida comparativo sobre el receptor M3R-T4L frente al receptor de AT1aR-T4L dio como resultado 66 nanocuerpos específicos de M3R.

#### Purificación de nanocuerpos para caracterización bioquímica

- 25 Se expresaron los nanocuerpos marcados con HIS o marcados con His-EPEA en células de *E. coli* WK6. Los extractos periplásmicos se sometieron a cromatografía de afinidad metálica en Sepharose de flujo rápido con sulfato de níquel (II) sulfato (GE Healthcare). Se dializaron fracciones de proteína IMAC durante la noche en MES 100 mM pH 6,5, tampón de NaCl 100 mM. Se purificaron adicionalmente nanocuerpos dializados mediante cromatografía de intercambio catiónico (ÄKTA FPLC con columna Mono S 10/100 GL).
- 30 *Cromatografía de exclusión por tamaño*
- Se identificaron nanocuerpos selectivos de agonistas por cromatografía de exclusión por tamaño después de la incubación de agonista 20 μM o agonista inverso (carazolol) unido a β2AR-365N durante 1 hora a TA en ausencia o presencia de nanocuerpo 40 μM. Se realizó la cromatografía en DDM al 0,1 %, HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM en presencia de 1 μM de los respectivos ligandos usando una FPLC ÄKTA con columna Superdex 200 10/300 GL.

#### 35 Unión a ligando en el receptor β2AR truncado en preparaciones de membrana de células de insecto.

- Se realizaron experimentos de unión por competición en β2AR-365 expresado en membranas celulares de insecto Sf9 en ausencia o presencia de nanocuerpo 1 μM durante 90 min a TA en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05 %, y GTPγS 10 mM) que contiene [3H]-dihidroalprenolol 0,5 nM e (-)-isoproterenol a concentraciones que varían de 10<sup>-11</sup> M a 10<sup>-4</sup> M. Se separó el radioligando unido del no unido sobre filtros Whatman GF/B usando un dispositivo recolector Brandel. Los datos son la media ± DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

#### Fluorescencia con bimano.

- Se hizo reaccionar β2AR purificado con un equivalente 1:1 de monobromobimano (mBBr, Invitrogen) en NaCl 100 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5, dodecilmaltósido al 0,1 % y se incubó durante la noche en hielo en la oscuridad. Se purificó el receptor marcado con fluoróforo justo antes de su uso por filtración en gel en una columna de desalación equilibrada con el mismo tampón. Se realizaron experimentos de espectroscopia de fluorescencia en un espectrofluorómetro Spex FluoroMax-3 (Jobin Yvon Inc, NJ) con el modo de recuento de fotones usando un paso de banda de excitación y emisión de 4 nm. Se realizaron todos los experimentos a 25 °C. Para los análisis de emisión, se fijó la excitación a 370 nm y se midió la emisión a partir de 430-530 nm con un tiempo de integración de 1 s/nm.
- 50 Para determinar el efecto de los nanocuerpos y ligandos, se incubaron tres muestras individuales de proteínas marcadas con nanocuerpo 1 μM o isoproterenol 10 μM o ambos. Se tomaron los espectros de emisión de las muestras después de 1 hora de incubación. Se corrigió la intensidad de fluorescencia con la fluorescencia de fondo del tampón y los ligandos en todos los experimentos. Los datos son la media ± DE dos experimentos independientes realizados por triplicado.

#### 55 Preparación de β2AR-T4L y nanocuerpo-80 para cristalografía

- 5  $\beta$ 2AR-T4L se expresó en cultivos celulares de insecto Sf-9 infectados con baculovirus  $\beta$ 2AR-T4L, y se solubilizó de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (Kobilka 1995). Se obtuvo la proteína funcional por cromatografía de afinidad FLAG-M1 (Sigma) antes y después de la cromatografía con alprenolol-Sepharose (Kobilka 1995). En la segunda etapa de cromatografía con M1, se intercambió el alprenolol unido a receptor por un agonista de alta afinidad y se intercambió el dodecilmaltósido por el anfitrión MNG-3 para incrementar la estabilidad del receptor (Chae y Gellman, no publicado). Se eluyó el  $\beta$ 2AR-T4L unido a agonista e intercambiado con detergente en HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MNG-3 al 0,02 %, y agonista 10  $\mu$ M seguido de la eliminación de la glucosilación ligada a N por tratamiento con PNGaseF (NEB). La proteína se concentró hasta ~ 50 mg/ml con un concentrador Vivaspín con peso molecular límite de 100 kDa (Vivascience).
- 10 Se expresó el nanocuerpo-80 (Nb80) que lleva una marca His6 C terminal en el periplasma de la cepa de *E. coli* WK6 después de la inducción con IPTG. Se cultivaron cultivos de 0,6 l a DO600 = 0,7 a 37 °C en medio TB que contiene glucosa al 0,1 %, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Se cultivaron cultivos inducidos durante la noche a 28 °C. Se recogieron las células por centrifugación y se lisaron en tampón helado (Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 12,5 mM, y sacarosa 0,125 M), a continuación, se centrifugó para eliminar los restos celulares. Se purificó el Nb80 por
- 15 cromatografía de afinidad con níquel, se dializó frente a tampón (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM), y se concentró por rotación a ~ 120 mg/ml.

#### Cristalización

- 20 Se mezclaron  $\beta$ 2AR-T4L unido a agonista y el nanocuerpo (por ejemplo, Nb80) en una proporción molar 1:1,2, se incubó 2 horas a TA antes de mezclar con monooleína licuada (M7765, Sigma) que contiene colesterol al 10 % (C8667, Sigma) en una proporción de proteína con respecto a lípido de 1:1,5 (p/p) usando el procedimiento de mezcla de doble jeringuilla desarrollado por Martin Caffrey (Caffrey y Cherezov 2009). Se identificaron pistas de cristalización inicial usando cribas internas y se optimizaron en placas de tipo sándwich de vidrio de 24 pocillos usando gotas de 50 nl de proteína:lípido administradas manualmente y se cubrieron con 0,8  $\mu$ l de solución precipitante en cada pocillo y se sellaron con un cubreobjetos de vidrio. Se hicieron crecer cristales para la recogida
- 25 de datos a 20 °C por difusión de vapor de gota colgante usando 0,8  $\mu$ l de solución de reserva (PEG 400 del 36 al 44 %, Tris 100 mM pH 8,0, DMSO al 4 %, 1 % de 1,2,3-heptanotriol) diluida de 2 a 4 veces en agua Milli-Q. Se hicieron crecer cristales a tamaño completo dentro de 7 a 10 días. Se congelaron rápidamente los cristales y se almacenaron en nitrógeno líquido con solución de reserva como crioprotector.

#### Recogida de datos de microcristalografía y procesamiento

- 30 Se midieron datos de difracción en la línea de haz 23-ID de la Fuente Avanzada de Fotones, usando un haz de diámetro de 10  $\mu$ m. Se usaron imágenes de rotación de 1,0° de dosis baja para localizar y centrar los cristales para la recogida de datos. Se midieron los datos en marcos de 1,0° con tiempos de exposición típicamente de 5-10 s con un haz atenuado 5x. Solo se pudieron medir 5-10° de datos antes de que se produjera un daño por radiación significativo. Se integraron los datos y se escalaron con el paquete HKL2000 (Otwinowski 1997).

#### 35 Solución y refinamiento de la estructura

- Se obtuvieron fases de reemplazo molecular con el programa Phaser (McCoy 2007). Los modelos de búsqueda fueron 1) estructura de  $\beta$ 2AR unido a carazolol de alta resolución, PDB id 2RH1, pero con T4L y todas las moléculas de agua, ligando y lípido eliminadas) y un nanocuerpo (PDB id 3DWT, moléculas de agua eliminadas) como modelos de búsqueda. Las puntuaciones Z de la función de rotación y traslación fueron 8,7 y 9,0 después de la colocación del
- 40 modelo  $\beta$ 2AR, y el modelo de nanocuerpo colocado posteriormente tuvo puntuaciones Z de la función de rotación y traslación de 3,5 y 11,5. Se refinó el modelo en Phenix (Afonine 2005) y Buster (Blanc 2004), usando un modelo de factor B de grupos con una B para átomos de cadena principal y una B para átomos de cadena lateral. Las estadísticas de refinamiento se dan en la tabla 5. A pesar de la fuerte anisotropía (tabla 5), la densidad de electrones era evidente para la colocación de las cadenas laterales.

#### 45 Unión a ligando en el receptor $\beta$ 2AR truncado reconstituido en partículas HDL.

- Se comparó el efecto de Nb80 y Gs sobre receptores de afinidad por agonistas en experimentos de unión por competición. El  $\beta$ 2AR y  $\beta$ 2AR-T4L (ambos truncados en la posición 365) purificados como se describe previamente (Rosenbaum *et al.* 2007; Rasmussen *et al.* 2007) se reconstituyeron en partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) seguido de reconstitución de Gs en partículas de HDL que contienen  $\beta$ 2AR de acuerdo con los
- 50 procedimientos publicados previamente (Whorton *et al.* 2007). Se usó [3H]-dihidroalprenolol (3H-DHA) 0,6 nM como radioligando e (-)-isoproterenol (ISO) en concentraciones que varían de 10-12 a 10-4 M como competidor. Se usó Nb80 a 1  $\mu$ M. Se usó GTP $\gamma$ S a 10  $\mu$ M. Se usó TBS (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) que contiene BSA al 0,1 % como tampón de unión. Se separó 3H-DHA unido del no unido en un dispositivo recolector Brandel pasando sobre un filtro Whatman GF/B (empapado previamente en TBS con polietilenoimina al 0,3 %) y se lavó en TBS frío. Se midió
- 55 la unión a radioligando en un contador de centelleo Beckman LS6000. Se determinó la afinidad de unión a ligando (K<sub>d</sub>) de DHA a partir de curvas de unión de saturación usando el programa informático GraphPad Prism. Se determinaron las afinidades de unión de ISO (valores de K<sub>i</sub> tabulados en la tabla 4) a partir de los valores de CI50 usando la ecuación  $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$

*Unión a ligando en el receptor  $\beta$ 2AR de longitud completa en extractos de membrana de células de insecto para una mejora en la identificación de agonistas.*

Se realizaron experimentos de unión a radioligando por competición en extractos de membrana esencialmente como se describe por Seifert y colaboradores (Seifert *et al.* 1998. Eur. J. Biochem. 255:369-382). Se incubaron diez mg de extractos de membrana homogeneizados de células de insecto que contienen  $\beta$ 2AR humano (Perkin Elmer, n.º cat-6110106400UA) con Nb80 o un nanocuerpo no relacionado (control negativo; Irr Nb) durante 1 hora a 37 °C en tampón de incubación (Tris-HCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM, EDTA 1 mM y BSA al 0,2 % p/v) en placas de 24 pocillos (Corning Costar). Se aplicaron nanocuerpos en una concentración final de 500 nM, correspondiente a un exceso de 3000 veces de nanocuerpo frente al receptor adrenérgico. Posteriormente, se añadió una serie de dilución apropiada del ligando en investigación a los extractos de membrana unida a nanocuerpo junto con 2 nM de radioligando 3HDHA (Perkin Elmer n.º cat. NET720001MC; actividad específica de 104,4 Ci/mmol). Se ajustó el volumen total por pocillo con tampón de incubación a 500  $\mu$ l y se incubó adicionalmente la mezcla de reacción durante otra hora a 37 °C en un baño de agua. Después de cultivar los extractos de membrana con un dispositivo recolector de células (Inotech) sobre filtros de fibra de vidrio (papel de filtro Whatman GF/B), se lavaron los filtros con tampón de lavado helado (Tris-HCl 50 mM pH7,4) y se transfirieron las partes de filtro secadas con aire a tubos de centelleo que contenían 3,5 ml de líquido de centelleo 'Hisafe 2' de Optiphase (Perkin Elmer). Se midió la radioactividad en un contador de centelleo Wallace LKB después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente.

*Cribado de colección de compuestos.*

Se cribó una colección de compuestos para obtener agonistas usando un ensayo de unión a radioligando por competición. Para este propósito, se preincubaron 10 mg de extractos de membrana preparados internamente a partir de células HEK293T que expresan  $\beta$ 2AR humano (nivel de expresión de proteína de membrana de ~10 pmol/mg) con Nb80 o un nanocuerpo no relacionado (control negativo) durante 1 hora a 30 °C en tampón de incubación (Hepes 50 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM y BSA al 0,5 % p/v). Se aplican nanocuerpos en una concentración final de 500 nM, correspondiente aproximadamente a un exceso de 3000 veces de nanocuerpo frente al  $\beta$ 2AR. Posteriormente, se añaden las membranas cargadas con nanocuerpo a placas de 96 pocillos que contienen compuestos de la colección y 2 nM de radioligando 3H-dihidroalprenolol (DHA) Se ajusta el volumen total por pocillo con tampón de incubación a 100  $\mu$ l y se incuba adicionalmente la mezcla de reacción durante otra hora a 30 °C. Posteriormente, se cultiva el radioligando unido a membrana usando una placa de filtro de 96 pocillos de fibra de vidrio GF/B (Perkin Elmer) previamente empapada en polietilenimina al 0,3 %. Se lavan las placas de filtro con tampón de lavado helado (Tris-HCl 50 mM pH 7,4), y se secan durante 30 minutos a 50 °C. Después de añadir 25  $\mu$ l de líquido de centelleo (MicroScint™-O, Perkin Elmer), se mide la radioactividad (cpm) en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux.

*Espectroscopia de fluorescencia con bimanano en  $\beta$ 2AR reconstituido en partículas de HDL.*

Para comparar los efectos sobre la conformación del receptor de Gs y Nb80 que se unen al  $\beta$ 2AR purificado se marcó con la sonda fluorescente ambientalmente sensible monobromo-bimanano (Invitrogen) en la cisteína 265 situada en el extremo citoplásmico de TM6, y se reconstituyó en partículas de HDL (mBB-  $\beta$ 2AR/HDL). Antes de obtener los espectros de emisión de fluorescencia, se incubó MBB- $\beta$ 2AR/HDL 10 nM 30 min a TA en tampón (HEPES pH 20 mM 7,5, NaCl 100 mM) en ausencia o presencia de ISO 10  $\mu$ M, agonista inverso ICI-118551 (ICI) 1  $\mu$ M, Gs heterotrímero 300 nM, o Nb80 300 nM, o en combinaciones de ISO con Gs, ISO con Nb80 y Nb80 con ICI. Se realizó la espectroscopia de fluorescencia en un espectrofluorómetro Spex FluoroMax-3 (Jobin Yvon Inc.) con el modo de recuento de fotones, usando un paso de banda de excitación y emisión de 5 nm. Se fijó la excitación en 370 nm y se recogió la emisión de 415 a 535 nm en incrementos de 1 nm con tiempo de integración 0,3 s/nm. Se corrigió la intensidad de fluorescencia con la fluorescencia de fondo del tampón y los ligandos.

**Tabla 1. Lista de nanocuerpos específicos de  $\beta$ 2AR**

Número de referencia de nanocuerpo	Abreviatura de nanocuerpo	SEQ ID NO
CA2764	NB64	1
CA3431	NB31	2
CA3413	NB13	3
CA2780	NB80	4
CA2765	NB65	5
CA2761	NB61	6
CA3475	NB75	7
CA2770	NB70	8
CA3472	NB72	9
CA3420	NB20	10
CA3433	NB33	11
CA3434	NB34	12
CA3484	NB84	13

CA2760	NB60	14
CA2773	NB73	15
CA3477	NB77	16
CA2774	NB74	17
CA2768	NB68	18
CA3424	NB24	19
CA2767	NB67	20
CA2786	NB86	21
CA3422	NB22	22
CA2763	NB63	23
CA2772	NB72	24
CA2771	NB71	25
CA2769	NB69	26
CA2782	NB82	27
CA2783	NB83	28
CA2784	NB84	29

Tabla 2. CDR de nanocuerpos específicos de  $\beta$ 2AR

Número de referencia de nanocuerpo	Abreviatura de nanocuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
CA2764	NB64	GSIFSINT (SEQ ID NO 30)	IHSGGST (SEQ ID NO 43)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO 57)
CA3431	NB31	GSIFSINT (SEQ ID NO 30)	IHSGGST (SEQ ID NO 43)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO 57)
CA3413	NB13	GSIFSINT (SEQ ID NO 30)	IHSGGST (SEQ ID NO 43)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO 57)
CA2780	NB80	GSIFSINT (SEQ ID NO 30)	IHSGGST (SEQ ID NO 43)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO 57)
CA2765	NB65	GSIFSINT (SEQ ID NO 30)	IHSGGST (SEQ ID NO 43)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO 57)
CA2761	NB61	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAVAGTFSTYDY (SEQ ID NO 58)
CA3475	NB75	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAVAGTFSTYDY (SEQ ID NO 58)
CA2770	NB70	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ISSGRL (SEQ ID NO 45)	NAVAGTFSTYDY (SEQ ID NO 58)
CA3472	NB72	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ISSGRL (SEQ ID NO 45)	NAVAGTFSTYDY (SEQ ID NO 58)
CA3420	NB20	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA3433	NB33	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	VTSGGST (SEQ ID NO 46)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA3434	NB34	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA3484	NB84	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA2760	NB60	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA2773	NB73	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGRST (SEQ ID NO 47)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA3477	NB77	GSIFSLND (SEQ ID NO 31)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA2774	NB74	GSIFSIND (SEQ ID NO 32)	ITSGGSV (SEQ ID NO 48)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO 59)
CA2768	NB68	GTIFSNA (SEQ ID NO 33)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NAKVPSTFSIYDY (SEQ ID NO 60)

CA3424	NB24	GSVFLPT (SEQ ID NO 34)	ITSGGST (SEQ ID NO 49)	YYRSTFTEY (SEQ ID NO 61)
CA2767	NB67	GTISSFIA (SEQ ID NO 35)	ITSGGET (SEQ ID NO 50)	NAQVFADIFNLINY (SEQ ID NO 62)
CA2786	NB86	GTIFSPNT (SEQ ID NO 36)	ITSGGSR (SEQ ID NO 51)	NYQTVFFGNAEA (SEQ ID NO 63)
CA3422	NB22	GSIFSINA (SEQ ID NO 37)	STSGDIT (SEQ ID NO 52)	NARGIYSDYAFADFNS (SEQ ID NO 64)
CA2763	NB63	GSRFSFIT (SEQ ID NO 38)	LSGDNT (SEQ ID NO 53)	RGTSVLYDV (SEQ ID NO 65)
CA2772	NB72	GFTFSGYA (SEQ ID NO 39)	INSGGGST (SEQ ID NO 54)	HARDIYSDFLGQYDY (SEQ ID NO 66)
CA2771	NB71	GFAFSSYE (SEQ ID NO 40)	ITTGGNT (SEQ ID NO 55)	NANWDLLSDY (SEQ ID NO 67)
CA2769	NB69	GSIFSINA (SEQ ID NO 37)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	NVQGTGPSSWLFNEYDY (SEQ ID NO 68)
CA2782	NB82	GSIFSINS (SEQ ID NO 41)	ITSDGST (SEQ ID NO 56)	NADSVYSDFLGKYDY (SEQ ID NO 69)
CA2783	NB83	GSIFSLNA (SEQ ID NO 42)	ITSDGST (SEQ ID NO 56)	NADSVYSDFLGKYDY (SEQ ID NO 69)
CA2784	NB84	GSIFSINA (SEQ ID NO 37)	ITSGGST (SEQ ID NO 44)	HVRDIYSDFLGQYDY (SEQ ID NO 70)

**Tabla 3 Propiedades de unión al agonista completo de membranas que expresan  $\beta$ 2AR en presencia y ausencia de nanocuerpos.**

- 5 Se realizó una unión por competición de [3H]-DHA en membranas de células de insecto Sf9 que expresan  $\beta$ 2AR, en presencia o ausencia de nanocuerpos 1  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  EE de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Los valores de CI50 usados para los cálculos de los valores de Ki se obtuvieron de las medias de los valores de pIC50 determinados por análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) y el intervalo EE de pCI50  $\pm$  EE

Ki isoproterenol [intervalo EE] (nM)	
$\beta$ 2AR	295 [211-412]
+ NB65	13,8 [6,98 - 27,3]
+ NB67	19,4 [11,3 - 33,1]
+ NB69	53,5 [34,3 - 83,1]
+ NB71	10,6 [3,68 - 30,4]
+ NB72	145 [93,3 - 226]
+ NB80	10,0 [4,74 - 21,0]
+ NB84	75,4 [35,9 - 158]

10 **Tabla 4 Caracterización farmacológica de  $\beta$ 2AR reconstituido en partículas de HDL en complejo con Gs y Nb80**

	Unión de saturación [3H]-DHA	Unión de competición [3H]-DHA/(-)-isoproterenol		
	Kd $\pm$ E.E.	Estado de baja afinidad	Estado de alta afinidad	
		Ki [intervalo E.E.]	Ki [intervalo E.E.]	
	nM	nM	nM	
$\beta$ 2AR	0,55 $\pm$ 0,09 (n=3)	107,5 [103,8 - 111,3]		(n=3)
$\beta$ 2AR + Gs		95,3 [82,8 - 109,7]	1,07 [0,96-1,19]	(n=4)
$\beta$ 2AR + Gs + GTP $\gamma$ S		95,2 [92,2 - 98,3]		(n=3)
$\beta$ 2AR + NB80			1,13 [1,09 - 1,18]	(n=3)
$\beta$ 2AR-T4L	0,42 $\pm$ 0,01 (n=3)	33,5 [31,6-35,5]		(n=3)
$\beta$ 2AR-T4L + NB80			0,56 [0,54 - 0,57]	(n=4)

**Tabla 5 Recogida de datos de rayos X y estadísticas de refinamiento del complejo  $\beta$ 2AR-Nb80****A. Estadísticas de recogida de datos**

longitud de onda (Å)	1,0332
grupo espacial	C2
parámetros de celda unitaria	
<i>a</i> (Å)	236,7
<i>b</i> (Å)	45,7
<i>c</i> (Å)	71,4
$\beta$ (°)	102,3
número de cristales	23
resolución (Å)	37-3,50 (3,56-3,50)
reflexiones únicas	10147 (903)
integridad	94,8 (93,7)
multiplicidad	3,5 (3,2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6,7(1,8)
Rcomb (%)	0,192 (0,594)

**B. Estadísticas de refinamiento**

resolución (Å)	37-3,50
n.º de reflexiones conjunto de trabajo (equipo de prueba)	9210 (937)
$R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ (%)	0,225/0,294
rmsd de la idealidad	
longitudes de enlace (Å)	0,010
ángulos de enlace (°)	1,3
Corrección B anisotrópica (Å <sup>2</sup> )	B11=33,5/B22=2,7/B33=-36,3/B13=4,5
Promedio de factor B (Å <sup>2</sup> )	
receptor	76,4
nanocuerpo	96,6
agonista	62,4
análisis de Ramachandran	
residuos en la región más favorecida (%)	86,6
región adicionalmente permitida (%)	13,4
región ampliamente permitida (%)	0,0
región no permitida (%)	0,0

**Tabla 6 En nanocuerpo 80 indujo desplazamiento de potencia de (ant)agonistas. Los agonistas muestran un incremento en la afinidad por el complejo  $\beta$ 2AR-Nb80.**

ID competidor	Tipo competidor para $\beta$ 2AR	Desplazamiento de potencia*
isoproterenol	agonista	8,8
alprenolol	antagonista	1,1
carvedilol	antagonista	1,2
CGP12177A	antagonista	1,0
salmeterol	agonista completo	3,3
terbutalina	agonista parcial	4,3
dobutamina	agonista parcial	2,3
salbutamol	agonista parcial	4,2
ICI118,551	agonista inverso	0,9
metaproterenol	agonista	2,9
procatamol	agonista	2,3
ritodrina	agonista	2,7
fenoterol	agonista completo	3,7
formoterol	agonista	4,0
timolol	antagonista	0,6

\* Los desplazamientos de potencia se determinaron como la proporción de la CI50 medida en presencia de un Nb irrelevante (control negativo) y la CI50 medida en presencia de Nb80.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL

CONSEJO DE ADMINISTRACIÓN DE LA LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY

5 <120> DOMINIOS DE UNIÓN A PROTEÍNA QUE ESTABILIZAN ESTADOS CONFORMACIONALES  
FUNCIONALES DE LOS GPCR

<130> JST/GPCR/349

<150> Documento US 61/399,781

10 <151> 16-07-2010

<150> Documento GB1014715.5

<151> 06-09-2010

15 <160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 1

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 2

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

ES 2 613 532 T3

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 4  
<211> 120  
<212> PRT  
5 <213> Lama glama

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 5  
<211> 120  
<212> PRT  
10 <213> Lama glama

<400> 5

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Arg  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 6

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Val Val Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 7

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Val Val Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama  
 <400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Arg Leu Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

ES 2 613 532 T3

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Val Val Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Arg Leu Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Val Val Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Lama glama

<400> 10

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 11

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Val Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 12

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

ES 2 613 532 T3

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

ES 2 613 532 T3

<210> 15  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Lama glama

5 <400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30  
 Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Arg Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 16  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Lama glama

10

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30  
 Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

ES 2 613 532 T3

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17  
<211> 119  
<212> PRT  
5 <213> Lama glama  
<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Val Asn Tyr Ala Glu Pro Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 18  
<211> 119  
10 <212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 18



ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30

Thr Ala Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Leu Ile Thr Gly Ser Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Glu Tyr Ser Lys Lys Thr Met Asp Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu His Arg Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Tyr  
 85 90 95

Tyr Arg Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser  
 115

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 20

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Ile Ser Ser Phe Ile  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Glu Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Gln Val Phe Ala Asp Ile Phe Asn Leu Ile Asn Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 21  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama  
 <400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Pro Asn  
 20 25 30

Thr Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

ES 2 613 532 T3

Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Ser Arg Asn Tyr Ala Asp Tyr Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Tyr Gln Thr Val Phe Phe Gly Asn Ala Glu Ala Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 22  
<211> 122  
<212> PRT  
5 <213> Lama glama  
  
<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Ser Asp Tyr Ala Phe Ala Asp Phe Asn Ser Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10 <210> 23  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Lama glama

ES 2 613 532 T3

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Ser Arg Phe Ser Phe Ile  
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Leu Ser Gly Asp Asn Thr Asn Tyr Ser Asp Ala Val Lys Gly  
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 65 70 75 80

Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Arg Gly  
 85 90 95

Thr Ser Val Leu Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

<210> 24

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

ES 2 613 532 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

His Ala Arg Asp Ile Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Gln Tyr Glu Tyr Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Glu Leu Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln His Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Gly Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Ser Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ala Cys Asn  
85 90 95

Ala Asn Trp Asp Leu Leu Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

10 <213> Lama glama

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

ES 2 613 532 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Val Gln Gly Thr Gly Pro Ser Ser Trp Leu Phe Asn Glu Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 27  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama  
 <400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Ser Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Asn  
 85 90 95

Ala Asp Ser Val Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Lys Tyr Glu Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

ES 2 613 532 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 28  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama  
 <400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn  
 20 25 30

Ala Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Asp Ser Val Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Lys Tyr Glu Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 29  
 <211> 123  
 10 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 29

ES 2 613 532 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Ile Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
 85 90 95

Val Arg Asp Ile Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Gln Tyr Glu Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 5 <213> Lama glama  
 <400> 30

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Thr  
 1 5

<210> 31  
 <211> 8  
 10 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 31

Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn Asp  
 1 5

<210> 32  
 <211> 8  
 15 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 32

ES 2 613 532 T3

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Asp  
1 5

5 <210> 33  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 33

Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala  
1 5

10 <210> 34  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 34

Gly Ser Val Phe Ser Leu Pro Thr  
1 5

15 <210> 35  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 35

Gly Thr Ile Ser Ser Phe Ile Ala  
1 5

20 <210> 36  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 36

Gly Thr Ile Phe Ser Pro Asn Thr  
1 5

25 <210> 37  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama

30 <400> 37

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala  
1 5

<210> 38

ES 2 613 532 T3

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 38

Gly Ser Arg Phe Ser Phe Ile Thr  
1 5

5

<210> 39  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama

10 <400> 39

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala

1

5

<210> 40  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> Lama glama  
<400> 40

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Glu  
1 5

<210> 41  
<211> 8  
20 <212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 41

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ser  
1 5

<210> 42  
25 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 42

Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn Ala  
1 5

<210> 43  
30 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 43

ES 2 613 532 T3

Ile His Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

5 <210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 44

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

10 <210> 45  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 45

Ile Ser Ser Gly Gly Arg Leu  
1 5

15 <210> 46  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 46

Val Thr Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

20 <210> 47  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 47

Ile Thr Ser Gly Arg Ser Thr  
1 5

25 <210> 48  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama

30 <400> 48

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Val  
1 5

35 <210> 49  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama

ES 2 613 532 T3

<400> 49

Ile Thr Gly Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 50  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 50

Ile Thr Ser Gly Gly Glu Thr  
1 5

<210> 51  
10 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 51

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Arg  
1 5

<210> 52  
15 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 52

Ser Thr Ser Gly Asp Ile Thr  
1 5

<210> 53  
20 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Lama glama

25 <400> 53

Leu Ser Gly Asp Asn Thr  
1 5

<210> 54  
30 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 54

Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr  
1 5

<210> 55

ES 2 613 532 T3

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 55

Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr  
 1 5

5

<210> 56  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Lama glama

10 <400> 56

Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 57  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 15 <213> Lama glama  
 <400> 57

Asn Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 58  
 <211> 13  
 20 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 58

Asn Ala Val Val Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 13  
 25 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 59

Asn Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 60  
 <211> 13  
 30 <212> PRT  
 <213> Lama glama  
 <400> 60

ES 2 613 532 T3

Asn Ala Lys Val Pro Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp Tyr  
1 5 10

5 <210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 61

Tyr Tyr Arg Ser Thr Phe Thr Glu Tyr  
1 5

10 <210> 62  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 62

Asn Ala Gln Val Phe Ala Asp Ile Phe Asn Leu Ile Asn Tyr  
1 5 10

15 <210> 63  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 63

Asn Tyr Gln Thr Val Phe Phe Gly Asn Ala Glu Ala  
1 5 10

20 <210> 64  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
<400> 64

Asn Ala Arg Gly Ile Tyr Ser Asp Tyr Ala Phe Ala Asp Phe Asn Ser  
1 5 10 15

25 <210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Lama glama  
30 <400> 65

Arg Gly Thr Ser Val Leu Tyr Asp Val  
1 5

35 <210> 66  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Lama glama

ES 2 613 532 T3

<400> 66

His Ala Arg Asp Ile Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Gln Tyr Glu Tyr Asp  
1 5 10 15

Tyr

<210> 67

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 67

Asn Ala Asn Trp Asp Leu Leu Ser Asp Tyr  
1 5 10

<210> 68

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 68

Asn Val Gln Gly Thr Gly Pro Ser Ser Trp Leu Phe Asn Glu Tyr Asp  
1 5 10 15

Tyr

15 <210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 69

Asn Ala Asp Ser Val Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Lys Tyr Glu Tyr Asp  
1 5 10 15

Tyr

20

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

25 <400> 70

His Val Arg Asp Ile Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Gln Tyr Glu Tyr Asp  
1 5 10 15

Tyr

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de compuestos que se pueden unir a un estado conformacional activo de un GPCR, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - 5 (i) proporcionar un GPCR y un nanocuerpo que se pueda unir específicamente a un estado conformacional activo de dicho GPCR, en el que dicho nanocuerpo puede estabilizar y/o inducir un estado conformacional activo del GPCR tras la unión, y
  - (ii) proporcionar un compuesto de prueba o una colección de compuestos de prueba, y
  - (iii) evaluar si un compuesto de prueba se une al estado conformacional activo del GPCR, y
  - (iv) seleccionar un compuesto que se una al estado conformacional activo del GPCR.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente el procedimiento la etapa de formar un complejo que comprende el nanocuerpo y el GPCR en un estado conformacional activo.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el complejo comprende adicionalmente un ligando de receptor, en particular, un agonista completo, o un agonista parcial, o un agonista inverso, o un antagonista.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho nanocuerpo se puede unir específicamente a un GPCR unido a un agonista y/o potencia la afinidad del GPCR por un agonista.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho nanocuerpo puede incrementar la termoestabilidad de un estado conformacional activo de un GPCR tras la unión.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho nanocuerpo se puede unir específicamente a un epítipo conformacional de dicho estado conformacional activo de un GPCR, en particular, un epítipo intracelular.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho epítipo conformacional está comprendido en un sitio de unión para una proteína de señalización en dirección 3', en particular, un sitio de unión a proteína G.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho GPCR es una proteína de mamífero, o una proteína vegetal, o una proteína de levadura, o una proteína vírica, o una proteína de insecto, en particular, una proteína humana.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho nanocuerpo y/o dicho complejo se proporciona en forma esencialmente purificada o en una forma solubilizada o inmovilizado en un soporte sólido, o en una composición celular.
- 30 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho compuesto de prueba se selecciona del grupo que comprende un polipéptido, un péptido, una molécula pequeña, un producto natural, un peptidomimético, un ácido nucleico, un lípido, lipopéptido, un hidrato de carbono, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, tal como Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o bien VH, un anticuerpo de cadena pesada (hCAb), un anticuerpo de dominio único (sdAb), un minicuerpo, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH o nanocuerpo), el dominio variable de los receptores de antígeno nuevos derivado de anticuerpos de tiburón (VNAR), un andamiaje de proteína que incluye un alfacuerpo, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPs), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knottinas, dominios CH2 genotecnológicos (nanoanticuerpos).
- 35
- 40

Figura 1

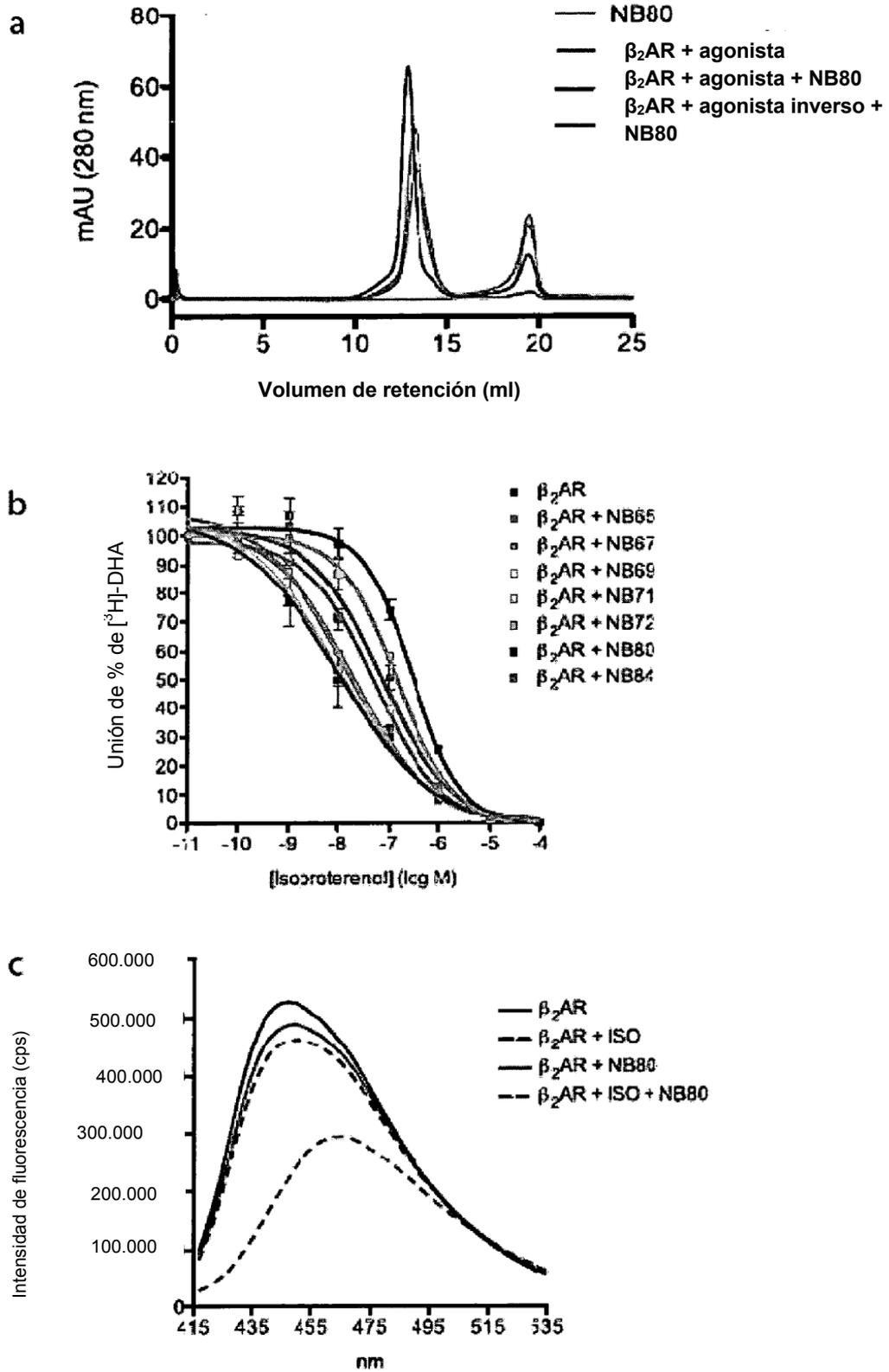


Figura 2

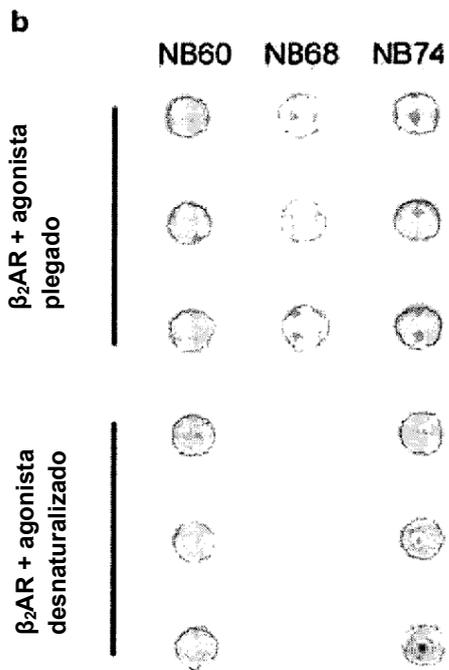
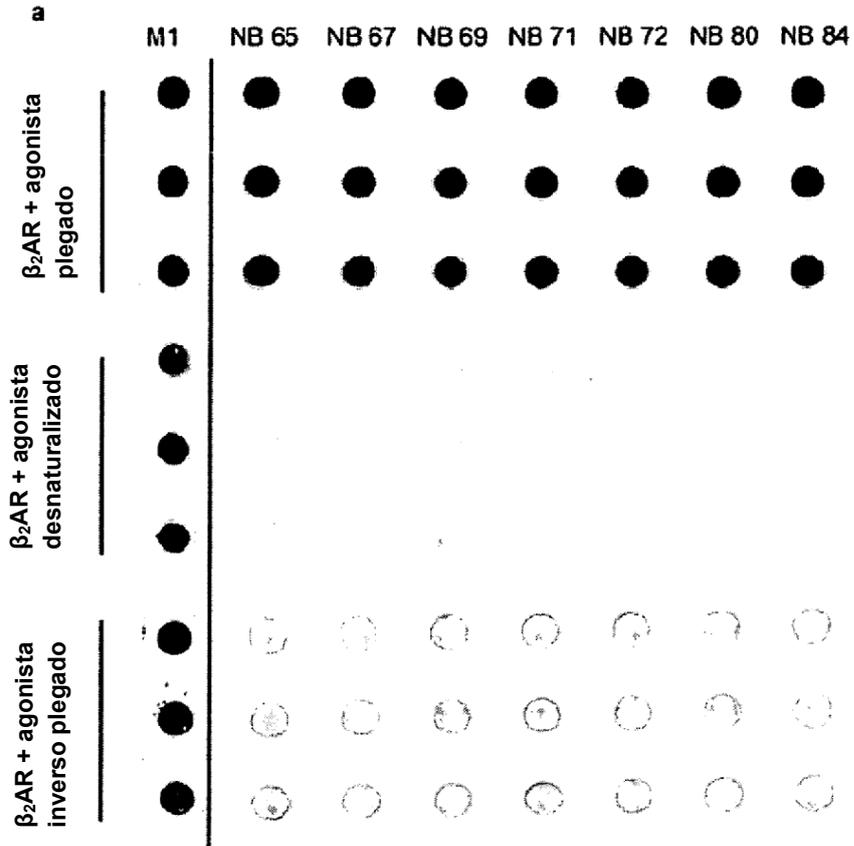
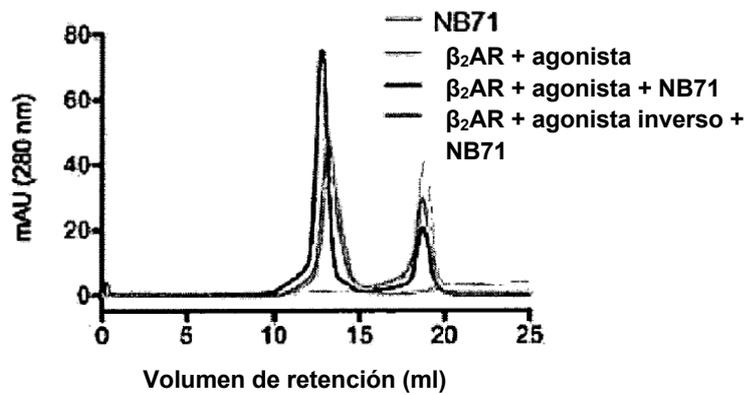
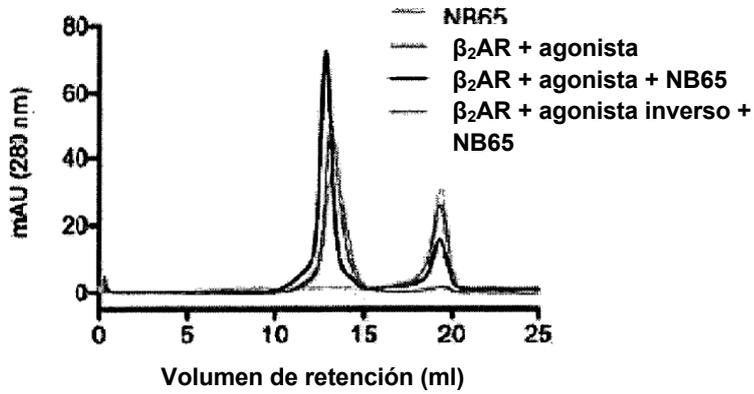
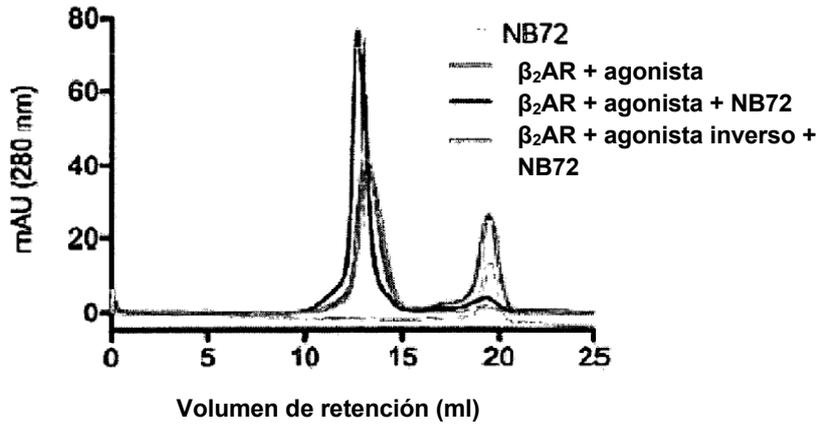


Figura 3



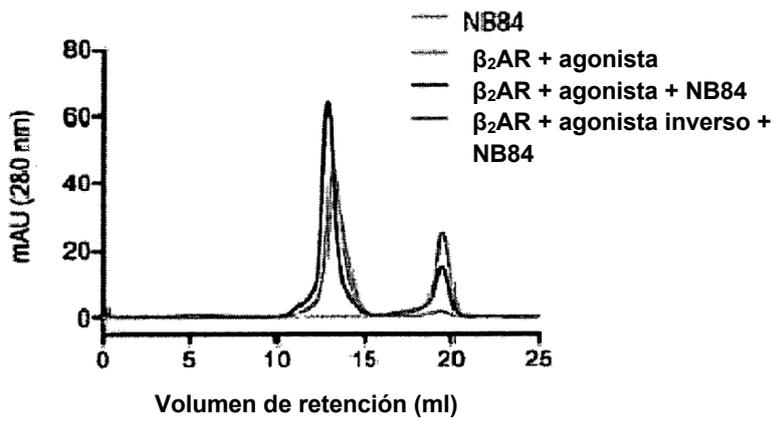
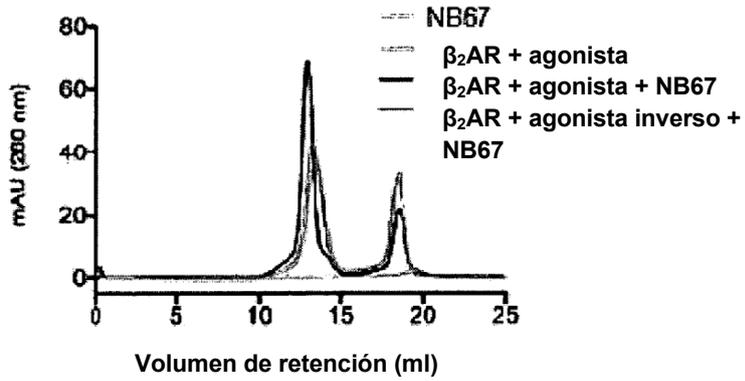
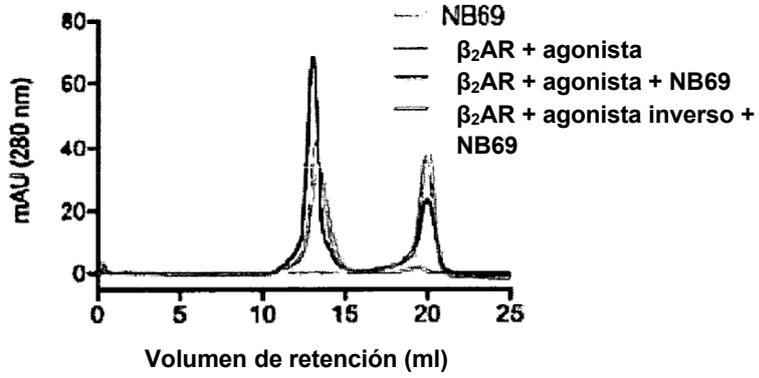


Figura 4

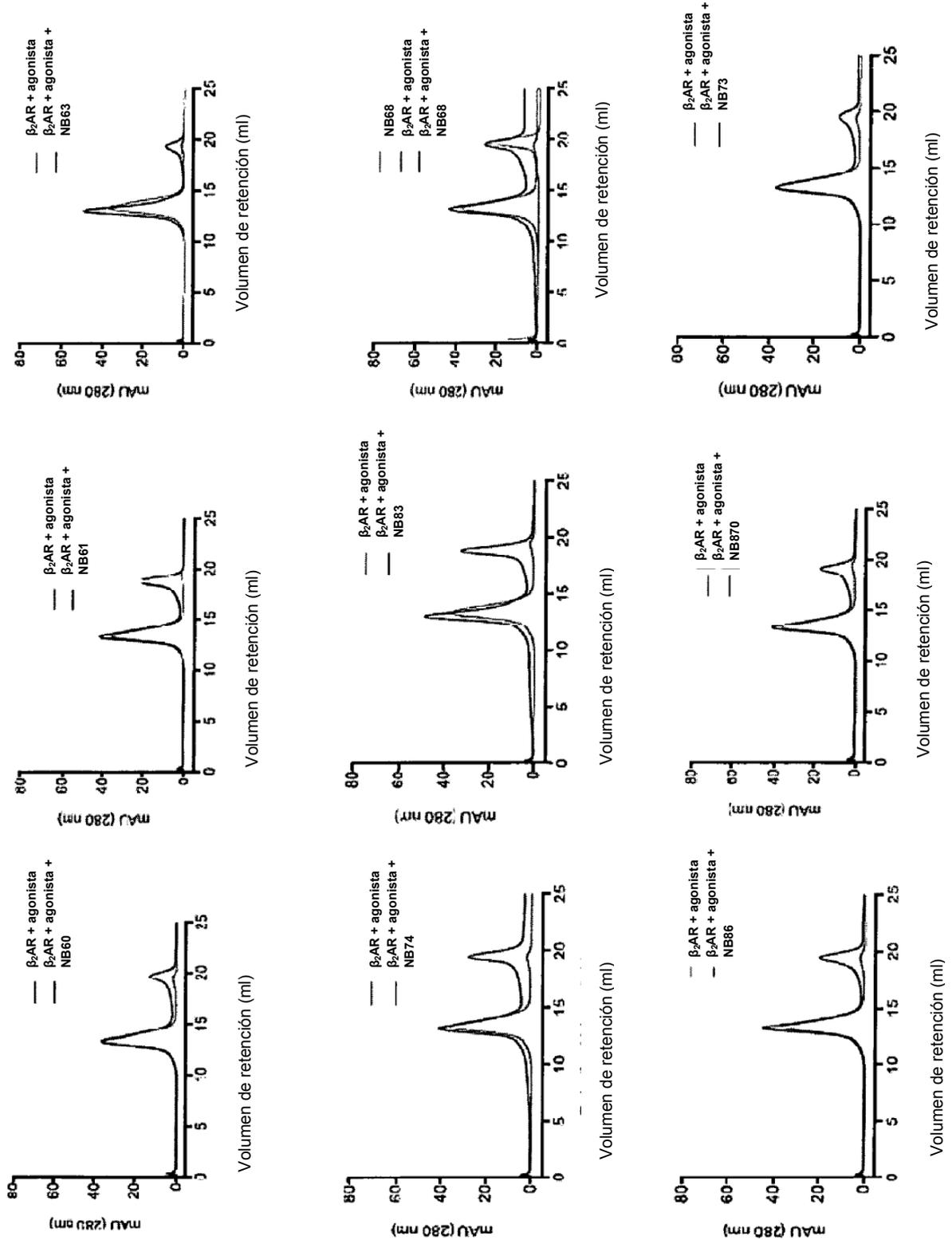
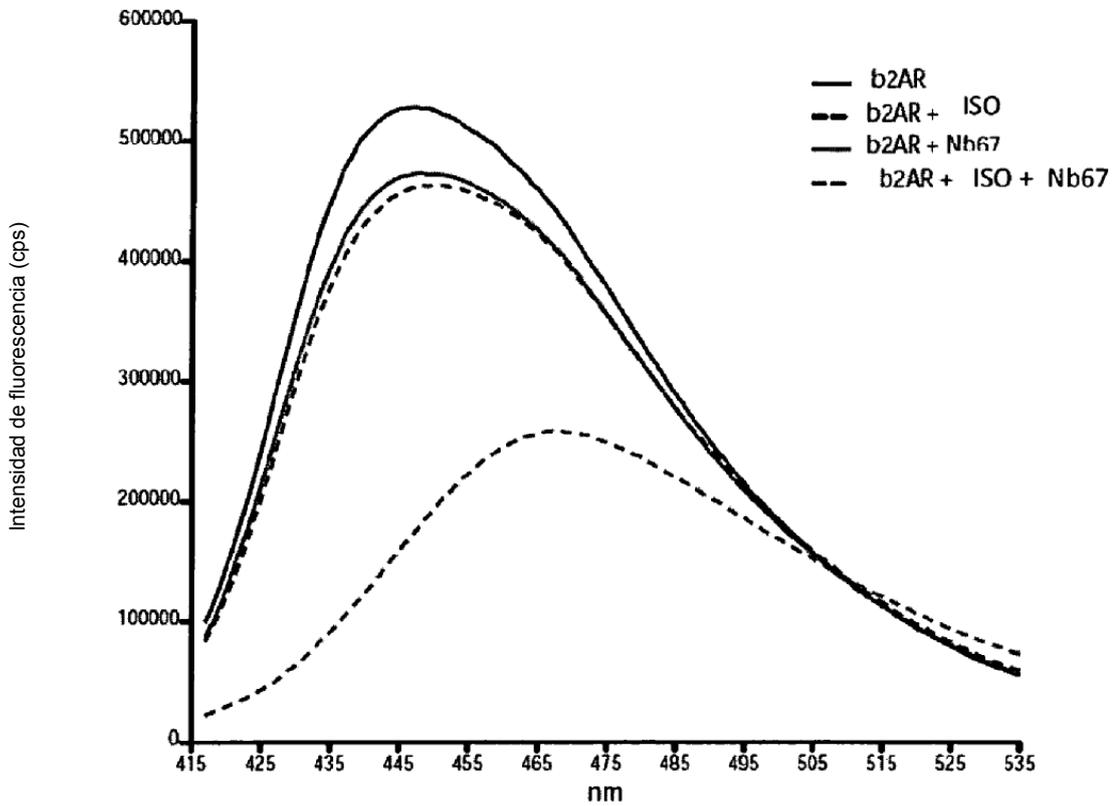
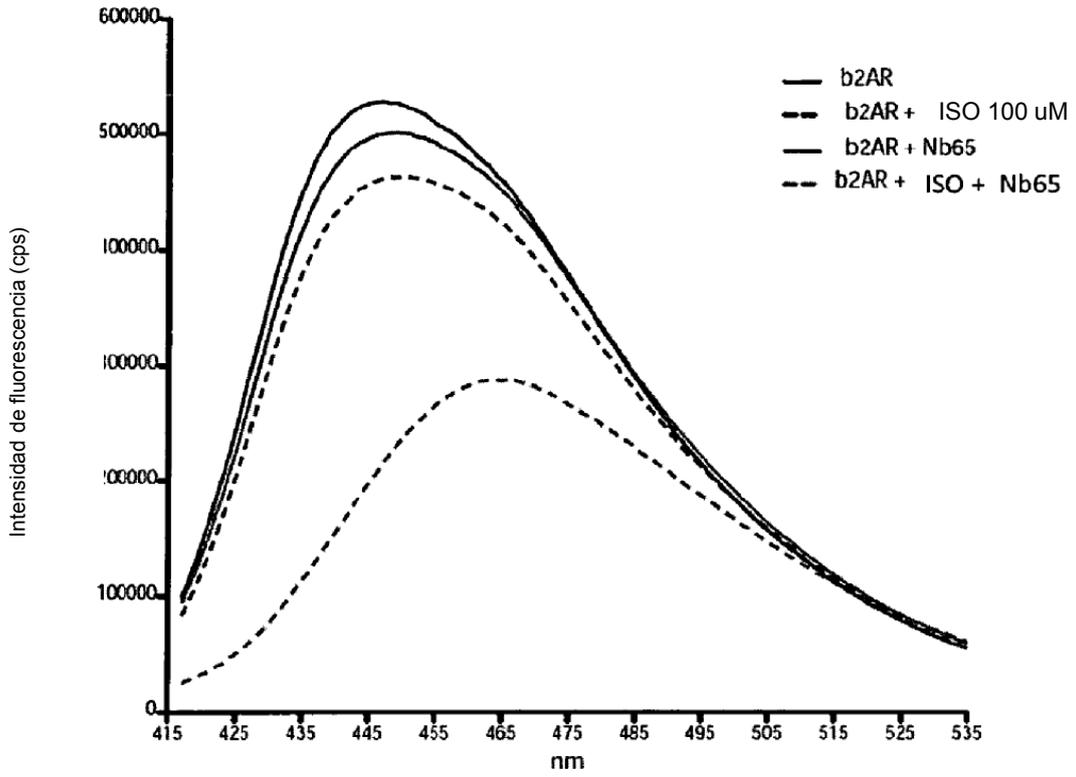
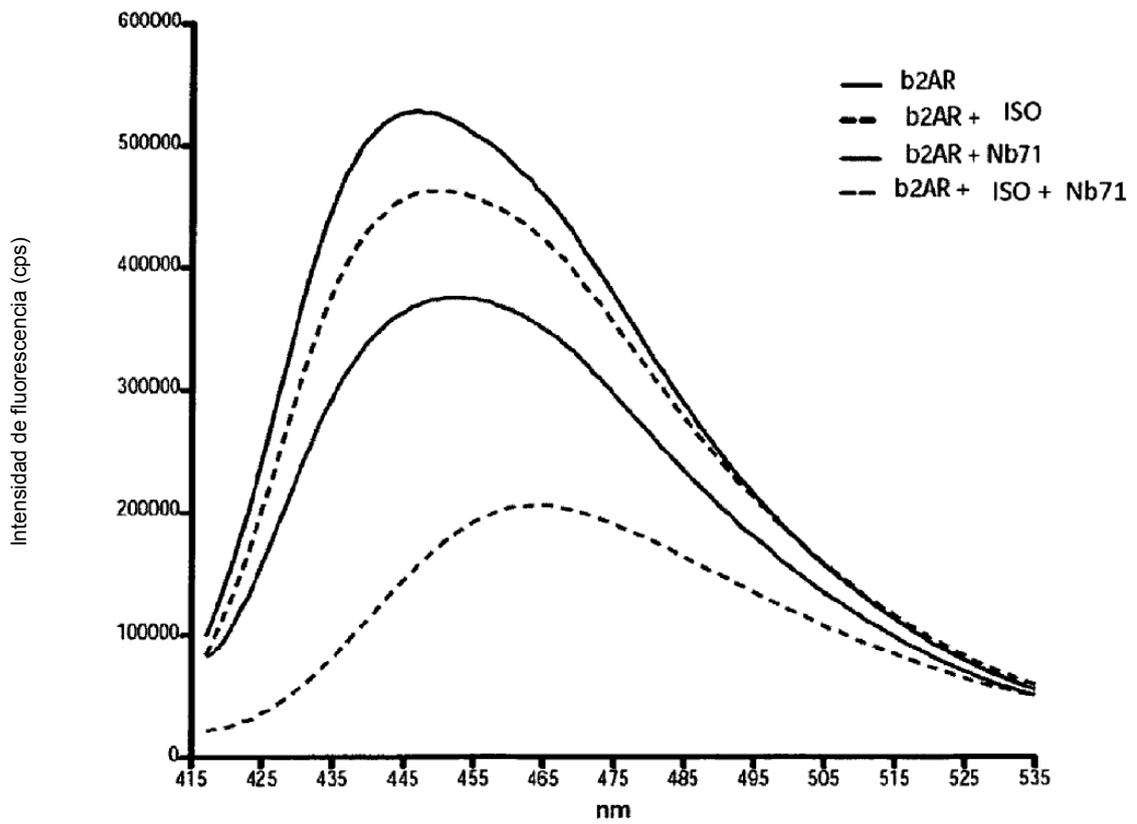
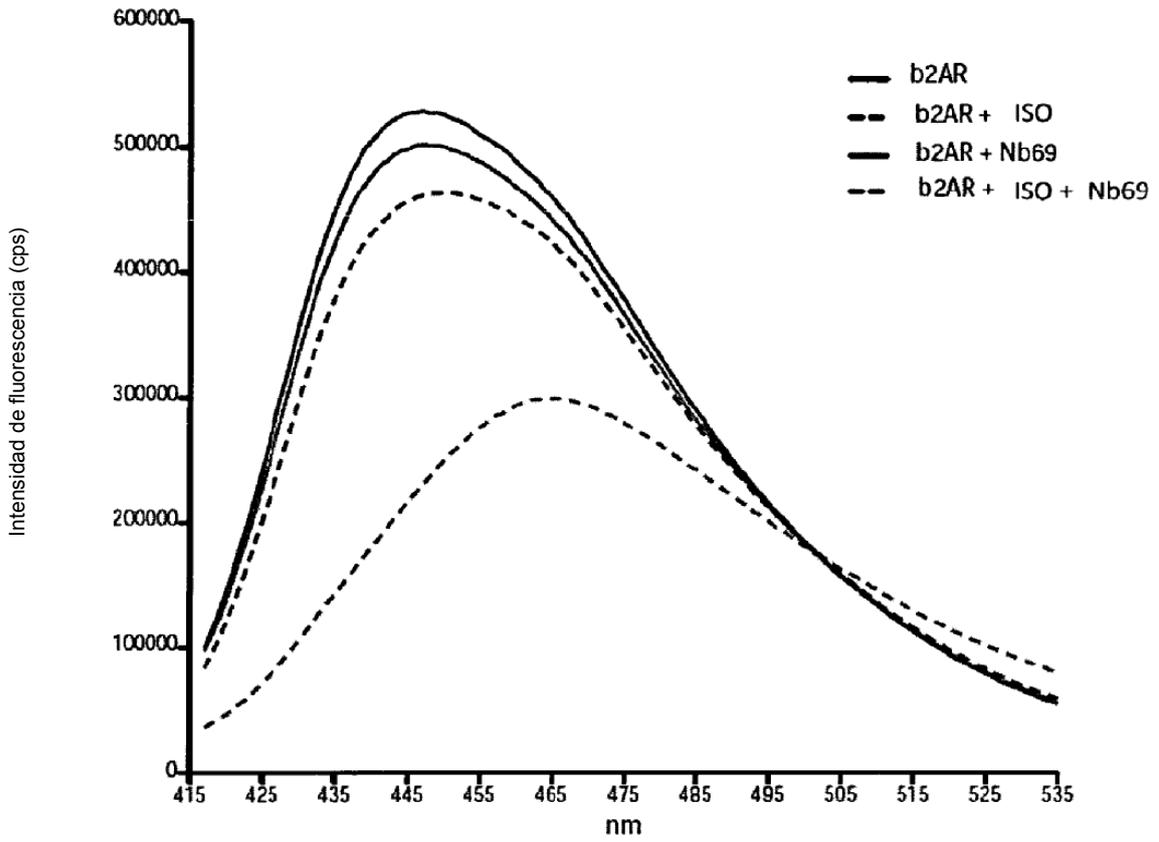


Figura 5





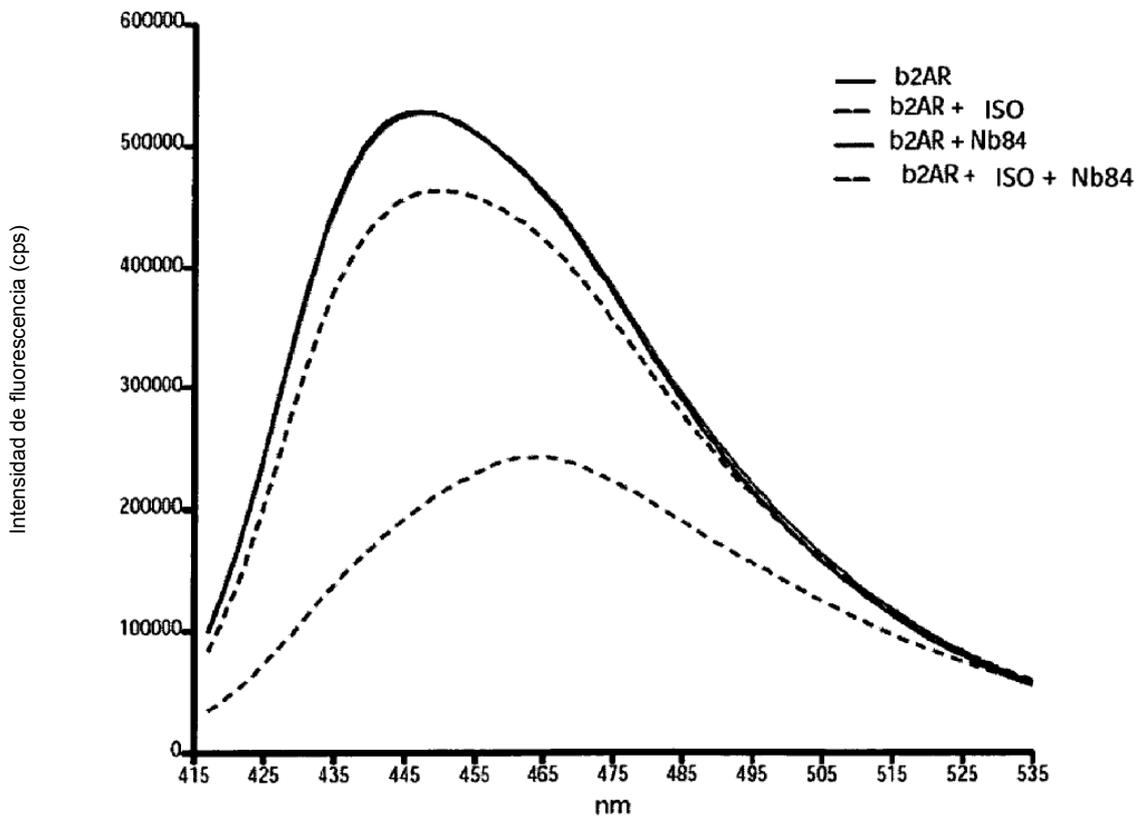
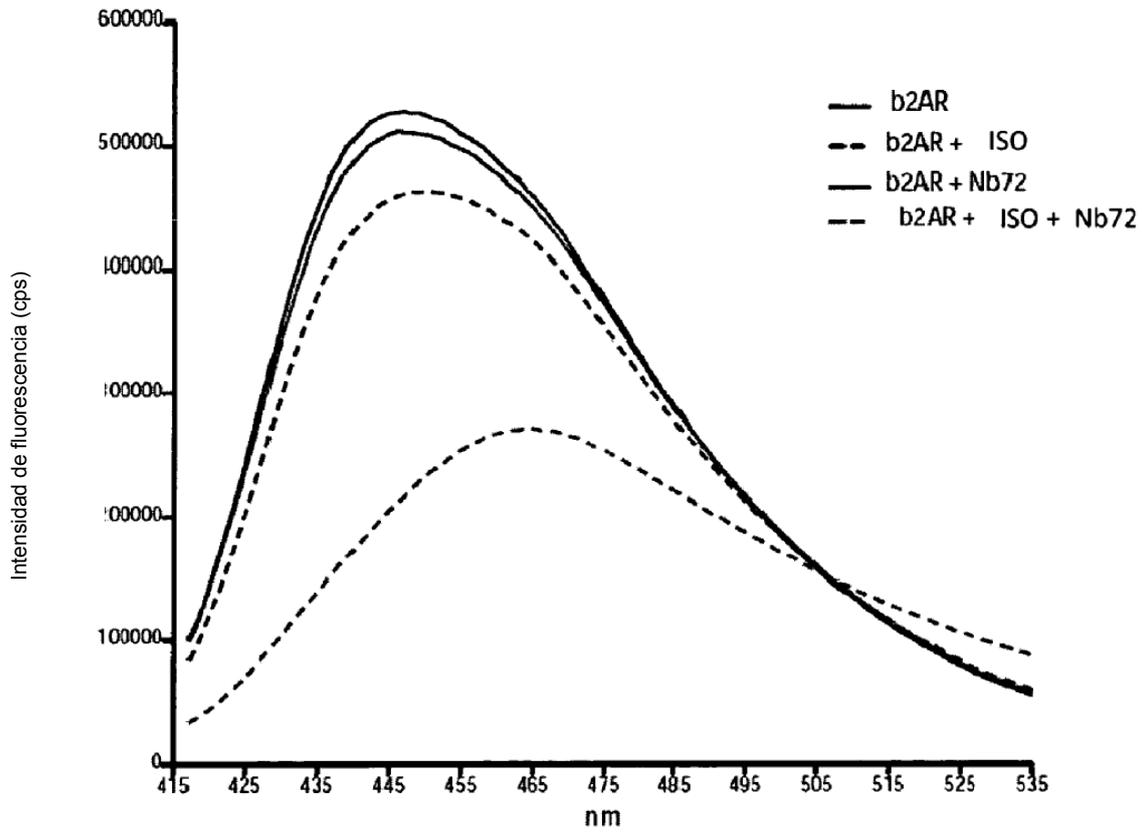


Figura 6

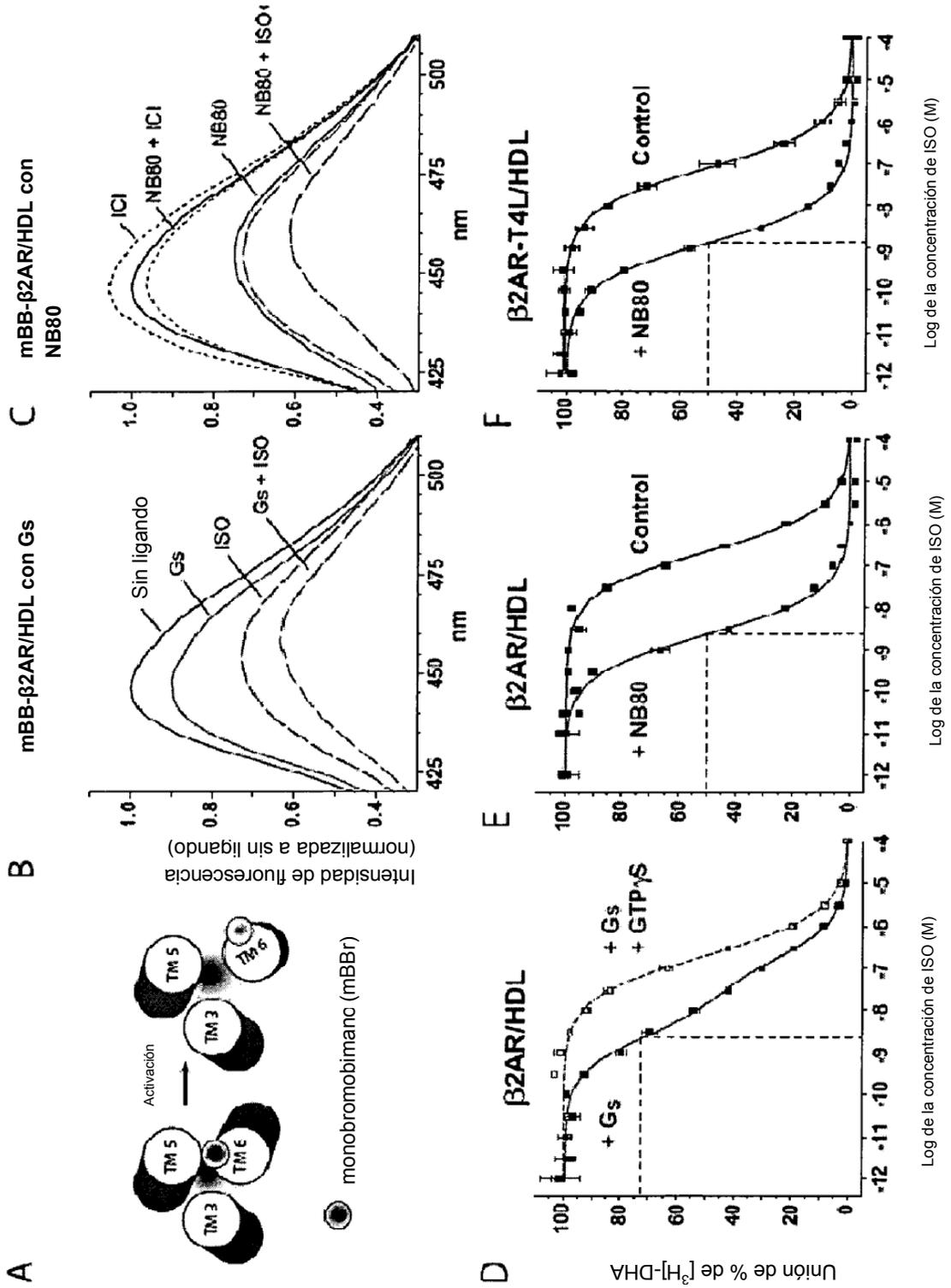


Figura 7

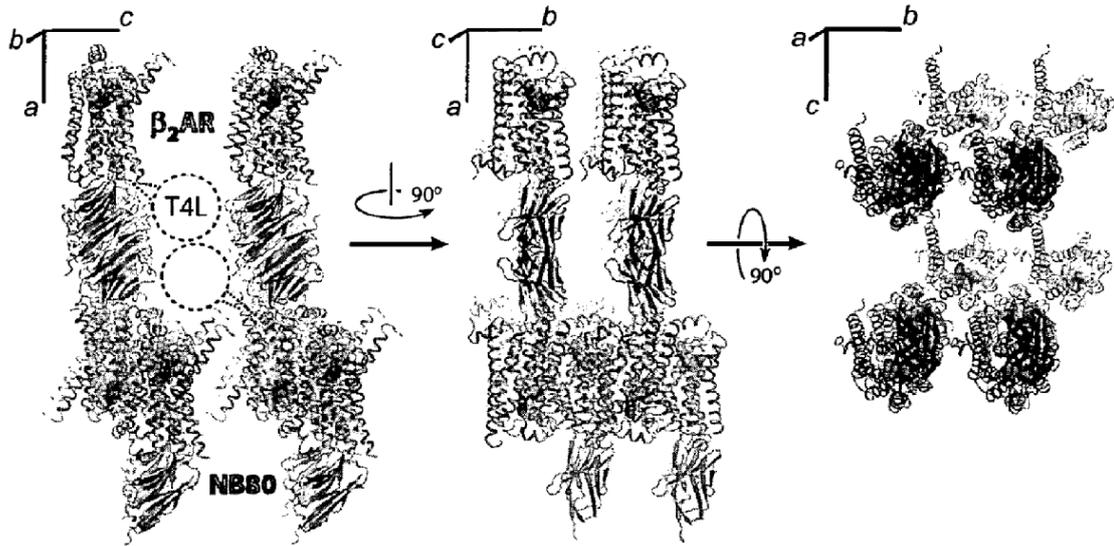


Figura 8

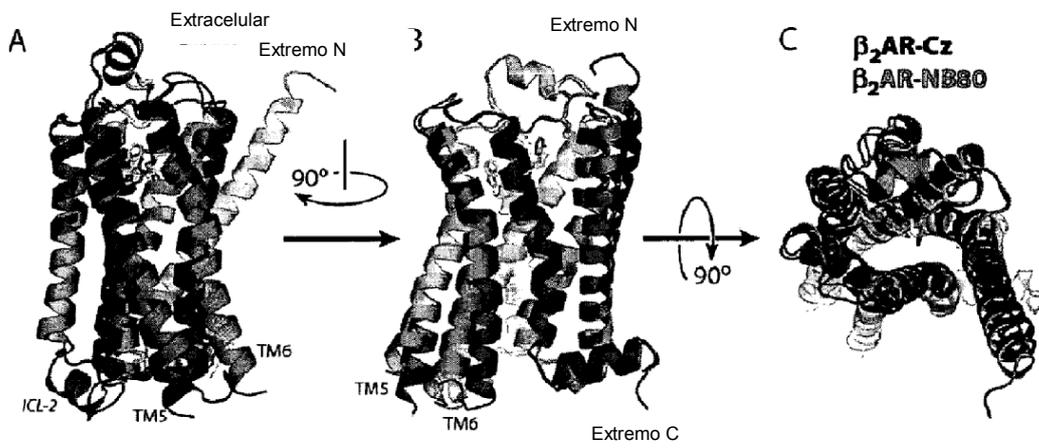


Figura 9

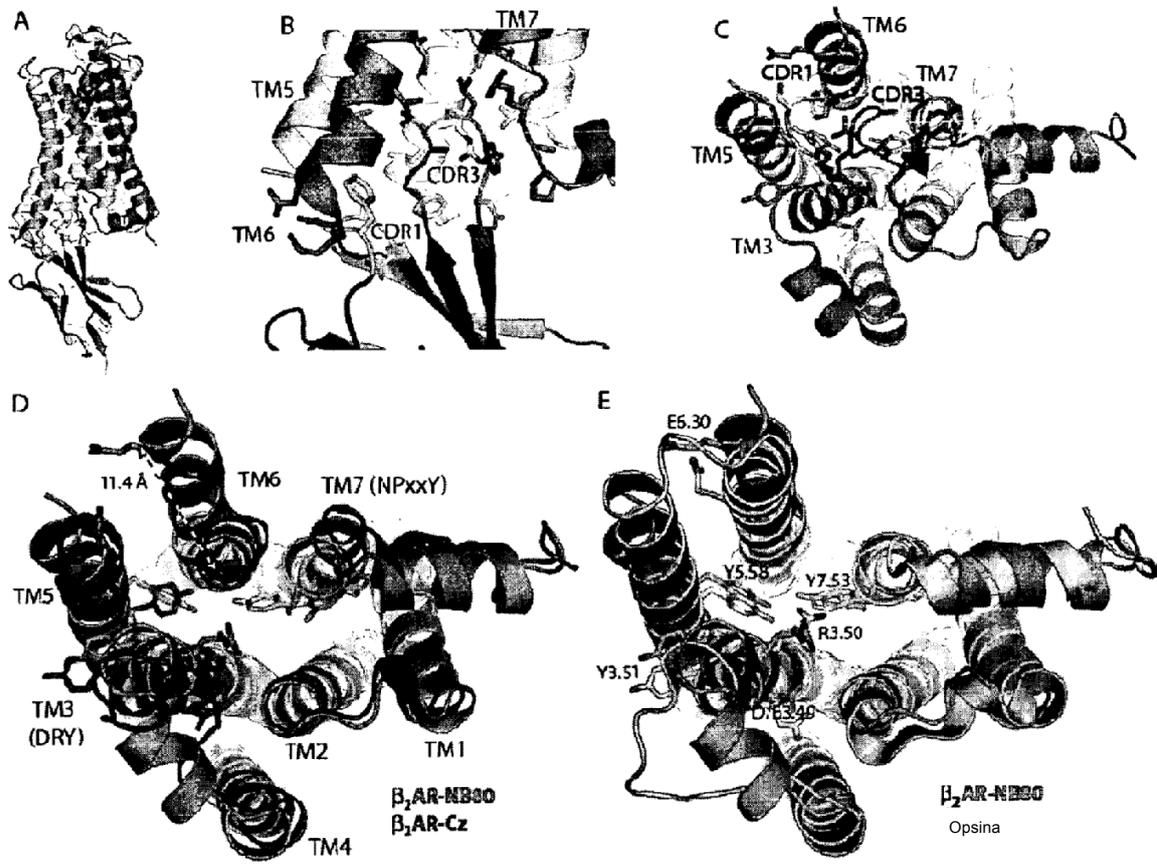


Figura 10

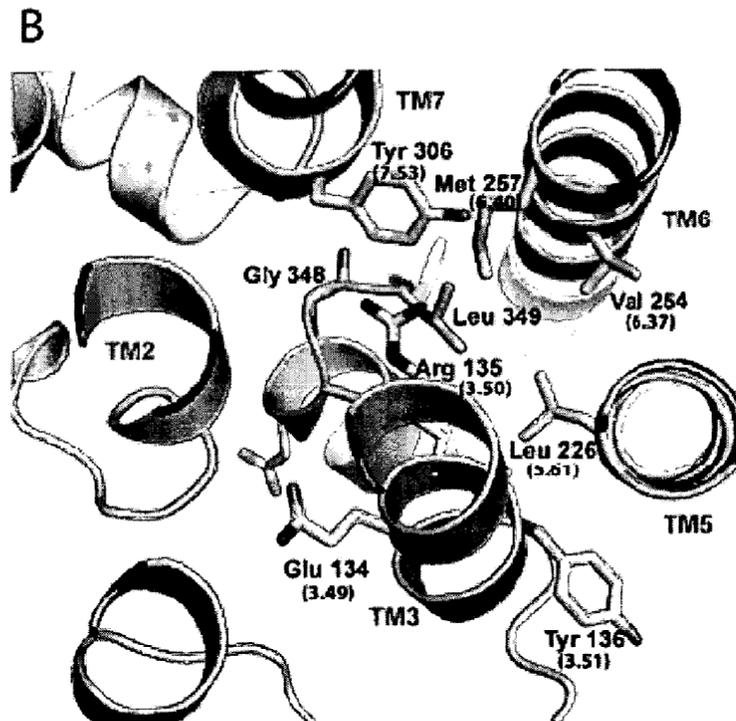
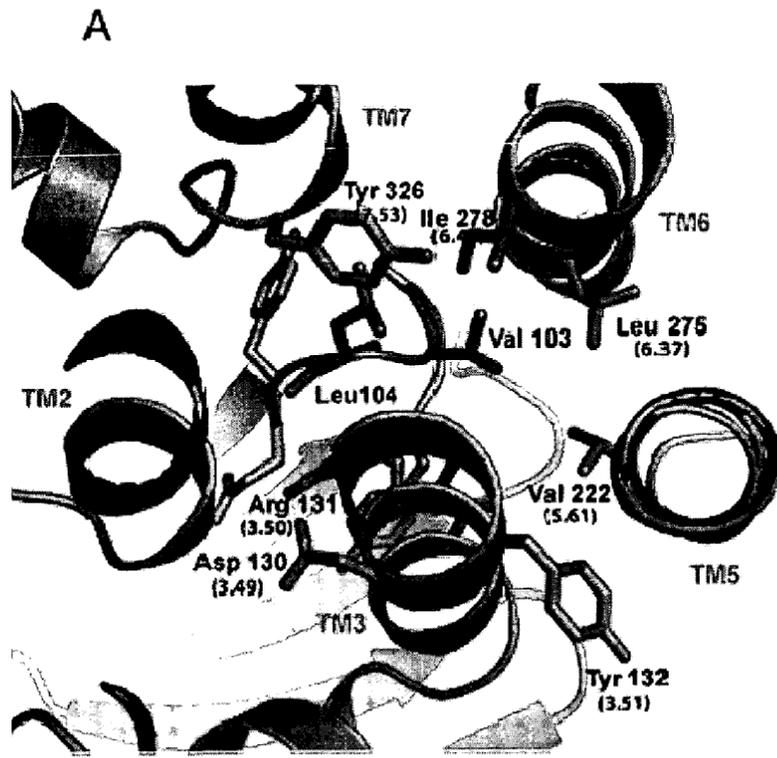


Figura 11

Estado inactivo

Estado activo

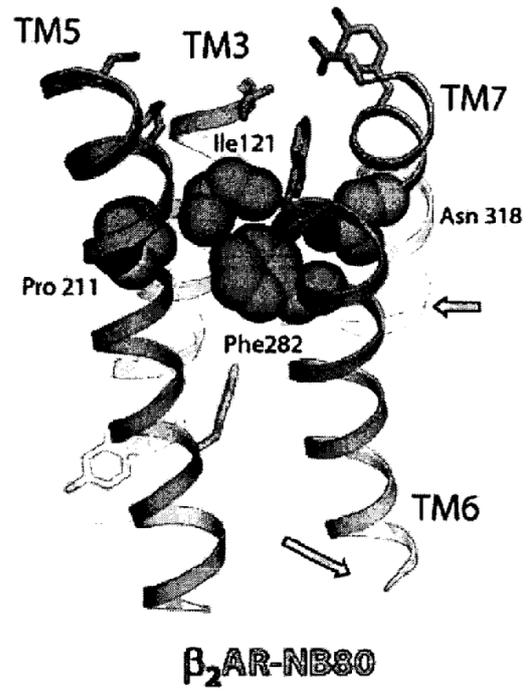
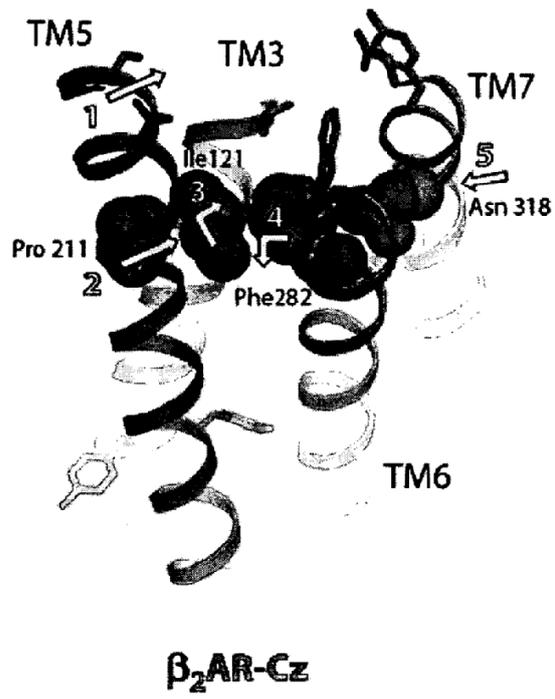


Figura 12

Beta2AR humano

```

--CDR1--
CA2764 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC -----CDR3-----
CA3431 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYANSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3413 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYANSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2780 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYANSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2765 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2761 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3475 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2770 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3472 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3420 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3433 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3434 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3484 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2760 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2773 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3477 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2774 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINL KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2768 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GTFISNMA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3424 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSVFSLPT KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2767 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GTISSTIA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2786 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GTIFSPNI KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA3422 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-DIT NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2763 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSRESFTI KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-DNT NYSDAVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2772 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GTFESGVA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2771 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GFAPSVSE LKNTYRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2769 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2782 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINS KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2783 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC
CA2784 QVQLSEGGELVQAGGSLRISCAAS GSIFSIINA KGNTRQAPGKQRELVAIA IISG-GSI NYADSVKGRFTISRDAKNIIVLQNSLKPEDIAVYIC

```

Figura 13

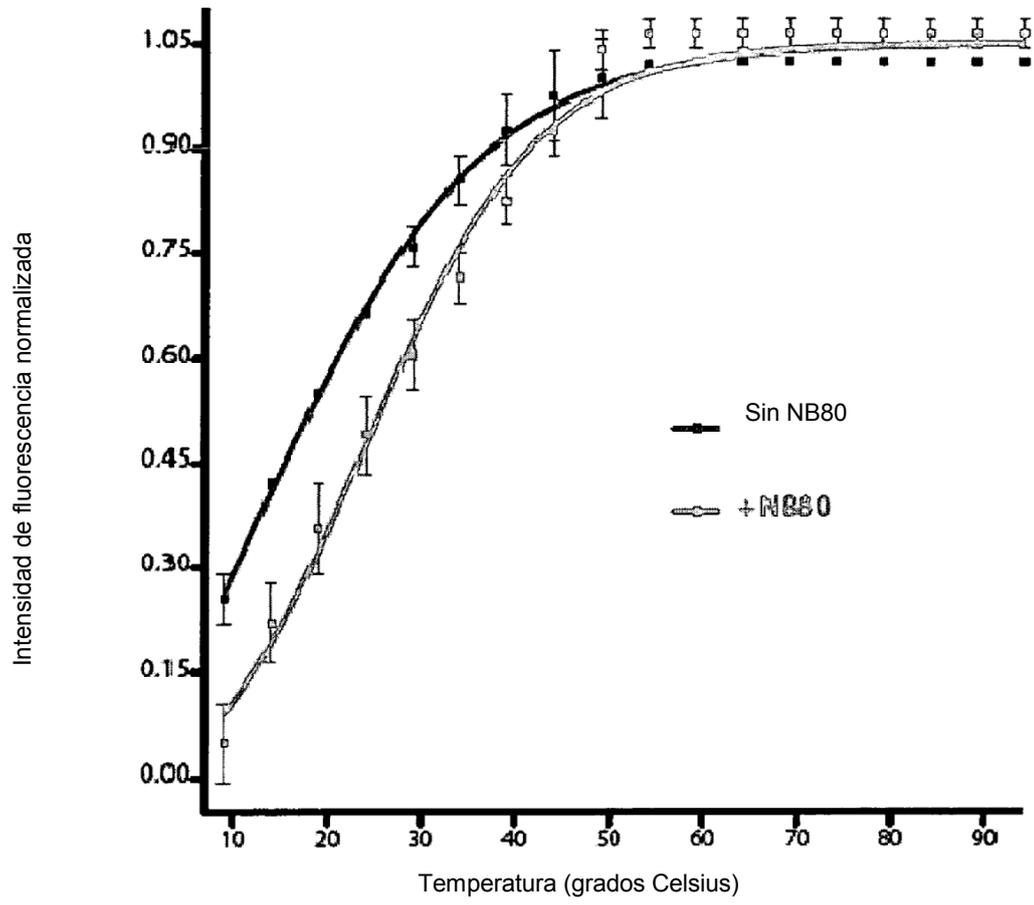
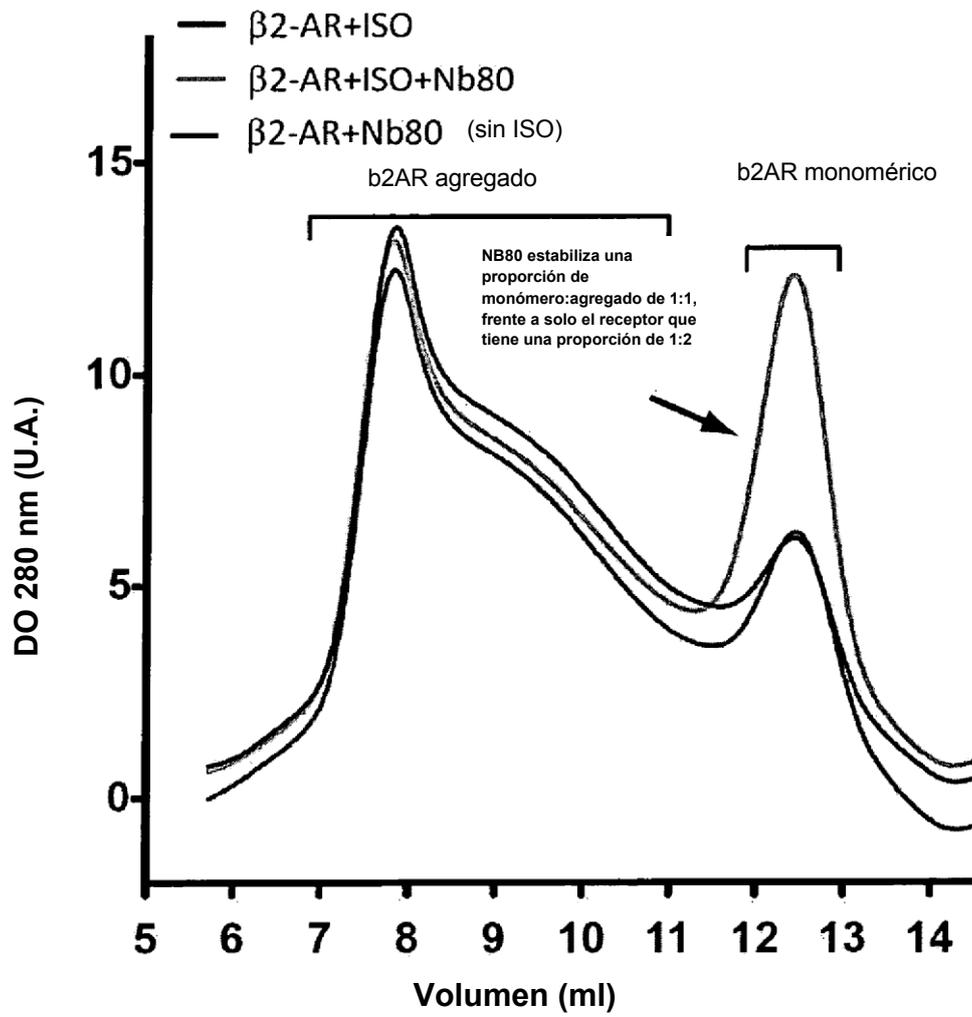


Figura 14

A



B

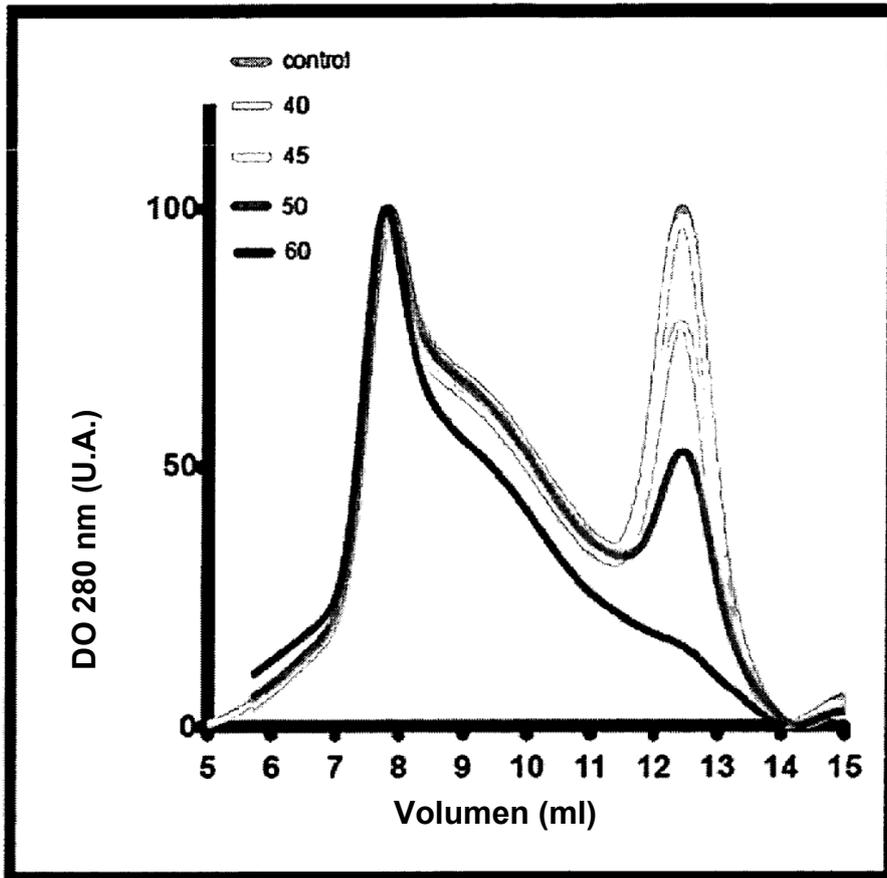


Figura 15

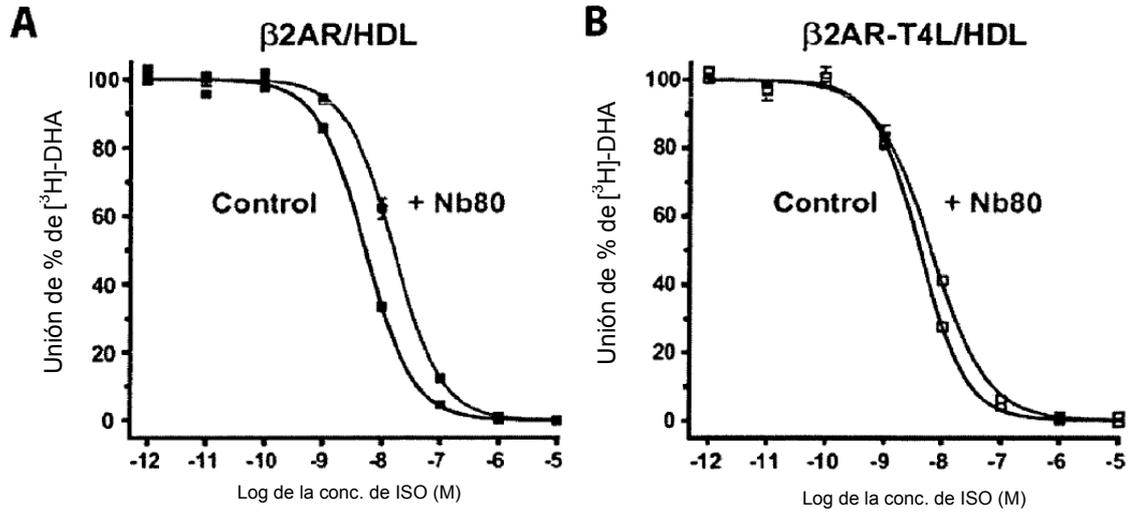
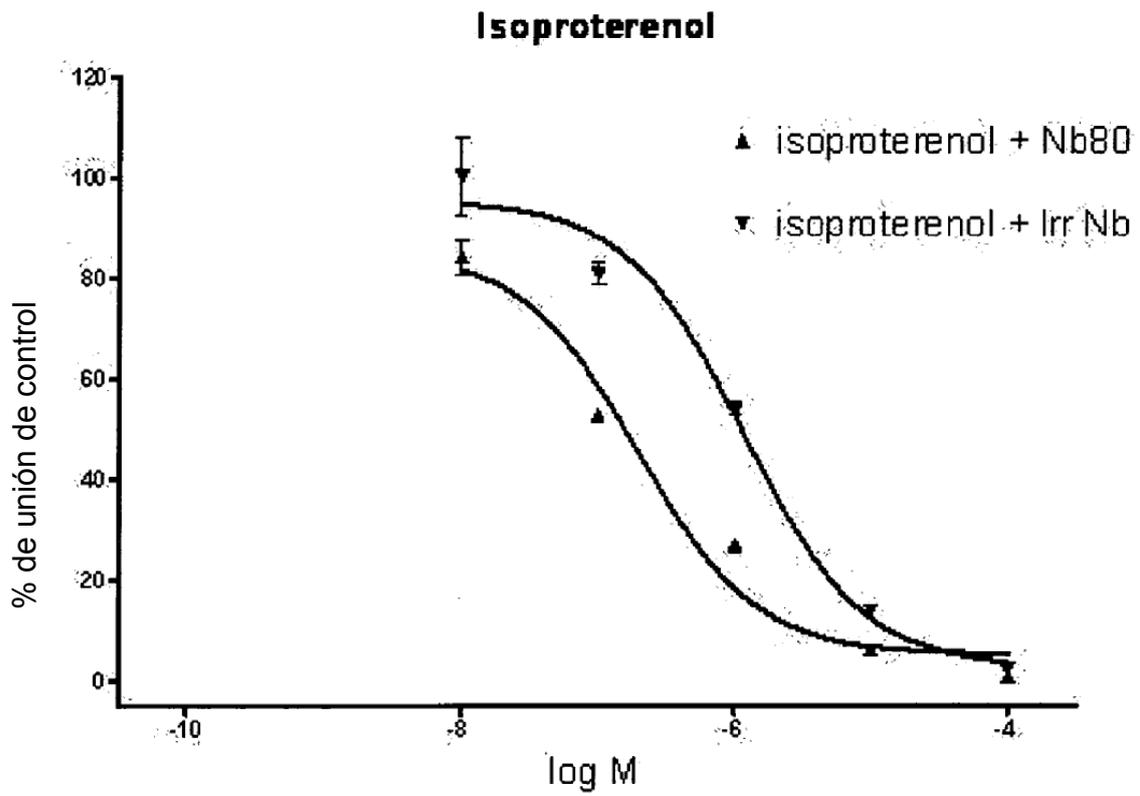
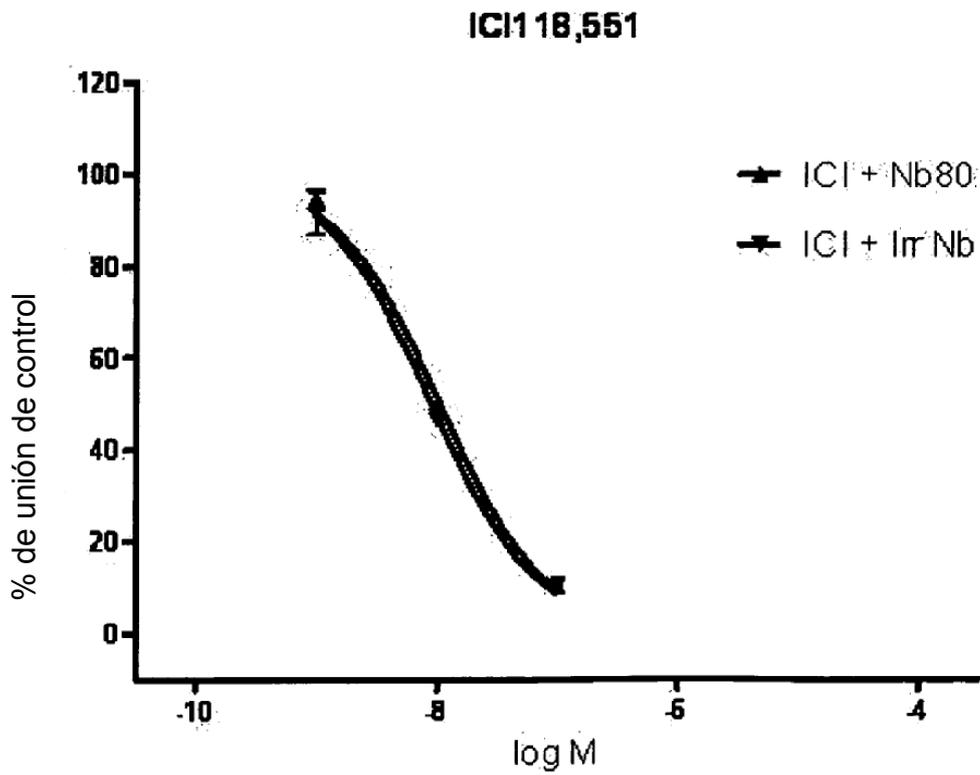
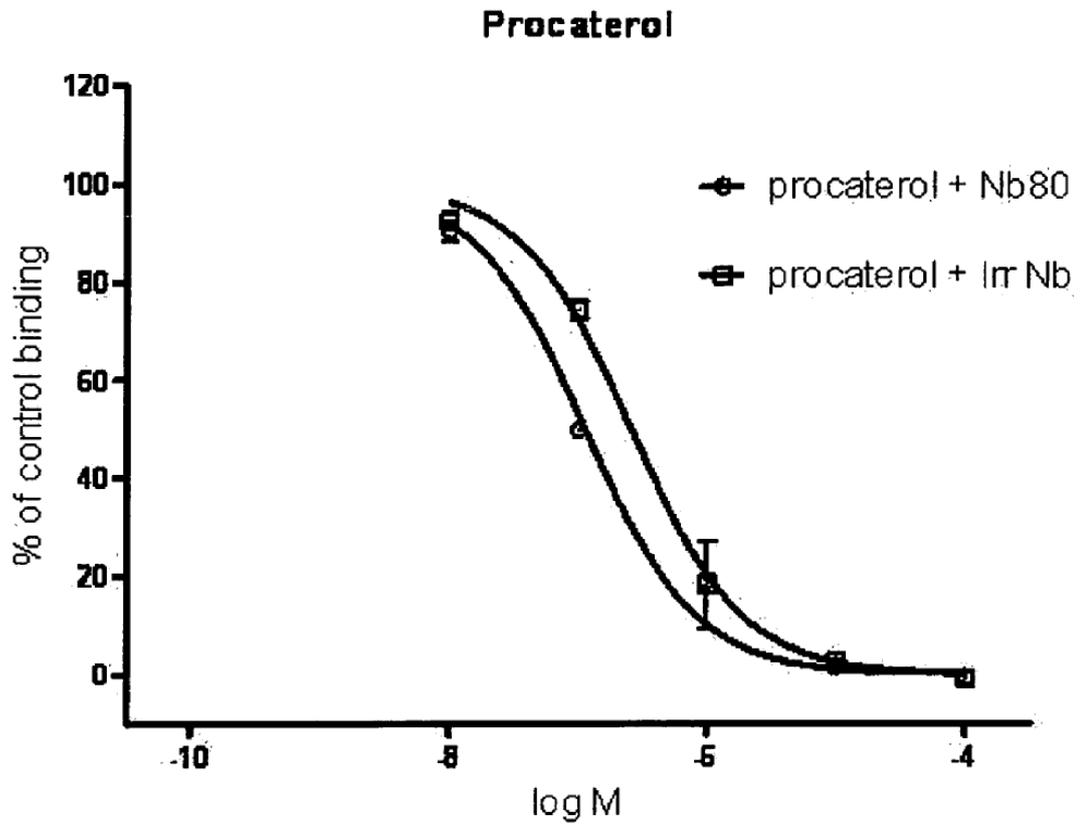


Figura 16





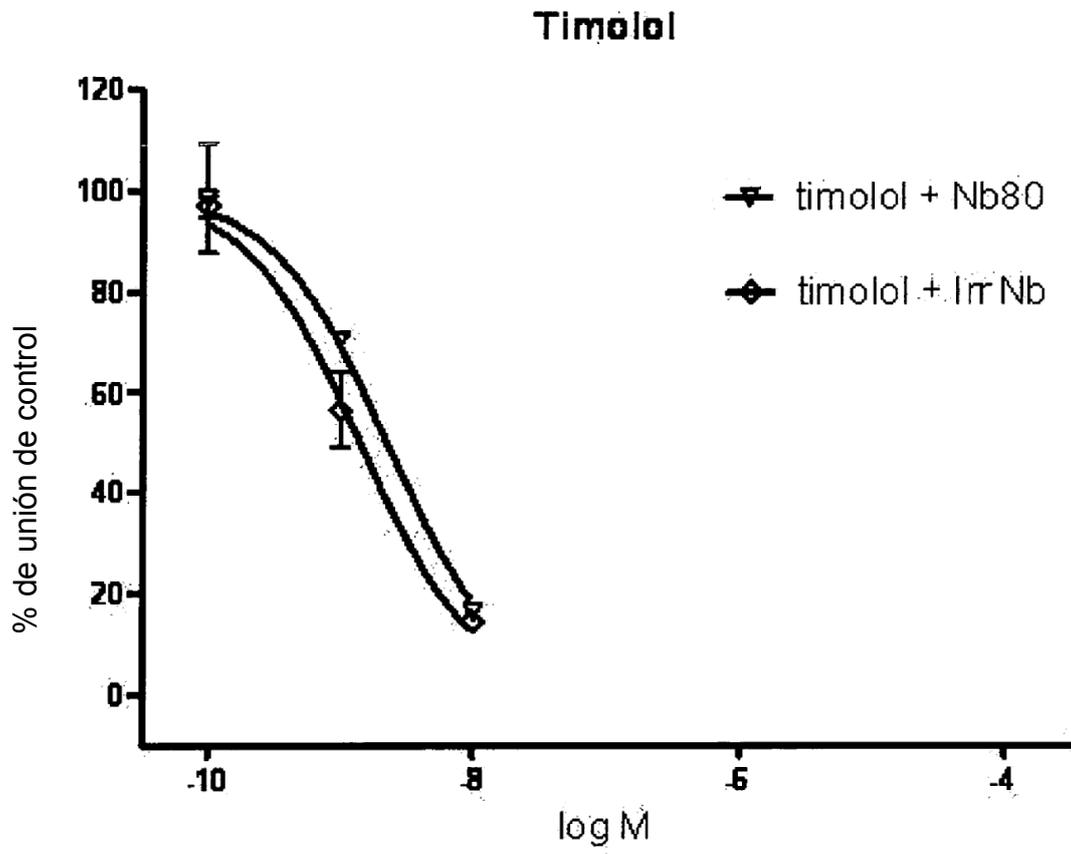


Figura 17

```

β2AR MGQ-----PGNGS-----AFLAPNGSHA----PDHDVTQERDEVVWVG 35
β1AR MGAGVLVLGASEPGLSSAAPLPDGAATAARLLVPASPPASLLPPASESPEPLSQOWTAG 60
    **          *** *          * **.* .. *      * : .: .: *..*

β2AR MGI1VMSLIVLAI2VFGNVLVITAI3AKFERLQ4TV5TNYFIT6SLACADLV7MGLAVV8PFGAAHIL 95
β1AR MGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAI9AKTPRLQ10TLTNLFIMSLASADLV11MGLLVV12PFGATIVV 120
    **.:*:*:**** ** *****.**** *****:** ** ** **..***** *****: :

β2AR MKM13WTFGNFWCFW14TSIDVLCVTASIE15TLCVIAVD16RYFAITSPF17KY18QSLLTKNKARV19IIL 155
β1AR WGRWEYGSFFCELW20TSVDVLCVTASIE21TLCVIALDRYLAI22TSPF23KY24QSLLTRARARGLVC 180
    * :*. *:*:***:*****:*****:***:*****:*****: :** :

β2AR MVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDFFTNQAYAIASSIVSFYVPLVIM 215
β1AR TVWAI25SALVSFLPILMHWWR26AESDEARRCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIM 240
    ** :*. *.*:**** **:*: ** .** : .****.*:*:*****:***** **

β2AR V27FVYSRVFQ28EAKRQLQKIDKSEGRFH-----VQ29NLSQVEQ----- 250
β1AR AFVYLRV30FREAQ31KQVKKIDSCERRFLGGPARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPRPA32AAAATAP 300
    .*** **:*:***:***:***..* **          . * *

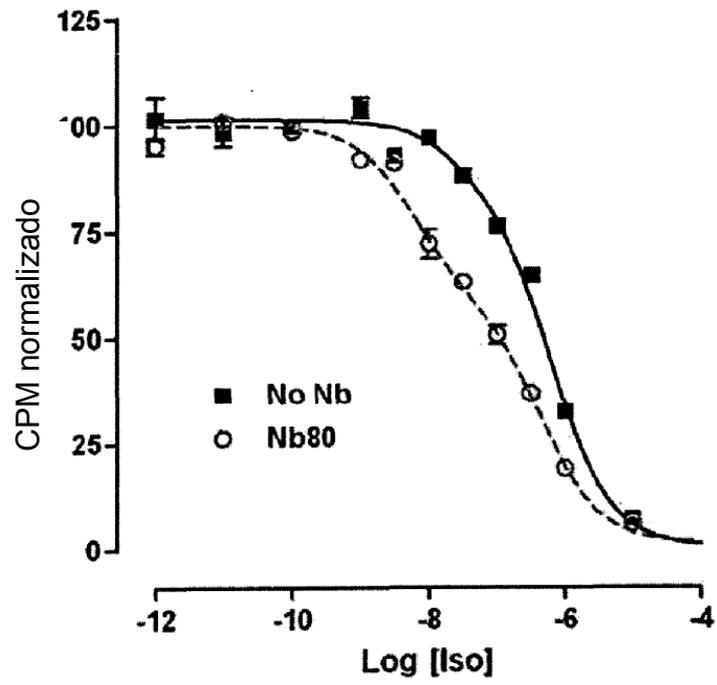
β2AR --DGR33TGHGLRRSSKFCL34KE35HKAL36KT37LG38IIMGTFTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKEVY 308
β1AR LANGRAGK--RRPSRLVAL39RE40QKAL41KT42LG43IIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFHRELVPDRLF 359
    :**:*: * * ..*:*:*****.*****:.*:*:..: :*: ..:

β2AR ILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLC44LRSSLK----AYNGYSSNGNTGEQ- 363
β1AR VFFNWLGYANSAFNPIIYCRSPDFRKA45FQRL46CCARRAARRRHATHGDRPRASGCLARPG 419
    ::**:*:*.**.*:***** **..** * : : :*: :.* ..

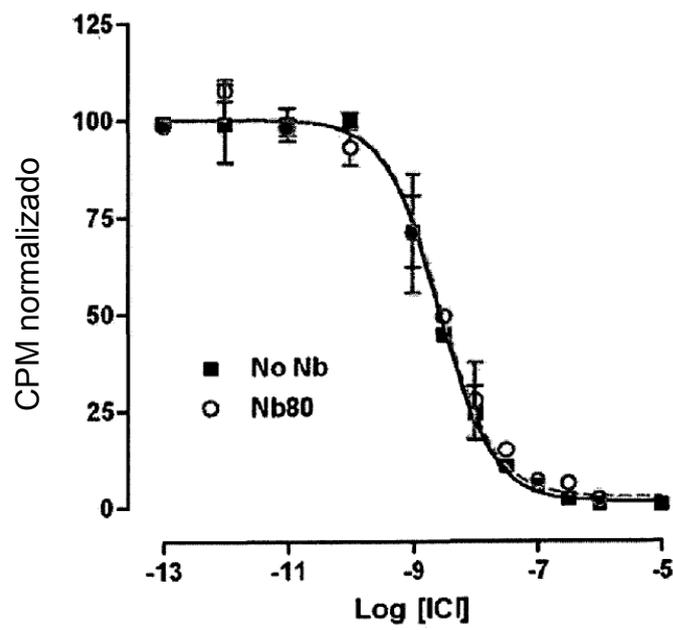
β2AR ---SGYHVEQEKENKLLCEDLPG--TEDFVGHQGTVP47SDNIDSQGRNCS---TND48SLL 413
β1AR PPPSPGAASDDDDDDVVGATPPARLLEPWAGCNGGAAADSDSSLDEPCRP49GFASESKV 477
    * ..:~::~: * . * :.* :* ..:* . * .. * :~:* :
  
```

Figura 18

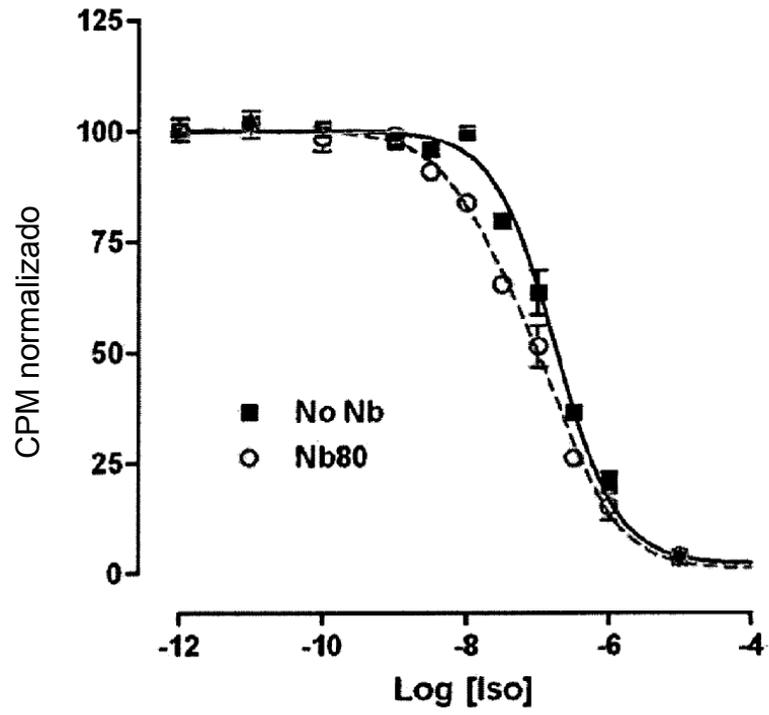
A



B



C



D

