

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 675**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2014 PCT/EP2014/051845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2014 E 14702547 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2951201**

54 Título: **Polipéptidos quiméricos novedosos para fines de examen y descubrimiento de fármacos**

30 Prioridad:

30.01.2013 US 201361758518 P
08.02.2013 EP 13154552
03.10.2013 EP 13187265

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2018

73 Titular/es:

VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Ghent, BE y
VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (50.0%)

72 Inventor/es:

STEYAERT, JAN;
LAEREMANS, TOON y
PARDON, ELS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 654 675 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

Polipéptidos quiméricos novedosos para fines de examen y descubrimiento de fármacos

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a polipéptidos novedosos y a su uso para el examen y el descubrimiento de fármacos. Más específicamente, la invención proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden un GPCR, fusionado a un dominio de unión selectivo para la conformación, en el que el dominio de unión es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y en el que el dominio de unión se dirige contra y/o se une específicamente al GPCR, en el que el GPCR se estabiliza en una conformación activa o inactiva tras la unión del dominio de unión y en el que dicho GPCR que se estabiliza en dicha conformación activa o inactiva tiene una afinidad aumentada por un ligando selectivo para la conformación en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente. También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican para tales polipéptidos quiméricos, células que pueden expresar tales polipéptidos quiméricos así como composiciones de membrana derivadas de las mismas. También se prevén métodos de examen para compuestos que usan los polipéptidos quiméricos de la invención.

Antecedentes

15 Los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos se centran generalmente en la identificación de compuestos que modulan (inhiben o potencian) la actividad de la diana de interés. Los esfuerzos para la identificación de compuestos principales convencionales avanzan a través de un examen bioquímico o basado en células o el diseño de compuestos *in silico*. Estos métodos han identificado y validado una multitud de agentes terapéuticos viables en uso en la actualidad. Sin embargo, tal como se refleja por la alta tasa de fracaso de nuevos compuestos farmacológicos (sólo una estimación del 8% de agentes terapéuticos clínicos de fase I obtienen finalmente la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos, a un coste prudente de 800 millones de \$ por fármaco), muchos esfuerzos resultan insatisfactorios y a menudo se abandonan las dianas una vez que se considera que no tienen capacidad farmacológica (Lee *et al.* 2009). Una parte considerable de estos fracasos se debe al hecho de que la mayor parte de ensayos bioquímicos o basados en células se realizan con dianas en su conformación predominante, también denominada conformación basal. Sin embargo, ahora se sabe que la flexibilidad conformacional es clave para la función y la farmacología de la mayoría de las dianas farmacológicas actuales y futuras incluyendo los GPCR, canales iónicos, receptores (nucleares), cinasas y fosfatasa. Y para muchas de estas dianas, la conformación más estable, correspondiente a la especie estructural predominante en ausencia de ligandos o proteínas auxiliares (la conformación basal), no corresponde a la conformación con capacidad farmacológica a la que debe unirse un fármaco para ser lo más eficaz para la indicación terapéutica.

Actualmente, la clase de proteína seleccionada como diana de manera más habitual para intervención farmacológica son los receptores acoplados a proteína G (los GPCR), también denominados receptores con siete dominios transmembrana (7TMR). Desempeñan papeles esenciales en respuestas fisiológicas a un conjunto diverso de ligandos tales como aminas biogénicas, aminoácidos, péptidos, proteínas, prostanoïdes, fosfolípidos, ácidos grasos, nucleósidos, nucleótidos, iones Ca^{2+} , odorizantes, potenciadores de sabores amargos y dulces, feromonas y protones (Heilker *et al.* 2009). Los ligandos ortostéricos que actúan sobre un GPCR pueden inducir un espectro de efectos sobre rutas de señalización posteriores. En general, los GPCR requieren la unión de agonistas para la activación. Los agonistas totales activan de forma máxima el receptor. Los agonistas parciales provocan una estimulación inferior a la máxima incluso a concentraciones de saturación. En algunos casos, un GPCR puede presentar actividad basal con respecto a una ruta de señalización específica incluso en ausencia de un agonista (actividad constitutiva). Los agonistas inversos pueden inhibir esta actividad basal. Particularmente, mientras que los antagonistas neutros pueden inhibir la unión de agonistas, agonistas parciales y agonistas inversos en el sitio de unión ortostérico de los GPCR, no alteran la actividad de receptor basal. En los últimos años, se han conseguido avances en el descubrimiento de ligandos novedosos para los GPCR que actúan en sitios alostéricos para regular la función del receptor, incluyendo moduladores alostéricos positivos y negativos (PAM y NAM, respectivamente) y ligandos neutros, que ofrecen modos de acción novedosos con respecto a los ligandos ortostéricos (Christopoulos 2002).

Ahora está bien establecido que los GPCR pueden señalizar a través de varios mecanismos distintos incluyendo los mediados por proteína G o las proteínas adaptadoras multifuncionales β -arrestinas (Rajagopal *et al.* 2010). Con las estructuras resueltas de varios GPCR en complejos con diversos ligandos incluyendo los agonistas inversos, antagonistas y agonistas (Cherezov *et al.* 2007, Rasmussen *et al.* 2011b, Rosenbaum *et al.* 2011, Shimamura *et al.* 2011, Xu 2011, Granier *et al.* 2012, Haga *et al.* 2012, Hanson *et al.* 2012, Kruse *et al.* 2012, Manglik *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012) y la proteína G (Rasmussen *et al.* 2011a), ahora se sabe que los GPCR son moléculas complejas a nivel conformacional con conformaciones específicas que provocan la activación de proteína G. De especial importancia en el contexto de esta invención es la observación de que en comparación con la conformación basal, sólo cambios relativamente pequeños en la estructura de la cavidad de unión a agonistas condujo a un movimiento sustancial (de hasta 14Å) y reorganizaciones en tres de los segmentos transmembrana (Lebon *et al.* 2012).

Las estrategias basadas en espectrometría de masas (Kahsai *et al.* 2011), el análisis biofísico (Yao *et al.* 2006, Mary

et al. 2012) y la espectroscopía de RMN (Liu *et al.* 2012; Bokoch *et al.* 2010) proporcionan evidencias directas de la presencia de otras conformaciones específicas de ligando distintas que conducen a la señalización mediada por arrestina. Se deduce que diferentes ligandos pueden tener efectos diferenciales sobre la conformación y el diverso repertorio de señalización y regulador de un único receptor. La importancia de estos múltiples estados conformacionales es su relevancia farmacológica. Tal como se ilustra en la figura 1, cada una de estas conformaciones de receptor puede considerarse una diana farmacológica terapéutica independiente porque cada una de estas conformaciones fomenta distintas eficacias relativas con respecto a los diferentes sistemas efectores incluyendo proteína Gs y arrestinas.

Los enfoques de descubrimiento de fármacos pueden aprovecharse de manera considerable de la captura de la diana en una conformación terapéuticamente relevante, con capacidad farmacológica. La estabilización de un receptor en una conformación funcional particular paralizaría inherentemente el receptor en una única conformación con capacidad farmacológica, con relevancia patológica revelando nuevas características estructurales que son adecuadas para seleccionar como diana con moléculas pequeñas o productos biológicos y puede permitir la identificación de compuestos que son selectivos para esa conformación con capacidad farmacológica. La estabilización de una conformación única con capacidad farmacológica, incluyendo estados inactivos correspondientes a sistemas efectores por debajo de la actividad basal o estados funcionales particulares que activan sistemas efectores individuales podría conducir no sólo a compuestos con mejores eficacias terapéuticas pero también podría beneficiarse de la identificación de compuestos con menos efectos secundarios no deseados que resultan de la activación de rutas no deseadas (Galandrin *et al.* 2007).

Además de eso, la flexibilidad conformacional es un problema en el examen de alto rendimiento (HTS) y el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (FBDD) (Lawson 2012). En HTS, pueden superarse en algunos casos problemas de diferentes conformaciones de una diana usando ensayos de sistema completo con una lectura funcional en vez de ensayos con sistemas recombinantes reduccionistas (Kenakin, 2009; Rajagopal *et al.* 2010). Sin embargo, en FBDD, no pueden usarse ensayos de sistema completo por la baja eficacia/potencia de las coincidencias iniciales, requiriendo a menudo concentraciones mM de los fragmentos para que haya actividad biológica y que se produzca toxicidad. Se deduce que las selecciones primarias de alto rendimiento se beneficiarían considerablemente de receptores diana que se estabilizan en la conformación funcional deseada en ausencia de ligandos o proteínas auxiliares. El acceso a tales receptores estabilizados a nivel conformacional permitiría la identificación del subconjunto de ligandos que son específicos para esa conformación con sus características estructurales particulares (figura 1). De este modo, puede realizarse una primera selección de los compuestos potencialmente activos biológicamente usando una simple evaluación de la unión antes de establecer sus perfiles de eficacia en una variedad de ensayos de señalización (de sistema completo).

La flexibilidad conformacional también obstruye el descubrimiento de fármacos basado en la estructura partiendo de fragmentos. En primer lugar, muchas de las posibles coincidencias del examen basado en fragmentos (FBS) no son lo suficientemente potentes como para desplazar cuantitativamente el equilibrio conformacional a una única conformación del complejo proteína-ligando que puede cristalizar en un cristal de difracción. Si no puede cristalizar un complejo, emparar los cristales existentes de proteína libre de ligando con (pequeños) ligandos es a menudo el método de elección para obtener cristales del complejo. Sin embargo, si estos ligandos desplazan el equilibrio conformacional de una proteína compleja a nivel conformacional, estos cambios conformacionales inducidos destruirán en muchos casos los cristales (Danley 2006).

Con las estructuras resueltas de los primeros GPCR en 2007 (Rasmussen *et al.* 2007, Rosenbaum *et al.* 2007), se entró en una nueva era de la biología estructural de GPCR, planteando la posibilidad de aplicar enfoques basados en la estructura a esfuerzos de descubrimiento de fármacos de GPCR (Shoichet y Kobilka 2012). Para un gran número de dianas farmacológicas de GPCR relacionadas con varias indicaciones terapéuticas, el estado activo unido a agonista es a menudo la conformación con capacidad farmacológica. Resolver la estructura a alta resolución de un GPCR en esta conformación con "capacidad farmacológica" terapéuticamente relevante sigue siendo un reto. Los esfuerzos para obtener una estructura de GPCR de estado activo unido a agonista ha demostrado ser difícil debido a la inestabilidad inherente de este estado en ausencia de una proteína G. Las estructuras de los GPCR en complejos con agonistas totales se han resuelto pero no sin dificultades. En primer lugar, los agonistas naturales generalmente no estabilizan suficientemente el receptor para la formación de cristales con calidad para difracción. En un intento de resolver este problema, se han unido covalentemente los agonistas a los GPCR con fines de cristalización. Sin embargo, por ejemplo, la estructura cristalina de un β_2 AR unido a agonista covalente revela una conformación que se asemeja estrechamente a un estado inactivo más que al estado activo con sólo pequeñas reorganizaciones en los segmentos transmembrana (Rosenbaum *et al.* 2011) (Lebon *et al.* 2012).

Otro enfoque para la determinación de conformaciones de unión a agonista de un GPCR es la termoestabilización del receptor mediante mutagénesis sistemática seguida por la medición del aumento de termoestabilización en presencia de agonista unido (por ejemplo, los documentos WO2008114020, WO2009071914, WO2010149964, WO2012098413). Por ejemplo, se han descubierto mutaciones de termoestabilización para A_2A AR unido a agonista (Lebon *et al.* 2011), el receptor β_1 -adrenérgico unido a agonista (Warne *et al.* 2011) y el receptor de neurotensina unido a agonista (White *et al.* 2012). Sin embargo, basándose en el pequeño desplazamiento de la hélice transmembrana 6, es probable que las estructuras de estos receptores estabilizados unidos a agonista no estén en la conformación totalmente activa. De manera más importante y en contraposición al estado activo que se estabiliza

mediante una proteína G o un mimético de proteína G, estos receptores termoestabilizados no muestran un aumento significativo de las afinidades por sus agonistas respectivos (Serrano-Vega *et al.* 2008, Shibata *et al.* 2009, Lebon *et al.* 2011).

Sólo recientemente, resultó posible obtener estructuras de un estado activo unido a agonista de un GPCR, haciendo uso de Nanobodies selectivos a nivel conformacional (Xaperone™) que imitan la función de proteína G y aumentan la afinidad por agonistas en el sitio ortostérico (Rasmussen *et al.* 2011b). Xaperone son herramientas útiles para bloquear la estructura de los GPCR en una conformación terapéuticamente relevante (Steyaert & Kobilka, 2011) y facilitar el descubrimiento de candidatos a fármaco al aumentar la sensibilidad y selectividad de los métodos de examen existentes (documento WO2012007593). Sin embargo, este enfoque tecnológico también tiene sus limitaciones. Dado que la unión del agonista en el sitio ortostérico aumenta la afinidad por Xaperone™ que imita a proteína G en el lado intracelular alostérico del receptor y viceversa (Rasmussen *et al.* 2011b), el complejo GPCR-Xaperone™ es mucho más estable en presencia de un agonista. Se deduce que han de cristalizarse conjuntamente un GPCR, un Xaperone™ de estabilización y agonista para obtener cristales de GPCR en su conformación activa y que la invención descrita en el documento WO2012007593 no es muy adecuada para enfoques de descubrimiento de fármacos basados en la estructura que implican, por ejemplo, empapar ligandos en cristales existentes porque el agonista que se ha usado para hacer crecer los cristales competirá con el ligando que se empapa posteriormente.

Por tanto, el desarrollo de nuevos métodos que estabilizan constitutivamente los GPCR en una conformación con capacidad farmacológica particular, incluso en ausencia de agonistas, sería una baza importante para mejorar el descubrimiento de fármacos mediante el examen de compuestos y/o el diseño de fármacos basado en la estructura.

20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona esencialmente un GPCR que se estabiliza en una conformación terapéuticamente relevante. Este enfoque novedoso captura el GPCR en una conformación de interés para revelar características estructurales novedosas que son adecuadas para la selección como diana con moléculas pequeñas o productos biológicos para intervención terapéutica. La estabilización constitutiva de una conformación única de GPCR se obtiene fusionando el GPCR de interés con un dominio de unión selectivo para la conformación, opcionalmente separado por un ligador, y es el resultado de una reacción intramolecular de ambos restos dentro de una única proteína. Los polipéptidos de fusión resultantes, también denominados en el presente documento polipéptidos quiméricos, son particularmente interesantes puesto que pueden tener propiedades estructurales que difieren significativamente de las del GPCR en la forma no quimérica y como tal pueden servir como herramientas innovadoras novedosas para el desarrollo de nuevos fármacos, más potentes o más selectivos.

Una ventaja clave de los polipéptidos quiméricos de la presente invención es que se garantiza una estequiometría 1:1 definida de GPCR con respecto al dominio de unión en una única proteína, forzando la proximidad física de las parejas de fusión, mientras que se mantienen las propiedades del dominio de unión para estabilizar el receptor en una conformación con capacidad farmacológica particular. Para ilustrar esto, y sin el propósito de ser limitativo, se han construido varias fusiones genéticas de los segmentos génicos que codifican para un GPCR y un Nanobody selectivo para la conformación (véanse los ejemplos 1, 9, 13, 17, 20) y se han analizado las propiedades farmacológicas de los polipéptidos de fusión GPCR-Nanobody expresados (véanse los ejemplos 6, 8, 12, 16, 19, 22, 24-25). Se muestra que las propiedades de paneles particulares de Nanobodies, tales como los que estabilizan conformaciones activas de los GPCR o los que estabilizan conformaciones inactivas de los GPCR, se mantienen en tales fusiones genéticas 1:1. Por ejemplo, el receptor β 2-adrenérgico (β 2AR) fusionado a Nb80, un Nanobody que imita la función de proteína G y estabiliza la conformación activa acoplada a señalización de proteína G (documento WO2012007593), muestra una afinidad aumentada 2072 veces para el agonista natural epinefrina y muestra una afinidad disminuida 43 veces para el agonista inverso ICI118,551, en comparación con el receptor fusionado a un Nanobody simulado que no se dirige contra y no se une específicamente a β 2AR (véase el ejemplo 6). El hallazgo de que la fusión β 2AR-Nb80 se une al agonista natural epinefrina de manera 2000 veces más fuerte que β 2AR fusionado a un Nanobody simulado indica que estas proteínas de fusión restringidas a nivel conformacional muestran un aumento de las afinidades de ligando con relación a un sistema efector particular como señalización mediada por proteína G. La observación de que la fusión β 2AR-Nb80 también muestra una afinidad aumentada por agonistas sintéticos tales como isoproterenol o salbutamol indica que tales proteínas de fusión restringidas a nivel conformacional pueden proporcionar un mejor punto de partida para examinar compuestos sintéticos o productos biológicos que activan/inhiben rutas de señalización particulares. Por consiguiente, moléculas pequeñas o fragmentos que reconocen selectivamente características estructurales de sitios ortostéricos o alostéricos que son únicos para la conformación activa de β 2AR (lo que conduce a señalización acoplada a proteína G) puede unirse de manera hasta 3 órdenes de magnitud más fuerte a la fusión β 2AR-Nb80 1:1 en comparación con el receptor no restringido en su estado activo. Con fines de HTS, esto significa que la sensibilidad para escoger compuestos de prueba que inducen señalización acoplada a proteína G puede aumentarse en 3 órdenes de magnitud si se realiza tal examen con una fusión GPCR-Nb tal como la fusión β 2AR-Nb80, en comparación con los esfuerzos de HTS con β 2AR no restringido en su estado activo.

La estequiometría 1:1 bien definida de la interacción intramolecular entre el GPCR y el dominio de unión de los polipéptidos quiméricos de la presente invención no puede mantenerse/garantizarse tan eficazmente en

interacciones intermoleculares, ni con un GPCR que se estabiliza en una conformación específica mediante la adición exógena de un dominio de unión selectivo para la conformación (documento WO2012007593), ni en un sistema celular mediante el cual se coexpresa un GPCR con un dominio de unión selectivo para la conformación. Una ventaja particular relacionadas con la estequiometría 1:1 definida es que el resto de dominio de unión puede restringir una conformación de receptor particular a una alta concentración intramolecular eficaz, incluso en ausencia de cualquier ligando selectivo para la conformación (véase el ejemplo 8).

HTS basado en técnicas de unión a receptor clásicas tales como ensayos de competencia de radioligandos (inhibición o desplazamiento) para examinar selectivamente un subconjunto de ligandos que son específicos para una conformación con capacidad farmacológica particular de un GPCR dado puede beneficiarse considerablemente de los polipéptidos quiméricos de la invención en comparación con complejos no covalentes de GPCR con un Nanobody que estabiliza la conformación con capacidad farmacológica (documento WO2012007593) (Rasmussen *et al.* 2011b). Esto se debe al hecho de que los ensayos de competencia de radioligandos (o ensayos de competencia de ligandos marcados mediante otros medios) se basan de manera crítica en la separación física de ligando libre y ligando unido a receptor. Esto se realiza habitualmente mediante filtración en un filtro, mediante centrifugación, mediante cromatografía de exclusión molecular o mediante otros métodos biofísicos. La separación del ligando libre (marcado mediante cualquier medio) del ligando marcado unido a la fusión GPCR-dominio de unión puede lograrse fácilmente usando los mismos métodos convencionales porque la quimera se une covalentemente en una estequiometría 1:1 definida de GPCR con respecto al dominio de unión. En caso de que el dominio de unión no se una covalentemente al GPCR (documento WO2012007593), los ensayos de competencia de radioligandos y el análisis posterior de los datos son mucho más difíciles de realizar porque la estequiometría 1:1 de GPCR con respecto al dominio de unión no se mantiene, lo que implica la necesidad de separar y analizar muchas más especies moleculares: ligando libre, dominio de unión libre, complejo ligando-receptor, complejo receptor-dominio de unión, complejo ligando-receptor-dominio de unión frente a ligando libre, quimera libre y complejo ligando-quimera en el caso de una fusión GPCR-dominio de unión (véase el ejemplo 8).

Además, las características innovadoras de las proteínas de fusión GPCR-dominio de unión de la presente invención también permite conformaciones funcionales particulares de los GPCR que van a examinarse para determinar la unión de compuestos principales o fragmentos usando métodos biofísicos emergentes incluyendo resonancia de plasmón superficial (Rich *et al.* 2011) y examen por RMN con diana inmovilizada (Fruh *et al.* 2010), porque el GPCR puede inmovilizarse como única fusión proteica en la conformación funcional deseada en la fase sólida en una estequiometría 1:1 definida de GPCR con respecto al dominio de unión.

Además, es particularmente sorprendente que las proteínas de fusión GPCR-dominio de unión de la presente invención permitan examinar y distinguir entre agonistas, antagonistas y agonistas inversos en un único ensayo comparativo de competencia de radioligandos. La capacidad para distinguir y predecir el modo de acción de compuestos sometidos a prueba a concentraciones nM- μ M sin la necesidad de un ensayo de señalización de receptor celular es una ventaja adicional para el examen de compuestos (véanse los ejemplos 24-26).

Otra ventaja de estas proteínas de fusión GPCR-dominio de unión en una estequiometría 1:1 definida se refiere a la cristalografía de rayos X de los GPCR y sus aplicaciones en el diseño de fármacos basado en la estructura. Más particularmente, una ventaja de la fusión GPCR-dominio de unión es que la proteína de fusión puede purificarse y cristalizarse en una estequiometría 1:1 definida en presencia o ausencia de cualquier ligando. Por tanto, pueden determinarse múltiples estructuras de co-complejo ligando-receptor, simplemente empapando los compuestos en la fusión GPCR-dominio de unión libre de ligando, con la ventaja adicional de que este sistema cristalino queda atrapado en una conformación de receptor predefinida tal como, por ejemplo, una conformación activa, lo que conduce a señalización acoplada a proteína G y/o β -arrestina, o una conformación inactiva que no puede fomentar la señalización acoplada a proteína G y/o arrestina. Esta posibilidad de empapar/cristalizar conjuntamente el receptor libre de ligando con compuestos principales (de baja afinidad) es un requisito previo para la generación de compuestos principales que implica el examen virtual y durante la parte de optimización de compuestos principales de descubrimiento de fármacos, por ejemplo abordar problemas de selectividad y solubilidad.

Por tanto, según un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un resto de GPCR y un resto de dominio de unión, en el que el polipéptido quimérico comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión selectivo para la conformación, en el que dicho dominio de unión es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y en el que dicho dominio de unión se dirige contra y/o puede unirse específicamente al GPCR, en el que el GPCR se estabiliza en una conformación activa o inactiva tras la unión del dominio de unión y en el que dicho GPCR que se estabiliza en dicha conformación activa o inactiva tiene una afinidad aumentada por un ligando selectivo para la conformación en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente. Según una realización particular, el dominio de unión se fusiona al GPCR o bien directamente o bien a través de un ligador. En una realización particular, el dominio de unión no es una pareja de unión que se produce de manera natural, tal como una proteína G o una arrestina.

Según una realización particular, la invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión que es selectivo para la conformación activa, de modo que el GPCR se estabiliza en una conformación activa tras la unión del dominio de unión. Según realizaciones específicas, la conformación activa es una conformación activa de unión a agonista, tal como una conformación activa de unión a agonista total o

- una conformación activa de unión a agonista parcial. Alternativamente, la invención también se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión que es selectivo para una conformación inactiva, de modo que el GPCR se estabiliza en una conformación inactiva tras la unión del dominio de unión. Según una realización, la conformación inactiva es una conformación de agonista inverso. El polipéptido quimérico de la invención que comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión selectivo para la conformación tiene una afinidad aumentada por un ligando selectivo para la conformación en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente.
- Según realizaciones más específicas, la invención proporciona polipéptidos quiméricos tal como se describió anteriormente, en el que el dominio de unión se une específicamente a un epítipo conformacional intracelular de GPCR, más particularmente en el que dicho epítipo intracelular está comprendido en un sitio de unión para una proteína de señalización posterior (por ejemplo, un sitio de unión a proteína G). Alternativamente, en polipéptidos quiméricos tal como se describió anteriormente, el dominio de unión puede unirse a un epítipo conformacional extracelular de GPCR.
- El dominio de unión de la invención puede ser un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se deriva de un anticuerpo sólo de cadena pesada. Lo más preferiblemente, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina comprende una secuencia de VHH o una secuencia de Nanobody.
- En realizaciones, el GPCR en el polipéptido quimérico es un GPCR que se produce de manera natural, o una variante de un GPCR que se produce de manera natural o una forma truncada de un GPCR que se produce de manera natural, en el que el GPCR se elige preferiblemente del grupo que comprende un GPCR de la familia de glutamato de los GPCR, un GPCR de la familia de rodopsina de los GPCR, un GPCR de la familia de adhesión de los GPCR, un GPCR de la familia de Frizzled/Taste2 de los GPCR, y un GPCR de la familia de secretina de los GPCR. En otro aspecto, la invención prevé un complejo que comprende un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente y un ligando de receptor. Un complejo de este tipo puede estar en disolución o ser cristalino.
- Además, también están englobadas moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente, así como células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos. Las células huésped pueden ser de origen procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula de insecto. También se prevén composiciones de membrana que comprenden el polipéptido quimérico o el complejo tal como se describe en el presente documento.
- Además, la invención también proporciona un método para presentar un GPCR en una conformación activa o inactiva en la superficie celular o en una fracción de membrana celular particular de una célula huésped, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una célula huésped que comprende un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente y cultivar la célula en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido quimérico.
- Un aspecto adicional de la invención es un método de identificación de compuestos selectivos para la conformación, tales como un anticuerpo o una molécula pequeña agonista, comprendiendo el método las etapas de
- (i) proporcionar un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente, y
 - (ii) proporcionar un compuesto de prueba, y
 - (iii) evaluar la unión selectiva del compuesto de prueba al GPCR comprendido en el polipéptido quimérico.
- El compuesto selectivo para la conformación (una molécula pequeña, un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un péptido o cualquier otro armazón proteico que pueda interactuar con un GPCR) que se identifica mediante el método anterior puede ser un agonista no sesgado, un agonista inverso no sesgado, o ligandos sesgados que activan o inhiben la señalización acoplada a proteína G o acoplada a arrestina, respectivamente. Según una realización particular, el método tal como se describió anteriormente comprende además la etapa de clasificar los compuestos de prueba según la actividad biológica (actividad como agonista, agonista inverso, actividad como antagonista). O dicho de otro modo, el método descrito anteriormente permite distinguir entre agonistas, agonistas inversos y actividad como antagonista.
- También está englobado el uso de un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente o un complejo tal como se describió anteriormente para cristalizar y/o para resolver la estructura de GPCR; para capturar un GPCR en un estado conformacional funcional.
- Se describen aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la divulgación en la descripción a continuación y en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Complejidad conformacional de la señalización de GPCR. Representación esquemática de la eficacia

sesgada por ligando, en la que tres ligandos diferentes pueden inducir y/o estabilizar diferentes conformaciones de receptor que fomentarán cada una distintas eficacias relativas con respecto a diferentes sistemas efectores. Abreviaturas: R, receptor; A, B y C, proteínas o grupo de proteínas implicados en una ruta de señalización específica. (Adaptado a partir de Galandrin *et al.* 2007).

5 Figura 2: Las fusiones β 2AR-Nanobody descritas en el ejemplo 1 contienen dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el GPCR β 2AR365N, el ligador GGGGSGGGG (subrayado y resaltado en negrita), un Nanobody. Están subrayados el péptido señal de HA y la etiqueta peptídica de His6. La etiqueta FLAG está representada en negrita, el sitio de escisión de TEV está indicado en tono gris. A. Representación en dibujo de los constructos de fusión β 2AR-Nanobody. B. La secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto codificado por pFastBac β 2AR365N-Nb80. C. La secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto codificado por pFastBac β 2AR365N-Nb71. D. La secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto codificado por pFastBac β 2AR365N-Nb69. E. La secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto codificado por pFastBac β 2AR365N-Nb60.

15 Figura 3: Expresión de proteínas de fusión β 2AR-Nanobody recombinantes en células Sf9 analizadas mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se detectó la presencia de proteína de fusión mediante detección de anticuerpos anti-FLAG tal como se explica en el ejemplo 4. Membranas de células Sf9 no infectadas (carril 1). Membranas de células Sf9 que expresan β 2AR365N recombinante que no se fusionó a ningún Nb (carril 2: se infectaron células con una dilución 1:250 de P2 y se cultivaron durante 48 horas; carril 3: se infectaron células con una dilución 1:250 de P2 y se cultivaron durante 55 horas; carril 5: se infectaron células con una dilución 1:100 de P2 y se cultivaron durante 48 horas; carril 6: se infectaron células con una dilución 1:100 de P2 y se cultivaron durante 55 horas). Marcador de proteína (marcador de peso molecular de proteína teñido previamente PageRulerTM, n.º de cat. de Fermentas SM0671) (carril 4). Membranas de células Sf9 que expresan β 2AR365N-Nb80 recombinante (carril 7: se infectaron células con una dilución 1:100 de P2 y se cultivaron durante 55 horas). Membranas de células Sf9 que expresan β 2AR365N-Nb71 recombinante (carril 8: se infectaron células con una dilución 1:100 de P2 y se cultivaron durante 55 horas). Membranas de células Sf9 que expresan β 2AR365N-Nb69 recombinante (carril 9: se infectaron células con una dilución 1:100 de P2 y se cultivaron durante 55 horas).

30 Figura 4: Propiedades de unión a ligandos de la fusión β 2AR365N-Nb80 en comparación con la fusión simulada β 2AR365N-Nb69. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de diferentes ligandos que compiten con [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) por la unión a β 2AR365N-Nb80 (círculos en blanco) y que usan la quimera β 2AR365N-Nb69 (círculos rellenos) como referencia interna para el receptor β 2-adrenérgico no restringido tal como se describe en el ejemplo 6. Se realizaron ensayos de competencia con ambos receptores usando el agonista natural epinefrina (A), el agonista (-)-isoproterenol (B), el antagonista neutro alprenolol (C), el agonista parcial salbutamol (D), el agonista inverso ICI-118,551 (E) y el antagonista carvedilol (F) como ligando competidor, respectivamente. Se han ajustado curvas mediante regresión no lineal a un modelo para unión competitiva usando los parámetros convencionales de Graphpad Prism 6.0. Se han ajustado los valores marcados como CI50 a un modelo competitivo de un sitio de unión. Se han ajustado los valores marcados como CI50^{alta} a un modelo competitivo de dos sitios de unión y corresponden a la CI50 del sitio de mayor afinidad.

40 Figura 5: Propiedades de unión a ligandos de la fusión β 2AR365N-Nb80 en comparación con β 2AR365N no fusionado. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de diferentes ligandos que compiten con [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) por la unión a β 2AR365N-Nb80 (cuadrados en blanco) y que usan el receptor β 2AR365N no fusionado (cuadrados rellenos) como referencia interna para el receptor β 2-adrenérgico no restringido tal como se describe en el ejemplo 6. Se realizaron ensayos de competencia con ambos receptores usando el agonista natural epinefrina (A) y el antagonista carvedilol (B) como ligando competidor, respectivamente. Se han ajustado curvas mediante regresión no lineal a un modelo para unión competitiva usando los parámetros convencionales de Graphpad Prism 6.0. Se han ajustado los valores marcados como CI50 a un modelo competitivo de un sitio de unión. Se han ajustado los valores marcados como CI50^{alta} a un modelo competitivo de dos sitios de unión y corresponden a la CI50 del sitio de mayor afinidad.

50 Figura 6: Propiedades de unión a ligandos de β 2AR365N-Nb71 fusión en comparación con la fusión β 2AR365N-Nb69. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de diferentes ligandos que compiten con [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) por la unión a β 2AR365N-Nb71 (triángulos en blanco) y que usan la quimera β 2AR365N-Nb69 (triángulos rellenos) como referencia interna para el receptor β 2-adrenérgico no restringido tal como se describe en el ejemplo 6. Se realizaron ensayos de competencia con ambos receptores usando el agonista natural epinefrina (A), el agonista total isoproterenol (B), el antagonista neutro alprenolol (C), el agonista parcial salbutamol (D), el agonista inverso ICI-118,551 (E) y el antagonista carvedilol (F) como ligando competidor, respectivamente. Se han ajustado curvas mediante regresión no lineal a un modelo para unión competitiva usando los parámetros convencionales de Graphpad Prism 6.0. Se han ajustado los valores marcados como CI50 a un modelo competitivo de un sitio de unión. Se han ajustado los valores marcados como CI50^{alta} a un modelo competitivo de dos sitios de unión y corresponden a la CI50 del sitio de mayor afinidad.

Figura 7: Termoestabilidad de la fusión β 2AR365N-Nb80 en comparación con la fusión β 2AR365N-Nb69. Termoestabilidades de las proteínas de fusión solubilizadas en DDM libres de ligando β 2AR365-Nb80 (rombos en

afinidad.

- Figura 14. Alineación de secuencias de aa de Mor1 humano silvestre de longitud completa (código de Uniprot P35372; SEQ ID NO: 46) y Mor1 de ratón (código de Uniprot P42866; SED ID NO: 45). Para la purificación de Mor1 de ratón, que se expresa en células Sf9, se ha introducido un sitio de escisión de proteasa TEV N-terminal (extremo N-terminal; expresión en células de insecto de Mor1 de ratón) entre las dos glicinas subrayadas. También se ha introducido un sitio de escisión de proteasa 3C C-terminal entre la isoleucina subrayada y el ácido glutámico subrayado en Mor1 de ratón y humano expresado en Sf9. Los bucles intracelulares (ICL) teóricos y el extremo C-terminal intracelular según la base de datos Uniprot se representan en tono gris. Los residuos de aa que se han deletado en los constructos de fusión Mor-Nanobody están tachados.
- 5
- Figura 15: Las fusiones Mor1-Nanobody descritas en el ejemplo 20 contienen dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el GPCR Mor1, el ligador 34 GS (subrayado y resaltado en negrita) y un Nanobody. Están subrayados el péptido señal de HA y la etiqueta peptídica de His6. La etiqueta FLAG está representada en negrita. El sitio de escisión 3C está indicado en tono gris. A. Representación en dibujo de los constructos de fusión Mor1-Nanobody. B-E. La secuencia de aminoácidos de los cuatro marcos de lectura abiertos Mor-Nb.
- 10
- Figura 16: Propiedades de unión a ligandos de la fusión hMor1-Nb33 en comparación con la fusión simulada hMor1-Nb10. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de diferentes ligandos que compiten con radioligando por la unión a hMor1-Nb33 (círculos) que usan la quimera hMor1-Nb10 (cuadrados) como referencia interna para el receptor no restringido. Se realizaron ensayos de competencia con ambos receptores usando los agonistas Dmt1-Dalda (A), KGOP01 (B) y el antagonista naloxona (C) como ligando competidor.
- 15
- Figura 17. Unión comparativa a fragmentos con diferentes perfiles de actividad con respecto a fusiones de β 2AR. Ejemplo representativo de la unión de 6 fragmentos a la fusión β 2AR365N-Nb80 estabilizada en estado activo (barras en blanco) frente a la fusión β 2AR365N-Nb69 de conformación no restringida, predominante (barras en negro), medido mediante ensayos de desplazamiento de radioligandos usando [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) como radioligando. 2 fragmentos (AC23506, CC56213) muestran un perfil como agonista, 2 fragmentos (CC46746, CC44914) tienen un perfil antagonista y 2 fragmentos (KM08985) muestran un perfil como agonista inverso.
- 20
- Figura 18. Curvas de respuesta a la dosis de 6 fragmentos a la fusión β 2AR-Nb80 en comparación con la fusión β 2AR-Nb69. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de 6 fragmentos diferentes que compiten con [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) por la unión a β 2AR365N-Nb80 (círculos en blanco) y que usan la quimera β 2AR365N-Nb69 (círculos rellenos) como referencia interna para el receptor β 2-adrenérgico no restringido tal como se describe en el ejemplo 24. Se realizaron ensayos de competencia con las fusiones de receptores β 2 usando 2 fragmentos con perfil como agonista (A), 2 fragmentos con perfil como antagonista (B) y 2 fragmentos con perfil como agonista inverso (C) como ligando competidor, respectivamente. Se han ajustado curvas mediante regresión no lineal con la ecuación de log(agonista) frente a la respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros) usando Prism usando Graphpad Prism 6.0. (GraphPad Software, San Diego, CA).
- 25
- Figura 19: Propiedades de unión de fragmentos elaborados a la fusión β 2AR-Nb80 en comparación con la fusión simulada β 2AR-Nb69. Ensayos de desplazamiento de radioligandos de diferentes fragmentos elaborados y parentales originales que compiten con [3 H]-dihidroalprenolol ([3 H]-DHA) por la unión a β 2AR365N-Nb80 (símbolos rellenos), que usan la quimera β 2AR365N-Nb69 (símbolos en blanco) como referencia interna para el receptor β 2-adrenérgico no restringido. Se realizaron ensayos de competencia con las fusiones de receptores β 2 usando (A) CC40246 (línea continua), los fragmentos elaborados: compuesto 2 (línea discontinua) y compuesto 3 (línea de puntos) como ligando competidor, respectivamente y (B) CC56213 (línea continua), los fragmentos elaborados: compuesto 9 (línea discontinua) y compuesto 10 (línea de puntos) como ligando competidor, respectivamente. Se han ajustado curvas mediante regresión no lineal a un modelo para unión competitiva usando los parámetros convencionales de Graphpad Prism 6.0. Se han ajustado los valores marcados como CI50 a un modelo competitivo de un sitio de unión.
- 30
- 35
- 40
- 45

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos pero la invención no se limita a los mismos, sino sólo por las reivindicaciones. Cualquier símbolo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como que limita el alcance. Los dibujos descritos son sólo esquemáticos y no son limitativos. En los dibujos, puede exagerarse el tamaño de algunos de los elementos y no trazarse a escala con fines ilustrativos. Cuando se usa el término “que comprende” en la presente descripción y las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Cuando se usa un artículo indefinido o definido al hacer referencia a un nombre en singular, por ejemplo “un(o)” o “una”, “el/la”, esto incluye el plural de ese nombre a menos que se establezca específicamente otra cosa. Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Ha de entenderse que los términos así usados son intercambiables en las circunstancias apropiadas y que las realizaciones descritas en el presente documento pueden funcionar en otras
- 50
- 55

secuencias que las descritas o ilustradas en el presente documento.

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, las expresiones y los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que entienden con frecuencia los expertos habituales en la técnica. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, biología molecular y celular, biología estructural, biofísica, farmacología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento se conocen bien y se usan con frecuencia en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan en la totalidad de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otro modo. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, y suplementos hasta 2002); Rup, *Biomolecular crystallography: principles, Practice and Applications to Structural Biology*, 1ª edición, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, Informa Business, N.Y. (2009); Limbird, *Cell Surface Receptores*, 3d ed., Springer (2004).

Los términos “polipéptido quimérico”, “proteína quimérica”, “polipéptido de fusión”, “proteína de fusión” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una proteína que comprende al menos dos componentes de polipéptido independientes y distintos que pueden originarse o no a partir de la misma proteína. Los componentes de polipéptido, aunque que normalmente no están unidos en su estado nativo, se unen mediante sus extremos amino y carboxilo-terminales respectivos a través de una unión peptídica para formar un único polipéptido continuo. Por ejemplo, una proteína de interés fusionada a un anticuerpo es un ejemplo de una proteína quimérica. Un medio conveniente para unir o fusionar dos polipéptidos es expresándolos como una proteína de fusión a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un primer polinucleótido que codifica para un primer polipéptido operativamente unido a un segundo polinucleótido que codifica para el segundo polipéptido. Si no, los polipéptidos comprendidos en una proteína de fusión pueden unirse a través de enlaces peptídicos que resultan de corte y empalme de proteína mediado por inteína (Muralidharan y Muir 2006) o la técnica *sortagging* (transpeptidación mediada por sortasa) (Popp *et al.* 2007) o pueden unirse químicamente mediante cualquier otro medio. Normalmente, un polipéptido quimérico no existirá como polipéptido contiguo en una proteína codificada por un gen en un genoma no recombinante. El término “polipéptido quimérico” y sus equivalentes gramaticales se refieren a una molécula que no se produce de manera natural lo que significa que es artificial. El término “fusionado a”, y sus equivalentes gramaticales, cuando se hace referencia a un polipéptido quimérico (tal como se define en el presente documento) se refiere a cualquier mecanismo químico o recombinante para unir dos o más componentes de polipéptido. La fusión de los dos o más componentes de polipéptido puede ser una fusión directa de las secuencias o puede ser una fusión indirecta, por ejemplo con secuencias de aminoácidos intermedias o secuencias de ligador. Se proporcionarán ejemplos más adelante en el presente documento.

El término “proteína de membrana”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se une a o se asocia con una membrana de una célula o un orgánulo. Se subdividen a menudo en varias categorías incluyendo proteínas integrales de membrana, proteínas periféricas de membrana y proteínas ancladas a lípidos. Preferiblemente, la proteína de membrana es una proteína integral de membrana que está unida permanentemente a la bicapa lipídica y que requiere un detergente u otro disolvente apolar para retirarse. Las proteínas integrales de membrana incluyen proteínas transmembrana que están permanentemente unidas a la membrana lipídica y abarcan la membrana una o varias veces. Los ejemplos de proteínas de membrana adecuadas incluyen receptores tales como los GPCR, entre otros.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido”, “proteína”, “péptido” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos química o bioquímicamente modificados o derivatizados, y polipéptidos que tienen armazones peptídicos modificados. En la totalidad de la solicitud, se usará la notación de aminoácidos de una letra convencional. Normalmente, el término “aminoácido” se referirá a “aminoácido proteínogénico”, es decir aquellos aminoácidos que están presentes de manera natural en proteínas. Lo más particularmente, los aminoácidos están en la forma isomérica L, pero también se prevén D-aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “ácido polinucleico”, “ácido nucleico” se usan de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien 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 limitativos de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, 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.

Cualquiera de los péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, etc., dados a conocer en el presente documento puede “aislarse” o “purificarse”. “Aislado” se usa en el presente documento para indicar que el material al que se hace referencia está (i) separado de una o más sustancias con las que existe en la naturaleza (por ejemplo, está

separado de al menos parte del material celular, separado de otros polipéptidos, separado de su contexto de secuencia natural) y/o (ii) se produce mediante un procedimiento que implica la mano del hombre tal como tecnología de ADN recombinante, síntesis química, etc.; y/o (iii) tiene una secuencia, estructura o composición química que no se encuentra en la naturaleza. "Purificado" tal como se usa en el presente documento indica que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas, y similares. En una realización, el polinucleótido o polipéptido está purificado de tal manera que constituye al menos el 90% en peso, por ejemplo, al menos el 95% en peso, por ejemplo, al menos el 99% en peso, del/de los polinucleótido(s) o polipéptido(s) presente(s) (pero pueden estar presentes agua, tampones, iones, y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000 Dalton).

El término "identidad de secuencia" tal como se usa en el presente documento se refiere a la medida en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido a lo largo de una ventana de comparación.

Por tanto, se calcula un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La determinación del porcentaje de identidad de secuencia puede realizarse manualmente, o haciendo uso de programas informáticos que están disponibles en la técnica. Ejemplos de algoritmos útiles son PILEUP (Higgins & Sharp, CABIOS 5:151 (1989), BLAST y BLAST 2.0 (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)). Está disponible para el público software para realizar análisis de tipo BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

"Similitud" se refiere al número de aminoácidos en porcentaje que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. Puede determinarse la similitud usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux *et al.* 1984). De este modo, podrían compararse secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose tales huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación usado por GAP. Tal como se usa en el presente documento, "sustitución conservativa" es la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, son alifáticas, son aromáticas, están cargadas positivamente, ...) y lo conoce bien el experto. La sustitución no conservativa es entonces la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos cuyas cadenas laterales no tienen propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, reemplazo de un residuo hidrófobo por uno polar). Las sustituciones conservativas producirán normalmente secuencias que ya no son idénticas, pero todavía sumamente similares. Por sustituciones conservativas se pretenden combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; Cys, Met; y Phe, Tyr, Trp.

Una "delección" se define en el presente documento como un cambio en la secuencia o bien de aminoácidos o bien de nucleótidos en el que uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, están ausentes en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un polipéptido o ácido nucleico parental. Dentro del contexto de una proteína, una delección puede implicar la delección de aproximadamente 2 aminoácidos, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más. Una proteína o un fragmento de la misma puede contener más de una delección. Dentro del contexto de un GPCR, una delección también puede ser una delección de bucle, o una delección N y/o C-terminal, o una combinación de las mismas. Tal como resultará claro para el experto, una delección N y/o C-terminal de un GPCR también se denomina truncamiento de la secuencia de aminoácidos de GPCR o GPCR truncado.

Una "inserción" o "adición" es ese cambio en una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos que ha dado como resultado la adición de uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de una proteína parental. "Inserción" se refiere en general a la adición a uno o más residuos de aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, mientras que "adición" puede ser una inserción o referirse a residuos de aminoácido añadidos en un extremo N o C-terminal, o ambos extremos terminales. Dentro del contexto de una proteína o un fragmento de la misma, una inserción o adición es habitualmente de aproximadamente 1 aminoácido, aproximadamente 3 aminoácidos, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más. Una proteína o fragmento de la misma puede contener más de una inserción.

Una "sustitución", tal 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 parental o un fragmento de la misma. Se entiende que una proteína o un fragmento de la misma puede tener sustituciones conservativas de aminoácidos que no tienen sustancialmente efecto sobre la actividad de la proteína. Por sustituciones conservativas se pretenden combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; Cys, Met; y Phe, Tyr,

Trp.

El término “recombinante” cuando se usa en referencia a una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, se ha modificado mediante la introducción de una proteína o un ácido nucleico heterólogo o la alteración de una proteína o un ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, células recombinantes expresan ácidos nucleicos o polipéptidos que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan si no de manera anómala, se subexpresan, se sobreexpresan o no se expresan en absoluto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “expresión” se refiere al procedimiento mediante el que se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El procedimiento incluye tanto transcripción como traducción.

El término “operativamente unido” tal como se usa en el presente documento se refiere a una unión en la que la secuencia reguladora es contigua al gen de interés para controlar el gene de interés, así como secuencias reguladoras que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. Por ejemplo, una secuencia de ADN está operativamente unida a un promotor cuando se liga al promotor de manera posterior con respecto al sitio de iniciación de la transcripción del promotor y permite que avance la elongación transcripcional a través de la secuencia de ADN. Un ADN para una secuencia señal está operativamente unido a ADN que codifica para un polipéptido si se expresa como pre-proteína que participa en el transporte del polipéptido. La unión de secuencias de ADN a secuencias reguladoras se logra normalmente mediante ligamiento en sitios de restricción adecuados o adaptadores o ligadores insertados en lugar de los mismos usando endonucleasas de restricción que conoce un experto en la técnica.

El término “secuencia reguladora” tal como se usa en el presente documento, y también denominada “secuencia de control”, se refiere a secuencias de polinucleótido que son necesarias para afectar a la expresión de secuencias codificantes a las que están operativamente unidas. Las secuencias reguladoras son secuencias que controlan la transcripción, eventos postranscripcionales y la traducción de secuencias de ácido nucleico. Las secuencias reguladoras incluyen secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de traducción (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma); secuencias que potencian la estabilidad de proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. El término “secuencia reguladora” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

El término “vector” tal como se usa en el presente documento pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otra molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. El vector puede ser de cualquier tipo adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, un fago, virus, plásmido, fagémido, cósmido, bácido o incluso un cromosoma artificial. Determinados vectores pueden producir replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en la célula huésped). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y se replican de ese modo junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores preferidos pueden dirigir la expresión de determinados genes de interés. Tales vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). Los vectores adecuados tienen secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, terminadoras, y similares según se desee y según un organismo huésped particular (por ejemplo, célula bacteriana, célula de levadura). Normalmente, un vector recombinante según la presente divulgación comprende al menos un “gen quimérico” o “casete de expresión”. Los casetes de expresión son generalmente constructos de ADN que incluyen preferiblemente (de 5' a 3' en el sentido de transcripción): una región promotora, una secuencia de polinucleótido, homólogo, variante o fragmento de las mismas de la presente divulgación operativamente unida con la región de iniciación de la transcripción, y una secuencia de terminación que incluye una señal de detención para ARN polimerasa y una señal de poliadenilación. Se entiende que todas estas regiones deben poder funcionar en células biológicas, tales como células procariontes o eucariotas, para transformarse. La región promotora que comprende la región de iniciación de la transcripción, que incluye preferiblemente el sitio de unión a ARN polimerasa, y la señal de poliadenilación puede ser nativa para la célula biológica que va a transformarse o puede derivarse de una fuente alternativa, cuando la región es funcional en la célula biológica.

El término “célula huésped”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino también a la progenie de tal célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero estar incluida todavía dentro del alcance del término “célula huésped” tal como se usa en el presente documento. Una célula huésped puede ser una célula o línea celular aislada hecha crecer en cultivo o puede ser una célula que reside en un tejido u organismo vivo. En particular, las células huésped

son de origen bacteriano o fúngico, pero también pueden ser de origen vegetal o mamífero. Las expresiones “célula huésped”, “célula huésped recombinante”, “célula huésped de expresión”, “sistema huésped de expresión”, “sistema de expresión”, pretenden tener el mismo significado y se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Un “epítopo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido.

5 Un epítopo podría comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial, que es única para el epítopo. Generalmente, un epítopo consiste en al menos 4, 5, 6, 7 de tales aminoácidos, y más habitualmente, consiste en al menos 8, 9, 10 de tales aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos de determinación de la conformación espacial de aminoácidos, e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear multidimensional.

10 Un “epítopo conformacional”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un epítopo que comprende aminoácidos en una conformación espacial que es única para una conformación tridimensional plegada de un polipéptido. Generalmente, un epítopo conformacional consiste en aminoácidos que son discontinuos en la secuencia lineal pero que se juntan en la estructura plegada de la proteína. Sin embargo, un epítopo conformacional también puede consistir en una secuencia lineal de aminoácidos que adopta una conformación que es única para una conformación tridimensional plegada del polipéptido (y que no está presente en un estado desnaturalizado). En complejos proteicos, los epítomos conformacionales consisten en aminoácidos que son discontinuos en las secuencias lineales de uno o más polipéptidos que se juntan tras el plegamiento de los diferentes polipéptidos plegados y su asociación en una estructura cuaternaria única. De manera similar, los epítomos conformacionales también pueden consistir en este caso 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 “conformación” o “estado conformacional” de una proteína se refiere en general a la gama 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 el estado conformacional incluyen la estructura primaria de una proteína tal como se refleja en la secuencia de aminoácidos de una proteína (incluyendo aminoácidos modificados) y el entorno que rodea a la proteína. La conformación o el estado conformacional de una proteína también se refiere a características estructurales tales como estructuras secundarias de la proteína (por ejemplo, hélice α , lámina β , entre otros), estructura terciaria (por ejemplo, el plegamiento tridimensional de una cadena de polipéptido) y estructura cuaternaria (por ejemplo, interacciones de una cadena de polipéptido con otras subunidades de proteína). Las modificaciones postraduccionales y otras a una cadena de polipéptido tal como unión a ligandos, fosforilación, sulfatación, glicosilación o uniones de grupos hidrófobos, entre otros, pueden influir en la conformación de una proteína. Además, factores ambientales, tales como pH, concentración salina, fuerza iónica y osmolalidad de la disolución circundante, e interacción con otras proteínas y cofactores, entre otros, pueden afectar a la conformación de la proteína. Puede determinarse el estado conformacional de una proteína o bien mediante ensayo funcional para determinar la actividad o unión a otra molécula o bien por medio de métodos físicos tales como cristalografía de rayos X, RMN o marcaje de espín, entre otros métodos. Para una discusión general de conformación de proteínas y estados conformacionales, remítase a Cantor y Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, W.H. Freeman and Company, 1980, y Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, 1993.

40 Una “conformación funcional” o un “estado conformacional funcional” se refiere al hecho de que las proteínas, en particular los GPCR, presentan diferentes estados conformacionales que tienen un rango dinámico de actividad, en particular que oscila entre ausencia de actividad a actividad máxima. Debe quedar claro que “un estado conformacional funcional”, tal como se usa en el presente documento, pretende cubrir cualquier estado conformacional de una proteína, en particular un GPCR, que tiene cualquier actividad, incluyendo ausencia de actividad, y no pretende cubrir los estados desnaturalizados de proteínas. Los ejemplos no limitativos de conformaciones funcionales de los GPCR incluyen conformaciones activas, conformaciones inactivas o conformaciones basales. Una clase particular de conformaciones funcionales se define como “conformación con capacidad farmacológica” y se refiere en general a un estado conformacional terapéuticamente relevante único de una proteína diana. Como ilustración, la conformación activa de unión a agonista del receptor β 2-adrenérgico corresponde a la conformación con capacidad farmacológica de este receptor con relación a relajación de músculo liso, dilatación de conductos bronquiales (asma), vasodilatación en músculo e hígado, relajación de músculo uterino, y liberación de insulina. Por tanto, se entenderá que la capacidad farmacológica se confina a conformaciones particulares dependiendo de la indicación terapéutica. Se proporcionan más detalles más adelante en el presente documento.

55 El término “estabilización” o “estabilizado”, con respecto a un estado conformacional funcional de un GPCR, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la conservación o el mantenimiento de un GPCR en un subconjunto de las posibles conformaciones que podría adoptar si no, debido a los efectos de la interacción intramolecular del resto de GPCR con el resto de dominio de unión del polipéptido quimérico de la presente divulgación. Dentro de este contexto, un dominio de unión que se une específica o selectivamente a una conformación particular de un GPCR se refiere a un dominio de unión que se une con una mayor afinidad al GPCR en un subconjunto de conformaciones que para otras conformaciones que puede adoptar el GPCR. Un experto en la técnica reconocerá que los dominios de unión que se unen específica o selectivamente a una conformación particular de un GPCR estabilizarán esta conformación particular, y su actividad relacionada. Se proporcionan más detalles más adelante en el presente

documento.

El término “afinidad”, tal como se usa en el presente documento, se refiere en general al grado en el que se une un ligando (tal como se define más adelante en el presente documento) a una proteína diana de modo que desplace el equilibrio de proteína diana y ligando hacia la presencia de un complejo formado mediante su unión. Por tanto, por ejemplo, cuando se combinan un polipéptido quimérico y un ligando en concentración relativamente igual, un ligando de alta afinidad se unirá al polipéptido quimérico de modo que desplace el equilibrio hacia una alta concentración del complejo resultante. La constante de disociación K_d se usa con frecuencia para describir la afinidad entre un ligando y una proteína diana. Normalmente, la constante de disociación tiene un valor que es menor de 10^{-5} M. Preferiblemente, la constante de disociación es menor de 10^{-6} M, más preferiblemente, menor de 10^{-7} M. Lo más preferiblemente, la constante de disociación es menor de 10^{-8} M. Otros modos de describir la afinidad entre un ligando y su proteína diana son la constante de asociación (K_a), la constante de inhibición (K_i), o indirectamente evaluando la potencia de ligandos midiendo la concentración inhibitoria mitad de la máxima (CI50) o la concentración eficaz mitad de la máxima (CE50). Se apreciará que dentro del alcance de la presente divulgación, el término “afinidad” se usa en el contexto de un dominio de unión que se une a un epítipo conformacional de un GPCR diana así como en el contexto de un compuesto de prueba (tal como se define más adelante en el presente documento) que se une al polipéptido quimérico de la presente divulgación, más particularmente a un sitio ortostérico o alostérico de un GPCR diana comprendido en el polipéptido quimérico.

Debe observarse que, en interacciones intramoleculares, tales como la interacción específica del resto de dominio de unión al resto de GPCR del polipéptido quimérico descritos en el presente documento, los dos grupos interaccionantes están contenidos dentro de una única molécula. La constante de disociación entre el dominio de unión y la diana podría conocerse cuando son moléculas individuales, pero para una interacción intramolecular, su concentración dentro de la disolución es irrelevante. Más bien, es la “concentración eficaz” de los dos grupos dentro de la macromolécula que es importante para la interacción intramolecular. El término “concentración intramolecular eficaz” o “molaridad eficaz” (M_{ef}), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración eficaz y puede calcularse como K_d^{inter}/K_d^{intra} , en el que la constante de disociación K_d^{intra} , que es adimensional, es la constante de disociación que se usa para describir una reacción intramolecular, que es una fusión de un GPCR diana y un dominio de unión, y en el que K_d^{inter} , que tiene unidades de concentración (por ejemplo, molaridad), es la constante de disociación para una interacción intermolecular análoga, que es un complejo no covalente de un dominio de unión y un GPCR diana. La molaridad eficaz dependerá de la estructura de la macromolécula, en particular el grado en que pone los dos reactantes juntos o los mantiene separados, más el entorno en el que se mantienen los dos grupos. La molaridad eficaz para la reacción intramolecular será esencialmente cero si la estructura macromolecular mantiene separados los dos grupos, lo que es el caso cuando un dominio de unión no se dirige contra y/o no puede unirse específicamente (tal como se define más adelante en el presente documento) a un GPCR diana. En el otro extremo, cuando la estructura macromolecular mantiene los dos grupos en la proximidad y orientación para la reacción correctas, su molaridad eficaz puede ser extremadamente alta, hasta 10^{10} M, concentraciones que no son viables con dos moléculas independientes. Según la presente divulgación, este es el caso cuando un dominio de unión puede unirse específicamente (tal como se define más adelante en el presente documento) a un GPCR diana. Se predicen tales valores mediante consideraciones teóricas y también se observan experimentalmente, a partir de la razón de la velocidad o constantes de equilibrio para la misma reacción cuando los grupos están en la misma molécula y en moléculas independientes.

El término “especificidad”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un dominio de unión, en particular una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un VHH o Nanobody, para unirse preferentemente a un antígeno, frente a un antígeno diferente, y no implica necesariamente una alta afinidad.

Los términos “se unen específicamente” y “unión específica”, tal como se usan en el presente documento, se refieren en general a la capacidad de un dominio de unión, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un VHH o Nanobody, para unirse preferentemente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes antígenos. En determinadas realizaciones, una interacción de unión específica distinguirá entre antígenos deseados y no deseados en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10.000 veces). Dentro del contexto del espectro de estados conformacionales de los GPCR, los términos se refieren en particular a la capacidad de un dominio de unión (tal como se define en el presente documento) para reconocer y/o unirse preferentemente a un estado conformacional particular de un GPCR en comparación con otro estado conformacional. Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, el término “dominio de unión selectivo para la conformación” en el contexto de la presente divulgación se refiere a un dominio de unión que se une a un GPCR diana de manera selectiva para la conformación. Un dominio de unión que se une selectivamente a una conformación particular de un GPCR se refiere a un dominio de unión que se une con una mayor afinidad a un GPCR en un subconjunto de conformaciones que para otras conformaciones que puede adoptar el GPCR. Un experto en la técnica reconocerá que los dominios de unión que se unen selectivamente a una conformación particular de un GPCR estabilizarán o conservarán el GPCR en esta conformación particular. Por ejemplo, un dominio de unión selectivo para la conformación de estado activo se unirá preferentemente a un GPCR en un estado conformacional activo y no se unirá o lo hará en menor grado a un GPCR en un estado conformacional inactivo y, por tanto, tendrá una mayor afinidad por dicho estado conformacional activo; o viceversa. Los términos “se unen específicamente”, “se unen selectivamente”, “se unen preferentemente”, y los equivalentes gramaticales de

los mismos, se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los términos “específico para la conformación” o “selectivo para la conformación” también se usan de manera intercambiable en el presente documento.

El término “compuesto” o “compuesto de prueba” o “compuesto candidato” o “compuesto candidato a fármaco” tal como se usan en el presente documento pretenden tener el mismo significado y describir cualquier molécula, o bien que se produce de manera natural o bien sintética que se somete a prueba en un ensayo, tal como un ensayo de examen con fines de descubrimiento de fármacos. Como tal, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos. Los compuestos incluyen moléculas pequeñas, polinucleótidos, lípidos o análogos hormonales que se caracterizan por bajos pesos moleculares. Otros compuestos de prueba orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos (peptidomiméticos) que comprenden desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 aminoácidos y polipéptidos más grandes que comprenden desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 500 aminoácidos, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de anticuerpo. Los compuestos de prueba también pueden ser armazones proteicos o armazones sintéticos. Con fines de alto rendimiento, pueden usarse bibliotecas de compuestos de prueba, tales como bibliotecas combinatorias o aleatorizadas que proporcionan un rango suficiente de diversidad. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de compuestos naturales, bibliotecas de compuestos alostéricos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de fragmentos de anticuerpo, bibliotecas de compuestos sintéticos, bibliotecas basadas en fragmentos, bibliotecas de presentación en fago, y similares. Puede hallarse una descripción más detallada más adelante en la memoria descriptiva.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ligando” significa una molécula que se une a un polipéptido, en particular un GPCR. Un ligando puede ser, sin el propósito de ser limitativo, una proteína, un (poli)péptido, un lípido, una molécula pequeña, un armazón proteico, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Un ligando puede ser sintético o producirse de manera natural. Un ligando también incluye un “ligando nativo” que es un ligando que es un ligando natural, endógeno para una proteína nativa. Dentro del contexto de la presente divulgación, un ligando significa una molécula que se une a un GPCR, o bien en el sitio intracelular o bien en el sitio extracelular y/o en los dominios transmembrana. Habitualmente, pero no necesariamente, un GPCR adoptará una conformación particular tras la unión de un ligando. Por tanto, un ligando también puede ser un “ligando selectivo para la conformación” o “ligando específico para la conformación”. El término incluye agonistas, agonistas totales, agonistas parciales y agonistas inversos, que se unen o bien en el sitio ortostérico o bien en un sitio alostérico. Por motivos de claridad, el término “ligando selectivo para la conformación” o “ligando específico para la conformación” no incluye un antagonista neutro, puesto que un antagonista neutro no se une selectivamente a una conformación particular de un GPCR.

Un “ligando ortostérico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ligando (tanto natural como sintético) que se une al sitio activo de un receptor, tal como un GPCR, y se clasifican además según su eficacia o dicho de otro modo según el efecto que tienen sobre la señalización a través de una ruta específica. Tal como se usa en el presente documento, un “agonista” se refiere a un ligando que, mediante la unión a una proteína receptora, aumenta la actividad de señalización del receptor. Los agonistas totales pueden producir una estimulación de proteína máxima; los agonistas parciales no pueden provocar la actividad completa ni siquiera a concentraciones de saturación. Los agonistas parciales también pueden funcionar como “bloqueantes” impidiendo la unión de agonistas más robustos. Un “antagonista”, también denominado “antagonista neutro”, se refiere a un ligando que se une a un receptor sin estimular ninguna actividad. Un “antagonista” también se conoce como “bloqueante” debido a su capacidad para impedir la unión de otros ligandos y, por tanto, bloquear la actividad inducida por agonistas. Además, un “agonista inverso” se refiere a un antagonista que, además de bloquear los efectos como agonista, reduce la actividad basal o constitutiva de un receptor por debajo de la de la proteína sin unirse a ligandos.

Los ligandos tal como se usan en el presente documento también pueden ser “ligandos sesgados” con la capacidad para estimular selectivamente un subconjunto de actividades de señalización de un receptor, por ejemplo en el caso de los GPCR la activación selectiva de la función de proteína G o β -arrestina. Tales ligandos se conocen como “ligandos sesgados”, “agonistas sesgados” o “agonistas selectivos funcionalmente”. Más particularmente, el sesgo de ligando puede ser un sesgo imperfecto caracterizado por una estimulación por ligando de múltiples actividades de receptor con diferentes eficacias relativas para diferentes señales o puede ser un sesgo perfecto caracterizado por una estimulación por ligando de una actividad de proteína receptora sin ninguna estimulación de otra actividad de proteína receptora conocida.

Otra clase de ligandos se conoce como reguladores alostéricos. “Reguladores alostéricos” o si no “moduladores alostéricos”, “ligandos alostéricos” o “moléculas efectoras”, tal como se usa en el presente documento, se refieren a ligandos que se unen en un sitio alostérico (es decir, un sitio regulador físicamente distinto del sitio activo de la proteína) de una proteína receptora tal como un GPCR. En contraposición a los ligandos ortostéricos, los moduladores alostéricos no son competitivos porque se unen a proteínas receptoras en un sitio diferente y modifican su función aunque también se una el ligando endógeno. Los reguladores alostéricos que potencian la actividad de la proteína se denominan en el presente documento “activadores alostéricos” o “moduladores alostéricos positivos” (PAM), mientras que los que disminuyen la actividad de la proteína se denominan en el presente documento “inhibidores alostéricos” o si no “moduladores alostéricos negativos” (NAM).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “determinar”, “medir”, “evaluar”, “monitorizar” y “someter a ensayo” se usan de manera intercambiable e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

5 Tal como se usa en el presente documento, los términos “región determinante de la complementariedad” o “CDR” dentro del contexto de anticuerpos se refieren a regiones variables de cualquiera de las cadenas H (pesada) o L (ligera) (también abreviadas como VH y VL, respectivamente) y contiene las secuencias de aminoácidos que pueden unirse específicamente a dianas antigénicas. Estas regiones CDR representan la especificidad básica del anticuerpo para una estructura de determinante antigénico particular. Tales regiones también se denominan “regiones hipervariables”. Las CDRs representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha hallado que las ubicaciones posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticas dentro de las regiones de cadenas pesadas y ligeras variables tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas pesadas y ligeras variables de todos los anticuerpos canónicos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua a las demás (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligeras (L) y pesadas (H) respectivas. Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, en particular VHH o Nanobodies, comprenden generalmente una única cadena de aminoácidos que puede considerarse que comprende 4 “secuencias o regiones de marco” o FR y 3 “regiones determinantes de la complementariedad” o CDR. Los Nanobodies tienen 3 regiones CDR, cada una no contigua a las demás (denominadas CDR1, CDR2, CDR3). La delineación de las secuencias FR y CDR puede basarse, por ejemplo, en el sistema de numeración única de IMGT para dominios V y dominios similares a V (Lefranc *et al.* 2003.).

Descripción detallada

20 *Polipéptidos quiméricos*

Un primer aspecto de la divulgación se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un receptor acoplado a proteína G (GPCR) fusionado a un dominio de unión, en el que el dominio de unión se dirige contra y/o se une específicamente al GPCR. En el presente documento se proporciona un polipéptido quimérico que es una proteína de fusión de al menos dos restos, en particular al menos un resto de GPCR y un resto de dominio de unión, en el que el dominio de unión se dirige contra y/o se une específicamente al GPCR.

En general, la elección del resto de GPCR que forma parte del polipéptido quimérico no es crítica para la divulgación, y se seleccionará normalmente según el uso y la aplicación pretendidos. Un requisito previo del resto de dominio de unión es su capacidad para unirse específicamente (tal como se define en el presente documento) al GPCR de elección. Por tanto, el resto de dominio de unión puede dirigirse generalmente contra cualquier GPCR deseado, y puede dirigirse en particular contra cualquier epítipo conformacional (tal como se define en el presente documento) de cualquier GPCR. Un dominio de unión que se une específicamente a un “epítipo conformacional” se une específicamente a una estructura terciaria (es decir, tridimensional) de una proteína plegada, y se une a una afinidad muy reducida (es decir, en un factor de al menos 2, 5, 10, 50 ó 100) a la forma lineal (es decir, no plegada, desnaturalizada) de la proteína. En particular, dicho epítipo conformacional puede formar parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o una estructura de dominio o bucle de cualquier GPCR deseado. Por tanto, según realizaciones particulares, el resto de dominio de unión puede dirigirse contra una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo conformacional extracelular de cualquier GPCR deseado, pero se dirige preferiblemente contra las partes extracelulares de los dominios transmembrana o más preferiblemente contra los bucles extracelulares que unen los dominios transmembrana. Alternativamente, el resto de dominio de unión puede dirigirse contra una región, dominio, bucle intracelular u otro epítipo conformacional intracelular de cualquier GPCR deseado, pero se dirige preferiblemente contra una de las partes intracelulares de los dominios transmembrana o más preferiblemente contra los bucles intracelulares que unen los dominios transmembrana. En otras realizaciones específicas, el resto de dominio de unión puede dirigirse contra un epítipo conformacional que forma parte del sitio de unión de un ligando natural, incluyendo pero sin limitarse a un agonista ortostérico endógeno. En todavía otras realizaciones, el resto de dominio de unión puede dirigirse contra un epítipo conformacional, en particular un epítipo intracelular, que está comprendido en un sitio de unión para una proteína de señalización posterior, incluyendo pero sin limitarse a un sitio de unión a proteína G, un sitio de unión a β -arrestina.

Según una realización preferida, el polipéptido quimérico descrito en el presente documento comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión en el que, tras la unión del dominio de unión al GPCR en una reacción intramolecular, el GPCR se estabiliza en una conformación particular sin la necesidad de un ligando adicional. Preferiblemente, el polipéptido quimérico descrito en el presente documento comprende un GPCR que se estabiliza mediante el dominio de unión en una conformación funcional (tal como se define en el presente documento). Con el término “estabilizado”, tal como se definió anteriormente en el presente documento, quiere decirse una estabilidad aumentada de un GPCR con respecto a la estructura (por ejemplo, estado conformacional) y/o actividad biológica particular (por ejemplo, actividad de señalización intracelular, afinidad de unión a ligandos, ...). En relación con la estabilidad aumentada con respecto a la estructura y/o actividad biológica, esto puede determinarse fácilmente o bien por medio de métodos físicos tales como cristalografía de rayos X, RMN o marcaje de espín, entre otros métodos o bien mediante un ensayo funcional para determinar la actividad (por ejemplo, liberación de Ca^{2+} , generación de AMPc o actividad transcripcional, reclutamiento de β -arrestina, ...) o unión a ligandos, entre otros métodos. El término “estabilizar” también incluye una termoestabilidad aumentada de GPCR en condiciones no fisiológicas inducidas por desnaturalizantes o condiciones de desnaturalización. Los términos “termoestabilizar”,

“termostabilización”, “aumento de la termostabilidad de”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a las propiedades funcionales más que termodinámicas de un GPCR y a la resistencia de la proteína a la desnaturalización irreversible inducida mediante enfoques térmicos y/o químicos incluyendo pero sin limitarse a calentamiento, enfriamiento, congelación, desnaturalizantes químicos, pH, detergentes, sales, aditivos, proteasas o temperatura. La desnaturalización irreversible conduce al desplegamiento irreversible de las conformaciones funcionales de la proteína, pérdida de actividad biológica y agregación de la proteína desnaturalizada. En relación con una estabilidad aumentada al calor, esto puede determinarse fácilmente midiendo la unión a ligandos o usando métodos espectroscópicos tales como fluorescencia, DC o dispersión de luz que son sensibles al desplegamiento a temperaturas crecientes. Se prefiere que el resto de dominio de unión pueda aumentar la estabilidad tal como se mide mediante un aumento de 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 preferiblemente al menos 10°C o 15°C o 20°C. En relación con una estabilidad aumentada frente a un detergente o frente a un caótripo, normalmente se incubaba GPCR durante un tiempo definido en presencia de un detergente de prueba o un agente caotrópico de prueba y se determina la estabilidad usando, por ejemplo, unión a ligandos o un método espectroscópico, opcionalmente a temperaturas crecientes tal como se comentó anteriormente. Si no, el resto de dominio de unión puede aumentar la estabilidad a un pH extremo de un estado conformacional funcional de un GPCR. En relación con un extremo de pH, un pH de prueba típico se elegiría, 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 (bajo pH) o en el intervalo de 8,5 a 9,5 (alto pH). Los términos “(termo)estabilizar”, “(termo)estabilización”, “aumento de la (termo)estabilidad de”, tal como se usan en el presente documento, se aplican a los GPCR incluidos en partículas de lípido o capas lipídicas (por ejemplo, monocapas lipídicas, bicapas lipídicas, y similares) y a los GPCR que se han solubilizado en detergente.

Por tanto, se prevé en particular que los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento comprendan un resto de GPCR que se estabiliza en una conformación funcional tras la unión del resto de dominio de unión. Según una realización preferida, el resto de GPCR se estabiliza en una conformación activa tras la unión de un dominio de unión que es selectivo para una conformación activa. El término “conformación activa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un espectro de conformaciones de receptor que tras la unión de un ligando permite la transducción de señales hacia un sistema efector intracelular, incluyendo señalización dependiente de proteína G y señalización independiente de proteína G (por ejemplo, señalización de β -arrestina). Una “conformación activa” engloba por tanto una gama de conformaciones específicas de ligando, incluyendo una conformación activa de unión a agonista, una conformación activa de unión a agonista parcial o una conformación de agonista sesgado que induce la unión cooperativa de una proteína efectora intracelular. En otra realización preferida, el resto de GPCR se estabiliza en una conformación inactiva tras la unión de un dominio de unión que es selectivo para la conformación para una conformación inactiva. El término “conformación inactiva”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un espectro de conformaciones de receptor que no permite o bloquea la transducción de señales hacia un sistema efector intracelular. Una “conformación inactiva” engloba por tanto una gama de conformaciones específicas de ligando, incluyendo una conformación inactiva de unión a agonista inverso que impide la unión cooperativa de una proteína efectora intracelular. Se entenderá que el sitio de la unión del ligando no es crítico para obtener una conformación activa o inactiva. Así, los ligandos ortostéricos así como moduladores alostéricos pueden estabilizar igualmente un GPCR en una conformación activa o inactiva. Por tanto, según una realización particular de la presente divulgación, el resto de dominio de unión que puede estabilizar el resto de GPCR puede unirse en el sitio ortostérico o en un sitio alostérico. En otras realizaciones específicas, el resto de dominio de unión que puede estabilizar el resto de GPCR puede ser un dominio de unión que es selectivo para una conformación activa de unión a agonista, o que es selectivo para una conformación activa de unión a agonista parcial o que es selectivo para un dominio de unión de conformación funcional de unión a agonista sesgado, o que es selectivo para una conformación inactiva de unión a agonista inverso.

Por tanto, se entenderá que los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación son proteínas restringidas a nivel conformacional puesto que el resto de GPCR de la fusión se estabiliza en una conformación funcional particular, debido a la alta concentración local del dominio de unión anclado. Para ilustrar esto adicionalmente, sin el propósito de ser limitativo, un polipéptido quimérico descrito en el presente documento que comprende un GPCR que se estabiliza en una conformación activa tendrá una afinidad aumentada o potenciada por un agonista, más particularmente por un agonista total, un agonista parcial o un agonista sesgado, en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente o en comparación con un polipéptido quimérico del GPCR correspondiente fusionado a un resto de unión simulado (también denominado resto de unión de control o resto de unión irrelevante, y que no se dirige a y/o no se une específicamente al GPCR). También, un polipéptido quimérico descrito en el presente documento que comprende un GPCR que se estabiliza en una conformación activa tendrá una afinidad disminuida por un agonista inverso, en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente o con un polipéptido quimérico del GPCR correspondiente fusionado a un resto de unión simulado. En cambio, un polipéptido quimérico descrito en el presente documento que comprende un GPCR que se estabiliza en una conformación inactiva tendrá una afinidad potenciada por un agonista inverso y/o tendrá una afinidad disminuida por un agonista en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente o con un polipéptido quimérico del GPCR correspondiente fusionado a un resto de unión simulado. Un aumento o una disminución de la afinidad por un ligando puede medirse directamente mediante y/o calcularse a partir de una disminución o un aumento, respectivamente de CE_{50} , CI_{50} , K_d , K_i o cualquier otra medida de afinidad o potencia que conoce un experto en la técnica. Preferiblemente, la afinidad de un polipéptido quimérico descrito en el presente documento por un ligando aumenta o disminuye al menos 2 veces, al menos 5

veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, y más preferiblemente al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 400 veces, al menos 500 veces, incluso más preferiblemente al menos 1000 veces o 2000 veces o más, tras la unión al GPCR restringido. Se apreciará que pueden llevarse a cabo mediciones de afinidad por ligandos selectivos para la conformación que activan/inhiben rutas de señalización particulares con cualquier tipo de ligando, incluyendo ligandos naturales, moléculas pequeñas, así como productos biológicos; con ligandos ortostéricos así como moduladores alostéricos; con compuestos individuales así como bibliotecas de compuestos; con compuestos principales o fragmentos; etc.

Además, el modo en que se fusionan entre sí los diferentes restos que forman parte de los polipéptidos quiméricos tal como se describe dependerá normalmente tanto del tipo de GPCR como de las características del dominio de unión (por ejemplo, epítipo conformacional al que se une). Tal como conoce el experto en la técnica, los GPCR se caracterizan por un extremo N-terminal extracelular, seguido por siete hélices α transmembrana conectadas mediante tres bucles intracelulares y tres extracelulares, y finalmente un extremo C-terminal intracelular (véase también más adelante en el presente documento). Dependiendo del sitio de la unión (extracelular o intracelular o transmembrana), el resto de dominio de unión se fusionará preferiblemente al extremo N-terminal de GPCR o al extremo C-terminal. Preferiblemente, un dominio de unión que se une al GPCR en un sitio intracelular se fusionará en el extremo C-terminal de GPCR. Asimismo, un dominio de unión que se une al GPCR en un sitio extracelular se fusionará en el extremo N-terminal de GPCR. El resto de dominio de unión se fusionará con su extremo C-terminal al extremo N-terminal de GPCR o el dominio de unión pueden fusionarse con su extremo N-terminal al extremo C-terminal C de GPCR. Además, la fusión puede ser una fusión directa de las secuencias o puede ser una fusión indirecta, por ejemplo con secuencias de aminoácidos intermedias o secuencias de ligador (tal como se describe más adelante en el presente documento). Un experto en la técnica sabrá cómo diseñar un constructo de fusión. Si está disponible, se hará uso de la estructura atómica de GPCR por separado y/o la estructura atómica del dominio de unión por separado y/o la estructura atómica de GPCR en complejo con el dominio de unión. Alternativamente, el GPCR podría unirse al dominio de unión usando corte y empalme de proteína mediado por inteína (Muralidharan y Muir 2006) o la técnica *sortagging* (Popp *et al.* 2007) u otros métodos quimioenzimáticos para el marcaje específico de sitio o la ingeniería de proteínas con moléculas pequeñas u otras proteínas, por ejemplo tal como se describe en Chen y Ting (2005) y Rabuka (2010) y se incorpora al presente documento como referencia.

Se detallarán adicionalmente a continuación en el presente documento realizaciones particulares de los diferentes restos que forman parte de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento.

Resto de GPCR

El polipéptido quimérico descrito en el presente documento comprende al menos dos componentes de polipéptido, uno de los cuales es un GPCR. Como GPCR, puede usarse cualquier GPCR de interés. El experto puede elegir un GPCR adecuado dependiendo de la aplicación pretendida (tal como se describe más adelante en el presente documento). En la misma línea, y dependiendo del uso pretendido, puede seleccionarse un GPCR de cualquier organismo, tal como hongo (incluyendo levadura), nematodo, virus, insecto, planta, ave (por ejemplo, gallina, pavo), reptil o mamífero (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, hámster, jerbo, perro, gato, cabra, cerdo, vaca, caballo, ballena, mono, camélido o ser humano).

“Receptores acoplados a proteína G” o “GPCR”, tal como se usa en el presente documento, los conoce bien el experto y se refieren a polipéptidos que comparten un motivo estructural común, que tienen siete regiones de entre 22 y 24 aminoácidos hidrófobos que forman siete hélices alfa, cada una de las cuales abarca la membrana. Cada abarcado se identifica mediante un número, es decir, transmembrana-1 (TM1), transmembrana-2 (TM2), etc. Las hélices transmembrana se unen por regiones de aminoácidos entre transmembrana-2 y transmembrana-3, transmembrana-4 y transmembrana-5, y transmembrana-6 y 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 transmembrana también se unen por regiones de aminoácidos entre transmembrana-1 y transmembrana-2, transmembrana-3 y transmembrana-4, y transmembrana-5 y 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”) terminal del receptor se encuentra en el espacio intracelular dentro de la célula, y el extremo “amino” (“N”) terminal del receptor se encuentra en el espacio extracelular fuera de la célula. Cualquiera de estas regiones puede identificarse fácilmente mediante análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de un GPCR.

La estructura y clasificación GPCR se conoce bien generalmente en la técnica y puede hallarse un comentario adicional sobre 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 (1ª 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 (24 de septiembre de 1999); y Steve Watson (Ed.) G-Protein Linked Receptor Factsbook, publicado por Academic Press (1ª edición; 1994). Los GPCR pueden agruparse basándose en la homología de secuencia y similitud funcional en varias familias, pudiendo usarse cada una de ellas en la creación y el uso de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento. La mayor parte de los GPCR humanos pueden hallarse en cinco familias principales, denominadas de glutamato, rodopsina, adhesión, Frizzled/Taste2 y secretina (Fredriksson *et al.*, 2003). Los miembros de la familia de rodopsina correspondientes a la clase A

(Kolakowski, 1994) o clase 1 (Foord *et al* 2005) en sistemas de clasificación más antiguos sólo tienen pequeños bucles extracelulares y la interacción de los ligandos se produce con residuos dentro de la hendidura transmembrana. Este es por mucho el grupo más grande (>90% de los GPCR) y contiene receptores para odorizantes, moléculas pequeñas tales como catecolaminas y aminor, (neuro) péptidos y hormonas de glicoproteínas. La rodopsina, un representante de esta familia, es el primer GPCR para el que se ha resuelto la estructura (Palczewski *et al.*, 2000). β 2AR, 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 receptores GPCR de clase B o clase 2 (Foord *et al*, 2005) se han subdividido recientemente en dos familias: de adhesión y secretina (Fredriksson *et al.*, 2003). Los receptores de adhesión y secretina se caracterizan por un dominio extracelular amino-terminal relativamente largo implicado en la unión a ligandos. Se conoce poco sobre la orientación de los dominios transmembrana, pero es probablemente bastante diferente de la de rodopsina. Ligandos para estos GPCR son hormonas, tales como glucagón, secretina, hormona liberadora de gonadotropina y hormona paratiroidea. Los receptores de la familia de glutamato (receptores de clase C o clase 3) también tienen un gran dominio extracelular, que funciona como un "atrapamoscas" puesto que puede abrirse y cerrarse con el agonista unido en el interior. Miembros de la familia son los receptores de glutamato metabotrópicos, de detección de Ca^{2+} y de ácido γ -aminobutírico (GABA)-B.

Por tanto, según realizaciones particulares, el polipéptido quimérico descrito en el presente documento comprende un GPCR que se elige del grupo que comprende un GPCR de la familia de glutamato de los GPCR, un GPCR de la familia de rodopsina de los GPCR, un GPCR de la familia de adhesión de los GPCR, un GPCR de la familia de Frizzled/Taste2 de los GPCR, y un GPCR de la familia de secretina de los GPCR. Preferiblemente, el GPCR comprendido en el polipéptido quimérico es una proteína de mamífero, o una proteína vegetal, o una proteína microbiana, o una proteína viral, o una proteína de insecto. Incluso más preferiblemente, el GPCR es una proteína humana.

Más específicamente, los GPCR incluyen, sin limitación, receptores de 5-hidroxitriptamina, receptores de acetilcolina (muscarínicos), receptores de adenosina, receptores adrenérgicos, receptores de anafilotoxina, receptores de angiotensina, receptores de apelina, receptores de ácidos biliares, receptores de bombesina, receptores de bradisinina, receptores de cannabinoides, receptores de quimiocinas, receptores de colecistocinina, receptores de dopamina, receptores de endotelina, receptores de estrógenos (acoplados a proteína G), receptores de formilpéptido, receptores de ácidos grasos libres, receptores de galanina, receptores de grelina, receptores de hormonas de glicoproteínas, receptores de hormona liberadora de gonadotropina, receptores de histamina, receptor de péptido derivado de KiSS1, receptores de leucotrienos, receptores de lisofosfolípidos, receptores de hormona concentradora de melanina, receptores de melanocortina, receptores de melatonina, receptores de motilina, receptores de neuromedina U, receptores de neuropéptido FF/neuropéptido AF, receptores de neuropéptido S, receptores de neuropéptido W/neuropéptido B, receptores de neuropéptido Y, receptores de neurotensina, familia de receptores de ácido nicotínico, receptores de opioides, receptores de orexina, receptores de P2Y, receptor de péptido P518, receptor de factor activador de plaquetas, receptores de prokineticina, receptor de péptido liberador de prolactina, receptores de prostanoides, receptores activadores de proteasa, receptores de péptidos de la familia de relaxina, receptores de somatostatina, receptores de taquicinina, receptor de hormona liberadora de tirotrina, receptor de aminor traza, receptor de urotensina, receptores de vasopresina y oxitocina, receptores huérfanos de clase A, proteínas de unión a quimiocina 7TM no de señalización, receptores de calcitonina, receptores de factor liberador de corticotropina, familia de receptores de glucagón, receptores de hormona paratiroidea, receptores de VIP y PACAP, receptores huérfanos de clase B, receptores de detección de calcio, receptores de GABA B, receptores de GPRC5, receptores de glutamato metabotrópicos, receptores huérfanos de clase C, receptores Frizzled, los receptores de los siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G y rodopsinas. Los GPCR también incluyen estos receptores de 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 mediante referencia a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). La nomenclatura normalizada según HGNC para genes humanos; los números de registro de diferentes isoformas de diferentes organismos están disponibles a partir de Uniprot (www.uniprot.org). Además, puede recuperarse una visión general exhaustiva de la nomenclatura de receptores, información farmacológica, funcional y fisiopatológica sobre los GPCR de la base de datos de IUPHAR (<http://www.iuphar-db.org/>).

Según una realización preferida, el GPCR que forma parte del polipéptido quimérico descrito en el presente documento, se elige del grupo que comprende los receptores adrenérgicos, preferiblemente los receptores α -adrenérgicos, tales como los receptores α 1-adrenérgicos y los receptores α 2-adrenérgicos y los receptores β -adrenérgicos tales como los receptores β 1-adrenérgicos, los receptores β 2-adrenérgicos y los receptores β 3-adrenérgicos; o del grupo que comprende los receptores muscarínicos, preferiblemente los receptores muscarínicos M1, los receptores muscarínicos M2, los receptores muscarínicos M3, los receptores muscarínicos M4 y los receptores muscarínicos M5; o del grupo que comprende la familia de receptores de opioides, preferiblemente los receptores de opioides μ (μ o MOP o Mor1), los receptores de opioides δ (δ o DOP), los receptores de opioides κ (κ o KOP), los receptores de opioides NOP, todos los cuales se conocen bien en la técnica.

Se entenderá que, dependiendo del propósito y la aplicación, el GPCR comprendido en la proteína de fusión puede

5 ser un receptor que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural (es decir, alterado por el hombre). El término “que se produce de manera natural” en referencia a un GPCR significa un GPCR que se produce de manera natural. En particular, isoformas y variantes polimórficas silvestres de los GPCR, así como ortólogos de diferentes especies son ejemplos de proteínas que se producen de manera natural, y se hallan por ejemplo, y sin limitación, en un mamífero, más específicamente en un ser humano, o en un virus, o en una planta, o en un insecto, entre otros). Tales GPCR se hallan en la naturaleza. Además, el término pretende englobar variantes polimórficas silvestres y otras determinadas variantes del receptor β 2-adrenérgico de una especie particular, incluyendo mutantes. Por ejemplo, un “receptor β 2-adrenérgico humano” tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% (por ejemplo, idéntica en al menos el 95% o al menos el 98%) al “receptor β 2-adrenérgico humano” que se produce de manera natural de número de registro de Genbank NP_000015. O también, un “receptor muscarínico de acetilcolina humano M2” tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% (por ejemplo, idéntica en al menos el 95% o al menos el 98%) al “receptor muscarínico de acetilcolina humano M2” que se produce de manera natural de número de registro de Genbank AAA51570.1. O también, un “receptor de opioides mu humano” tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% (por ejemplo, idéntica en al menos el 95% o al menos el 98%) a al “receptor de opioides mu humano” que se produce de manera natural de número de registro de Genbank NP_000905. El término “que no se produce de manera natural” en referencia a un GPCR significa un GPCR que no se produce de manera natural. Los GPCR silvestres que se han mutado y variantes de GPCR que se producen de manera natural son ejemplos de GPCR que no se producen de manera natural. Los GPCR que no se producen de manera natural pueden tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80% a, idéntica en al menos el 90% a, idéntica en al menos el 95% a o idéntica en al menos 99% a, un GPCR que se produce de manera natural. En determinadas circunstancias, puede resultar ventajoso que el GPCR comprendido en el polipéptido quimérico sea una proteína que no se produce de manera natural. Por ejemplo, y con fines de ilustración únicamente, para aumentar la probabilidad de obtener cristales del polipéptido quimérico que comprende el GPCR estabilizado en una conformación particular, podría desearse realizar cierta ingeniería de proteínas sin afectar o sólo afectando mínimamente a la conformación (por ejemplo, conformación activa con afinidad aumentada por agonistas). O, alternativa o adicionalmente, para aumentar los niveles de expresión celular de un GPCR, o para aumentar la estabilidad, también podría considerarse introducir determinadas mutaciones en el GPCR de interés. Los ejemplos no limitativos de GPCR que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, los GPCR que se ha hecho que sean constitutivamente activos a través de mutación, los GPCR con una delección de bucle, los GPCR con una delección N y/o C-terminal, los GPCR con una sustitución, una inserción o adición, o cualquier combinación de los mismos, en relación con su secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, u otras variantes de GPCR que se producen de manera natural. También están comprendidos dentro del alcance de la presente divulgación los GPCR diana que comprenden un GPCR quimérico o híbrido, por ejemplo un GPCR quimérico con un extremo N y/o C-terminal de un GPCR y bucles de un segundo GPCR, o que comprende un GPCR fusionado a un resto, tal como lisozima T4, flavodoxina, xilanasasa, rubredoxina o citocromo b como utilidad en la cristalización de GPCR (Chun *et al.* 2012 y también descrito en las solicitudes de patente WO2012/158555, WO2012/030735, WO2012/148586).

Según realizaciones específicas dentro del alcance de la presente divulgación, un GPCR que no se produce de manera natural, comprendido en el polipéptido quimérico, puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80% a, idéntica en al menos el 90% a, idéntica en al menos el 95% a, idéntica en al menos el 97% a, o idéntica en al menos el 99% a, un GPCR que se produce de manera natural. Además, se apreciará que la presente divulgación también prevé GPCR con una delección de bucle, o una delección N o C-terminal, o una sustitución, o una inserción o adición en relación con su secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, o cualquier combinación de los mismos (tal como se definió anteriormente en el presente documento, y véase también la sección de ejemplos).

Resto de dominio de unión

El polipéptido quimérico descrito en el presente documento comprende al menos dos restos de polipéptido, uno de los cuales es un GPCR (tal como se describió anteriormente en el presente documento) y otro que es un dominio de unión que se dirige contra y/o se une específicamente al GPCR.

El término “dominio de unión”, tal como se usa en el presente documento, significa la totalidad o parte de una molécula proteica (proteína, similar a proteína o que contiene proteína) que puede unirse usando interacciones intermoleculares específicas a un GPCR. Según una realización particular, el término “dominio de unión” no incluye una pareja de unión que se produce de manera natural de un GPCR, por ejemplo una proteína G, una arrestina, un ligando endógeno; o variantes o derivados (incluyendo fragmentos) de los mismos. Más específicamente, el término “dominio de unión” se refiere a un polipéptido, más particularmente un dominio de proteína. Un dominio de unión a proteína es un elemento de la estructural global de la proteína que es autoestabilizante y se pliega a menudo independientemente de la parte restante de la cadena de la proteína. Los dominios de unión varían en longitud entre aproximadamente 25 aminoácidos y 500 aminoácidos y más. Muchos dominios de unión pueden clasificarse en plegamientos y son estructuras 3D reconocibles e identificables. Algunos plegamientos son tan comunes en muchas proteínas diferentes que se les proporcionan nombres especiales.

Los ejemplos no limitativos son los dominios de unión seleccionados de un haz de 3 ó 4 hélices, un dominio de repetición de tipo armadillo, un dominio de repetición rico en leucina, un dominio PDZ, un dominio SUMO o similar a

SUMO, un dominio de cadherina, un dominio similar a inmunoglobulina, dominio de unión a fosfotirosina, dominio de homología con pleckstrina, dominio 2 de homología con src, entre otros. Un dominio de unión puede derivarse por tanto de una molécula que se produce de manera natural, por ejemplo de componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo, o puede diseñarse de manera totalmente artificial.

5 En general, un dominio de unión puede estar basado en inmunoglobulina o puede estar basado en dominios presentes en proteínas, incluyendo pero limitado a proteínas microbianas, inhibidores de proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas de hélice superenrollada antiparalela de cadena sencilla o proteínas con motivo de repetición. Los ejemplos particulares de los dominios de unión que se conocen en la técnica incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos, anticuerpos de cadena pesada (AChc), anticuerpos de un solo dominio (AcSD), Minibodies, el
10 dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o Nanobodies), el dominio variable de los nuevos receptores de antígeno derivados de anticuerpos de tiburón (VNAR), Alphabodies, proteína A, proteína G, dominios con repeticiones de anquirina diseñadas (DARPin), repeticiones de fibronectina tipo III, anticualinas, knotinas, dominios CH2 modificados por ingeniería (nanoanticuerpos), dominios SH3 modificados por ingeniería, Affibodies, péptidos y proteínas, lipopéptidos (por ejemplo, pepducinas) (véanse, 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; WO2010066740). Frecuentemente, cuando se genera un tipo particular de dominio de unión usando métodos de examen, se usan bibliotecas combinatorias que comprenden una secuencia de región de marco o consenso que contiene posibles residuos de interacción aleatorizados para examinar la unión a una molécula de interés, tal como una proteína.

20 Según una realización preferida, se prevé en particular que el dominio de unión que forma parte del polipéptido químico descrito en el presente documento se derive de un sistema inmunitario innato o adaptativo. Preferiblemente, dicho dominio de unión se deriva de una inmunoglobulina. Preferiblemente, el dominio de unión según la divulgación se deriva de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El término “anticuerpo” (Ac) se refiere en general a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, que se une específicamente y reconoce un antígeno, y que conoce el experto en la técnica. Se pretende que un anticuerpo incluya una inmunoglobulina de cuatro cadenas convencional, que comprende dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y otra “pesada” (de aproximadamente 50 kDa). Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. El término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos de cadena sencilla, y fragmentos de unión a antígeno. En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab’ y F(ab’)2, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos con puentes disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o que consisten en un dominio o bien VL o bien VH, y cualquier combinación de esos o cualquier otra parte funcional de un péptido de inmunoglobulina que puede unirse al antígeno diana. El término “anticuerpos” también pretende incluir anticuerpos sólo de cadena pesada, o fragmentos de los mismos, incluyendo los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, tal como se define más adelante en el presente documento.

El término “dominio variable sencillo de inmunoglobulina” define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio sencillo de inmunoglobulina (que es diferente de las inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos, en los que normalmente dos dominios variables de inmunoglobulina interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno). Sin embargo, debe quedar claro que el término “dominio variable sencillo de inmunoglobulina” sí que comprende fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable sencillo. Preferiblemente, el resto de dominio de unión dentro del alcance de la presente divulgación es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina.

45 Generalmente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina será una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de marco (FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes complementarias (CDR1 a CDR3), preferiblemente según la siguiente fórmula (1): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1), o cualquier fragmento adecuado de la misma (que contendrá entonces habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad). Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que comprenden 4 FR y 3 CDR los conoce el experto en la técnica y se han descrito, como ejemplo no limitativo, en Wesolowski *et al.* 2009. Ejemplos típicos, pero no limitativos, de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina incluyen secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de dominio VL) o un fragmento adecuado de las mismas, o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de dominio VH o secuencia de dominio VHH) o un fragmento adecuado de las mismas, siempre que pueda formar una unidad de unión a antígeno sencilla. Por tanto, según una realización preferida, el resto de dominio de unión es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que es una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de dominio VL) o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de dominio VH); más específicamente, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada. El dominio variable sencillo de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio, o un anticuerpo de un solo dominio, o un “dAB” o dAc, o un Nanobody (tal como se define en el presente documento), u otro dominio variable sencillo de inmunoglobulina, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una

descripción general de anticuerpos de un solo dominio, se hace referencia al siguiente libro: “Single domain antibodies”, *Methods in Molecular Biology*, Eds. Saerens y Muyldermans, 2012, vol. 911. Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina comprenden generalmente una única cadena de aminoácidos que puede considerarse que comprende 4 “secuencias de región de marco” o FR y 3 “regiones determinantes complementarias” o CDR (tal como se definió anteriormente en el presente documento). Debe quedar claro que las regiones de marco de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina también pueden contribuir a la unión de sus antígenos (Desmyter *et al.* 2002; Korotkov *et al.* 2009). La delineación de las secuencias de CDR (y por tanto también las secuencias de FR) pueden basarse en el sistema de numeración única de IMGT para dominios V y dominios similares a V (Lefranc *et al.* 2003). Alternativamente, la delineación de las secuencias de FR y CDR puede realizarse usando el sistema de numeración de Kabat aplicado a dominios VHH de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans (2000).

Debe observarse que los dominios variables sencillos de inmunoglobulina como resto de dominio de unión en su sentido más amplio no se limitan a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. El término “dominio variable sencillo de inmunoglobulina” engloba dominios variables de diferente origen, que comprenden dominios variables de ratón, rata, conejo, asno, ser humano, tiburón, camélido. Según realizaciones específicas, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina se derivan de anticuerpos de tiburón (los denominados nuevos receptores de antígeno de inmunoglobulina o IgNAR), más específicos de anticuerpos de tiburón de cadena pesada que se producen de manera natural, carentes de cadenas ligeras, y se conocen como secuencias de dominio VNAR. Preferiblemente, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina se derivan de anticuerpos de camélido. Más preferiblemente, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina se derivan de anticuerpos sólo de cadena pesada de camélido que se producen de manera natural, carentes de cadenas ligeras, y se conocen como secuencias de dominio VHH o Nanobodies.

Según una realización particularmente preferida, el resto de dominio de unión comprendido en el polipéptido químico descrito en el presente documento es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que es un Nanobody (tal como se define más adelante en el presente documento, e incluyendo pero sin limitarse a un VHH). El término “Nanobody” (Nb), tal como se usa en el presente documento, es un fragmento de unión a antígeno de un solo dominio. Se refiere en particular a un dominio variable sencillo derivado de anticuerpos sólo de cadena pesada que se producen de manera natural y que conoce el experto en la técnica. Los Nanobodies se derivan habitualmente de anticuerpos sólo de cadena pesada (carentes de cadenas ligeras) observados en camélidos (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Desmyter *et al.* 1996) y, por consiguiente, se denominan a menudo anticuerpo de VHH o secuencia de VHH. 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*). Nanobody® y Nanobodies® son marcas registradas de Ablynx NV (Bélgica). Para una descripción adicional de VHH o Nanobodies, se hace referencia al libro “Single domain antibodies”, *Methods in Molecular Biology*, Eds. Saerens y Muyldermans, 2012, vol. 911, en particular al capítulo de Vincke y Muyldermans (2012), así como a una lista no limitativa de solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes de la técnica generales, e incluyen: los documentos WO 94/04678, WO 95/04079, WO 96/34103 de Vrije Universiteit Brussel; los documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1 134 231 y WO 02/48193 de Unilever; los documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 de Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx N.V. y las solicitudes de patente publicadas adicionales de Ablynx N.V. Tal como sabrá el experto en la técnica, los Nanobodies se caracterizan en particular por la presencia de uno o más “residuos distintivos” de *Camelidae* en una o más de las secuencias de región de marco (según la numeración de Kabat), tal como se describe por ejemplo en el documento WO 08/020079, en la página 75, Tabla A-3. Debe observarse que los Nanobodies descritos en el presente documento en su sentido más amplio no se limitan a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. Por ejemplo, pueden obtenerse en general Nanobodies: (1) mediante el aislamiento del dominio VHH de un anticuerpo sólo de cadena pesada que se produce de manera natural; (2) mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio VHH que se produce de manera natural; (3) mediante la “humanización” de un dominio VHH que se produce de manera natural o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio VHH humanizado; (4) mediante la “camelización” de un dominio VHH que se produce de manera natural de cualquier especie animal, y en particular de una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio VH camelizado; (5) mediante la “camelización” de un “anticuerpo de dominio” o “Dab” tal como se describe en la técnica, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio VH camelizado; (6) usando técnicas de síntesis o semisíntesis para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos conocidas *per se*; (7) mediante la preparación de un ácido nucleico que codifica para un Nanobody usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, seguido por la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) mediante cualquier combinación de uno o más de los anteriores. Una descripción adicional de Nanobodies, incluyendo humanización y/o camelización de Nanobodies, puede hallarse por ejemplo en los documentos WO08/101985 y WO08/142164, así como más adelante en el presente documento. Una clase particular de Nanobodies que interactúan con los epítopos conformacionales de dianas nativas y que estabilizan la diana en una conformación no predominante única (diferente de la conformación basal) se denominan Xaperones y se prevén en particular en el presente documento. Xaperones son herramientas únicas en la biología estructural. Xaperone™ es una marca comercial de VIB y VUB (Bélgica). Al rigidizar las regiones flexibles y ocultar superficies de

agregación, los complejos de Xaperone™ justifican muestras uniformes a nivel conformacional que son clave para la determinación estructural de proteínas mediante cristalografía de rayos X. Las principales ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo de camélido como adyuvante de cristalización son que Xaperones (1) se unen a epítomos crípticos y bloquean las proteínas en conformaciones nativas únicas, (2) aumentan la estabilidad de proteínas solubles y proteínas de membrana solubilizadas, (3) reducen la complejidad conformacional de proteínas solubles y proteínas de membrana solubilizadas, (4) aumentan la superficie polar permitiendo el crecimiento de cristales de difracción, (5) secuestran superficies de agregación o polimerización, (6) permiten atrapar por afinidad proteína activa.

Dentro del alcance de la presente divulgación, el término “dominio variable sencillo de inmunoglobulina” también engloba dominios variables que se “humanizan” o “camelizan”, en particular Nanobodies que se “humanizan” o “camelizan”. Por ejemplo pueden realizarse tanto “humanización” como “camelización” proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio V_HH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, y luego cambiando, de manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal modo que la nueva secuencia de nucleótidos codifica para un dominio variable sencillo de inmunoglobulina “humanizado” o “camelizado” descrito en el presente documento, respectivamente. Este ácido nucleico puede expresarse entonces de manera conocida *per se*, de modo que se proporcionen los dominios variables sencillos de inmunoglobulina deseados descritos en el presente documento. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_HH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados descritos en el presente documento, respectivamente, puede diseñarse y entonces sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio VHH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, una secuencia de nucleótidos que codifica para los dominios variables sencillos de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados descritos en el presente documento, respectivamente, puede diseñarse y entonces sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, después de lo cual el ácido nucleico así obtenido puede expresarse de manera conocida *per se*, de modo que se proporcionen los dominios variables sencillos de inmunoglobulina deseados descritos en el presente documento. Otros métodos y técnicas adecuados para obtener los dominios variables sencillos de inmunoglobulina y/o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, partiendo de secuencias de VH, o preferiblemente secuencias de VHH, que se producen de manera natural, estarán claros para el experto, y pueden comprender por ejemplo combinar una o más partes de una o más secuencias de VH que se producen de manera natural (tales como una o más secuencias de FR y/o secuencias de CDR), una o más partes de una o más secuencias de VHH que se producen de manera natural (tales como una o más secuencias de FR o secuencias de CDR) y/o una o más secuencias sintéticas o semisintéticas, de manera adecuada, de modo que se proporcione un Nanobody descrito en el presente documento o una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica para el mismo.

También dentro del alcance de la presente divulgación están análogos, mutantes, variantes, alelos, partes o fragmentos naturales o sintéticos (denominados colectivamente en el presente documento “variantes”) de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, tal como se define en el presente documento, y en particular variantes de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 13-20 (véanse las tablas 1-2). Por tanto, según una realización, el término “dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la divulgación” o “dominio variable sencillo de inmunoglobulina descrito en el presente documento” o “Nanobody de la divulgación” o “Nanobody descrito en el presente documento” en su sentido más amplio también cubre tales variantes. Generalmente, en tales variantes, uno o más residuos de aminoácido pueden haberse reemplazado, delecionado y/o añadido, en comparación con los dominios variables sencillos de inmunoglobulina descritos en el presente documento tal como se define en el presente documento. Tales sustituciones, inserciones o deleciones pueden realizarse en una o más de las FR y/o en una o más de las CDR, y en particular variantes de las FR y las CDR de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 13-20 (véanse las tablas 1-2). Variantes, tal como se usa en el presente documento, son secuencias en las que cada o cualquier región de marco y cada o cualquier región determinante de la complementariedad muestra una identidad de al menos el 80%, preferiblemente una identidad de al menos el 85%, más preferiblemente una identidad del 90%, incluso más preferiblemente una identidad del 95% o, todavía incluso más preferiblemente una identidad del 99% con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir FR1_variante frente a FR1_referencia, CDR1_variante frente a CDR1_referencia, FR2_variante frente a FR2_referencia, CDR2_variante frente a CDR2_referencia, FR3_variante frente a FR3_referencia, CDR3_variante frente a CDR3_referencia, FR4_variante frente a FR4_referencia), tal como puede medirse electrónicamente haciendo uso de algoritmos tales como PILEUP y BLAST. Está disponible para el público software para realizar análisis de tipo BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se entenderá que para determinar el grado de identidad de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de las CDR de una o más secuencias de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, los residuos de aminoácido que forman las regiones de marco se descartan. De manera similar, para determinar el grado de identidad de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de las FR de una o más secuencias de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina descritos en el presente documento, los residuos de aminoácido que forman las regiones de complementariedad se descartan. Tales variantes de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina pueden ser de ventaja particular puesto que pueden tener potencia/afinidad mejorada.

A modo de ejemplos no limitativos, una sustitución puede ser, por ejemplo, una sustitución conservativa (tal como se describe en el presente documento) y/o puede reemplazarse un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que aparece de manera natural en la misma posición en otro dominio VHH. Por tanto, una cualquiera o más sustituciones, deleciones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina o bien que no restan en cuanto a las propiedades deseadas o al equilibrio o la combinación de propiedades deseadas del dominio variable sencillo de inmunoglobulina (es decir, en la medida en que los dominios variables sencillos de inmunoglobulina ya no son adecuados para su uso pretendido) están incluidos dentro del alcance de la divulgación. Un experto podrá determinar y seleccionar generalmente sustituciones, deleciones o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar, por ejemplo, introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina así obtenidos.

También están englobados dentro del alcance de la presente divulgación los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que están en una forma "multivalente" y se forman uniendo, químicamente o mediante técnicas de recombinante ADN, conjuntamente dos o más dominios variables sencillos de inmunoglobulina monovalentes. Los ejemplos no limitativos de constructos multivalentes incluyen constructos "bivalentes", constructos "trivalentes", constructos "tetraivalentes", etcétera. Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina comprendidos dentro de un constructo multivalente pueden ser idénticos o diferentes. En otra realización particular, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina descritos en el presente documento están en una forma "multiespecífica" y se forman uniendo conjuntamente dos o más los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, de los que al menos uno tiene una especificidad diferente. Los ejemplos no limitativos de constructos multiespecíficos incluyen constructos "biespecíficos", constructos "triespecíficos", constructos "tetraespecíficos", etcétera. Para ilustrar esto adicionalmente, cualquier dominio variable sencillo de inmunoglobulina (tal como se define en el presente documento) multivalente o multiespecífico descrito en el presente documento puede dirigirse de manera adecuada contra dos o más epítopos diferentes en el mismo antígeno, por ejemplo contra dos o más epítopos de GPCR diferentes; o puede dirigirse contra dos o más antígenos diferentes, por ejemplo contra un epítipo de GPCR y un epítipo de una pareja de unión natural de GPCR (por ejemplo, proteína G, β -arrestina). En particular, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina monovalente descrito en el presente documento es tal que se unirá al GPCR diana con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM. Los dominios variables también pueden tener (o modificarse por ingeniería y/o seleccionarse por) avidéz aumentada y/o selectividad mejorada por el GPCR deseado, y/o por cualquier otra propiedad deseada o combinación de propiedades deseadas que pueden obtenerse mediante el uso de tales dominios variables sencillos de inmunoglobulina multivalentes o multiespecíficos. En una realización particular, tales dominios de unión multivalentes o multiespecíficos descritos en el presente documento también pueden tener (o modificarse por ingeniería y/o seleccionarse por) eficacia mejorada en la modulación de la actividad de señalización de un GPCR (véase también más adelante en el presente documento).

Además, y dependiendo del organismo huésped usado para expresar el polipéptido quimérico descrito en el presente documento, pueden diseñarse deleciones y/o sustituciones dentro del resto de dominio de unión de tal modo que, por ejemplo, se retiran uno o más sitios para modificación postraduccional (tal como uno o más sitios de glicosilación), tal como estará dentro de las aptitudes del experto en la técnica. Alternativamente, pueden diseñarse sustituciones o inserciones de modo que se introduzcan uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe más adelante en el presente documento).

Examen y selección de restos de dominio de unión adecuados para la invención

Una clase preferida de los dominios de unión, en particular los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que forman parte del polipéptido quimérico descrito en el presente documento, se dirigen contra y/o se unen específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR (tal como se describió anteriormente en el presente documento). Los dominios de unión selectivos a nivel conformacional, en particular los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, pueden identificarse de varios modos, y se ilustrarán a continuación en el presente documento de manera no limitativa para VHH. Preferiblemente, pueden seleccionarse dominios de unión selectivos para la conformación después de la etapa de 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 agonista de modo que se produzcan anticuerpos dirigidos contra un GPCR en su estado conformacional activo). Opcionalmente, un ligando particular puede acoplarse al GPCR de interés mediante reticulación química. Por tanto, tal como se describe más adelante en el presente documento, tales secuencias de VHH pueden generarse u obtenerse preferiblemente inmunizando de manera adecuada una especie de camélido con un GPCR, preferiblemente un GPCR en un estado conformacional funcional (es decir, de modo que produzca una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos sólo de cadena pesada dirigidos contra dicho GPCR), obteniéndose una muestra biológica adecuada a partir de dicho camélido (tal como una muestra de sangre, o cualquier muestra de células B) y generando secuencias de VHH dirigidas contra dicho GPCR, partiendo de dicha muestra. Tales técnicas estarán claras para el experto. Aún otra técnica para obtener las secuencias de VHH deseadas implica inmunizar de manera adecuada un

mamífero transgénico que puede expresar anticuerpos sólo de cadena pesada (es decir, de modo que produzca una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos sólo de cadena pesada dirigidos contra 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 células B) y entonces generar secuencias de VHH dirigidas contra dicho GPCR partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*. Por ejemplo, para ello, pueden usarse los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y las técnicas adicionales descritos en el documento WO02085945 y en el documento WO04049794.

Para la inmunización de un animal con un GPCR, el GPCR puede producirse y purificarse usando métodos convencionales que pueden emplear expresar una forma recombinante de GPCR en una célula huésped, y purificar el GPCR usando métodos basados en cromatografía de afinidad y/o anticuerpos. En realizaciones particulares, puede emplearse el sistema baculovirus/Sf-9 para la expresión, aunque también pueden usarse otros sistemas de expresión (por ejemplo, sistemas de células bacterianas, de levadura o de mamífero). Se describen métodos a modo de ejemplo para expresar y purificar GPCR, 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 muchas otras referencias. Un GPCR también puede reconstituirse en vesículas de fosfolípidos. Asimismo, se conocen métodos 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, el GPCR y los fosfolípidos pueden reconstituirse a alta densidad de fosfolípidos (por ejemplo, 1 mg de receptor por mg de fosfolípido). En realizaciones particulares, las vesículas de fosfolípidos pueden someterse a prueba para confirmar que el GPCR es 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 en el exterior de la vesícula). Otros métodos de inmunización con un GPCR incluyen, sin limitación, el uso de células completas que expresan un GPCR o fracciones del mismo, vacunación con una secuencia de ácido nucleico que codifica para un GPCR (por ejemplo, vacunación con ADN), inmunización con virus o partículas pseudovirales que expresan un GPCR, entre otros (por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO2010070145, WO2011083141).

Cualquier animal adecuado, en particular un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca, tiburón, cerdo, entre otros, o un ave tal como una gallina o un pavo, puede inmunizarse usando cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica adecuadas para generar una respuesta inmunitaria.

La selección para Nanobodies, como ejemplo no limitativo, que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de dicho GPCR puede realizarse, por ejemplo, examinando un conjunto, una colección o biblioteca de células que expresan anticuerpos sólo de cadena pesada sobre su superficie (por ejemplo, células B obtenidas de un camélido inmunizado de manera adecuada), o bacteriófagos que presentan una fusión de genIII y Nanobody en su superficie, o células de levadura que presentan una fusión de la proteína de factor de apareamiento Aga2p, examinando una biblioteca (virgen o inmunitaria) de secuencias de VHH o secuencias de Nanobody, o examinando una biblioteca (virgen o inmunitaria) de secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias de VHH o secuencias de Nanobody, que pueden realizarse todos de manera conocida *per se*, y método que opcionalmente puede comprender además una o más de otras etapas adecuadas, tales como, por ejemplo y sin limitación, una etapa de maduración por afinidad, una etapa de expresión de la secuencia de aminoácidos deseada, una etapa de examen para determinar la unión y/o la actividad contra el antígeno deseado (en este caso, el GPCR), una etapa de determinación de la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos deseada, una etapa de introducción de una o más sustituciones de humanización, una etapa de cambio de formato a un formato multivalente y/o multispecífico adecuado, una etapa de examen 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 tales etapas, en cualquier orden adecuado.

Pueden usarse diversos métodos para determinar la unión específica (tal como se definió anteriormente en el presente documento) entre el dominio de unión y un GPCR diana, incluyendo por ejemplo, ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), citometría de flujo, ensayos de unión a radioligandos, ensayos de resonancia de plasmón superficial, presentación en fago, y similares, que son práctica común en la técnica, por ejemplo, se comenta en Sambrook *et al.* (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, y se ilustran adicionalmente en la sección de ejemplos. Se apreciará que para ello a menudo se usará un marcador o una etiqueta únicos, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o un marcador de radioisótopo, tal como se describe más adelante en el presente documento.

Un modo particularmente preferido de seleccionar agentes de unión selectiva para la conformación es tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2012/007593. En una realización alternativa preferida, también puede realizarse la selección de agentes de unión selectiva para la conformación usando clasificación celular para seleccionar, de una población de células que comprenden una biblioteca de agentes de unión extracelulares anclados a la superficie celular, células que se unen específicamente o bien al GPCR en su conformación activa o bien al GPCR en su conformación inactiva, pero no a ambos, por ejemplo tal como se describe en Kruse *et al.* (2013). Sin el propósito de ser limitativo, la selección de agentes de unión selectiva para la conformación también se ilustra más adelante en la sección de ejemplos.

También se espera que el dominio de unión podrá unirse generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes, fragmentos e isoformas que se producen de manera natural o sintéticos de un GPCR particular comprendido en el polipéptido quimérico descrito en el presente documento; o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes, fragmentos e isoformas de un GPCR particular que contiene uno o más determinante antigénicos o epítomos que son esencialmente iguales que los determinante(s) antigénico(s) o epítomo(s) al/a los que se une(n) los dominios de unión descritos en el presente documento para un GPCR particular.

Resto de ligador

Dentro del contexto de la presente divulgación, el resto de dominio de unión y el resto de GPCR (o eventualmente todavía para otros restos, tal como se describe más adelante en el presente documento) pueden fusionarse entre sí directa o indirectamente, mediante lo cual habitualmente se produce el acoplamiento indirecto a través del uso de secuencias de aminoácidos intermedias o restos de ligador. "Moléculas de ligador" o "ligadores" preferidos son péptidos de 1 a 200 aminoácidos de longitud, y se eligen normalmente, pero no necesariamente, o se diseñan para que sean no estructurados y flexibles. Por ejemplo, pueden elegirse aminoácidos que no forman una estructura secundaria particular. O bien, pueden elegirse aminoácidos de modo que no formen una estructura terciaria estable. O bien, los ligadores de aminoácidos pueden formar una espiral al azar. Tales ligadores incluyen, pero no se limitan a, péptidos sintéticos ricos en Gly, Ser, Thr, Gln, Glu o aminoácidos adicionales que se asocian frecuentemente con regiones no estructuradas en proteínas naturales (Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., & Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics (Oxford, Inglaterra)*, 21(16), 3433-4.). Los ejemplos no limitativos incluyen (GS)₅ o (GS)₁₀. Otros ejemplos no limitativos de secuencias de ligador adecuadas también se describen en la sección de ejemplos.

En muchos casos, aunque no necesariamente, la concentración intramolecular eficaz (tal como se define en el presente documento) dependerá de la longitud del ligador en una fusión GPCR-dominio de unión. Por consiguiente, se elegirá una longitud del ligador óptima de modo que la concentración intramolecular eficaz alcance un valor máximo. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del ligador tiene una baja susceptibilidad a la escisión proteolítica y no interfiere en la actividad biológica del polipéptido quimérico.

Por tanto, según realizaciones específicas, la secuencia de aminoácidos (AA) del ligador es un péptido de entre 0 y 200 aa, entre 0 y 150 aa, entre 0 y 100 aa, entre 0 y 90 aa, entre 0 y 80 aa, entre 0 y 70 aa, entre 0 y 60 aa, entre 0 y 50 aa, entre 0 y 40 aa, entre 0 y 30 aminoácidos, entre 0 y 20 aa, entre 0 y 10 aminoácidos, entre 0 y 5 aminoácidos. Los ejemplos de secuencias de ligadores cortos incluyen, pero no se limitan a, PPP, PP o GS.

Para determinadas aplicaciones, puede resultar ventajoso que la molécula de ligador comprenda o consista en uno o más motivos de secuencia particulares. Por ejemplo, puede introducirse un sitio de escisión proteolítica en la molécula de ligador de tal manera que el resto de GPCR y el resto de dominio de unión pueden liberarse. Se conocen en la técnica sitios de escisión útiles, e incluyen un sitio de escisión de proteasa tal como el sitio de escisión de factor Xa que tiene la secuencia IEGR (SEQ ID NO: 47), el sitio de escisión de trombina que tiene la secuencia LVPR (SEQ ID NO: 48), el sitio de escisión de enterocinasa que tiene la secuencia DDDDK (SEQ ID NO: 49) o el sitio de escisión de PreScission (o 3C) LEVLFQGP (SEQ ID NO: 50).

En caso de que el resto de dominio de unión y el resto de GPCR se unan usando métodos quimioenzimáticos para la modificación de proteínas, el resto de ligador puede existir de diferentes entidades químicas, dependiendo de las enzimas o la química de síntesis que se usa para producir la quimera covalente *in vivo* o *in vitro* (Rabuka 2010).

Otros restos y modificaciones

El polipéptido quimérico descrito en el presente documento puede modificarse adicionalmente y/o puede comprender (o puede fusionarse además a) otros restos, tal como se describe más adelante en el presente documento. Ejemplos de modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácido dentro del polipéptido quimérico descrito en el presente documento que pueden modificarse (es decir, o bien en la estructura principal de la proteína pero preferiblemente en una cadena lateral), métodos y técnicas que pueden usarse para introducir tales modificaciones y los posibles usos y ventajas de tales modificaciones estarán claras para el experto. Por ejemplo, una modificación de este tipo 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 polipéptido quimérico, en particular en o sobre el resto de dominio de unión o en o sobre el resto de GPCR, y/o opcionalmente en o sobre el resto de ligador. Ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para su introducción estarán claras para el experto, y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y técnicas mencionados en la técnica así como los grupos funcionales y las técnicas conocidos *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (incluyendo ScFv y anticuerpos de un solo dominio), para los que se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales pueden unirse, por ejemplo, directamente (por ejemplo, covalentemente) al polipéptido quimérico, u opcionalmente mediante un ligador o espaciador adecuado, tal como estará claro de nuevo para el experto. Una modificación habitualmente menos preferida comprende glicosilación unida a N o unida a O, habitualmente como parte de modificación cotraduccional y/o postraduccional, dependiendo

de la célula huésped usada para expresar el polipéptido quimérico descrito en el presente documento. Aún otra modificación puede comprender la introducción de uno o más marcadores detectables u otros grupos o restos de generación de señales, dependiendo del uso pretendido del polipéptido quimérico marcado. Marcadores adecuados y técnicas para su unión, uso y detección estarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, 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 termomático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos, metales, quelatos de metales o cationes metálicos u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para su uso en la detección y obtención de imágenes *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotina-avidina peroxidasa, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otros marcadores adecuados estarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen restos que pueden detectarse usando espectroscopía de RMN o ESR. Tales polipéptidos quiméricos marcados pueden usarse, por ejemplo, para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos *per se* tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de tipo sándwich", etc.) así como para fines de selección como diana y obtención de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección del marcador específico. Tal como resultará claro 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 hizo referencia anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen, por ejemplo sin limitación, ácido dietilentiainopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que forma parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Un grupo funcional de este tipo puede usarse para unir el polipéptido quimérico descrito en el presente documento a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir a través de la formación del par de unión. Por ejemplo, un polipéptido quimérico descrito en el presente documento puede conjugarse con biotina, y unirse a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, tal polipéptido quimérico conjugado puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema de detección en el que un agente de producción de señales detectable se conjuga con avidina o estreptavidina. Tales pares de unión también pueden usarse, por ejemplo, para unir el polipéptido quimérico descrito en el presente documento a un portador, incluyendo portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Tales pares de unión también pueden usarse para unir un agente terapéuticamente activo al polipéptido quimérico descrito en el presente documento.

Composiciones que comprenden un polipéptido quimérico

El polipéptido quimérico descrito en el presente documento también puede comprender (o pueden fusionarse además a) otras moléculas, en particular ligandos, incluyendo un ligando de receptor (tal como un agonista total, agonista parcial, antagonista, agonista inverso, agonista sesgado, pareja de unión natural, y similares). Por tanto, según un aspecto, la divulgación también prevé un complejo que comprende un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente en el presente documento y un ligando de receptor. Como ejemplo no limitativo, puede purificarse un complejo estable mediante cromatografía de exclusión molecular. En una realización preferida, el complejo descrito en el presente documento está en una forma solubilizada, tal como en un detergente. En una realización alternativa preferida, el complejo descrito en el presente documento se inmoviliza en un soporte sólido. Se describen ejemplos no limitativos de soportes sólidos así como métodos y técnicas para la inmovilización más adelante en la descripción detallada. En todavía otra realización, el complejo descrito en el presente documento está en una composición celular, incluyendo un organismo, un tejido, una célula, una línea celular, o en una composición de membrana o composición liposomal derivada de dicho organismo, tejido, célula o línea celular. Los ejemplos de composiciones de membrana o liposomales incluyen, pero no se limitan a orgánulos, preparaciones de membrana, virus, lipopartículas pseudovirales (VLP) y similares. Se apreciará que una composición celular, o una composición de membrana o liposomal puede comprender lípidos naturales o sintéticos. En aún otra realización preferida, el complejo es cristalino. Así, también se proporciona un cristal del complejo, así como métodos de preparación de dicho cristal, que se describen con mayor detalle a continuación. Preferiblemente, se prevé una forma cristalina de un complejo que comprende un polipéptido quimérico descrito en el presente documento y un ligando de receptor.

Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a una composición de membrana o liposomal que comprende un polipéptido quimérico o un complejo tal como se describió anteriormente. Pueden derivarse composiciones de membrana de un tejido, una célula o línea celular e incluyen orgánulos, extractos de membrana o fracciones de los mismos, VLP, virus, y similares, siempre que se conserve una suficiente funcionalidad de los polipéptidos quiméricos.

Sistemas de expresión

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido quimérico descrito en el presente documento y tal como se describió anteriormente en el presente documento. Según una realización particular, la divulgación se refiere a una molécula

de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido quimérico descrito en el presente documento, en el que el ácido nucleico codifica desde 5' hasta 3':

- un péptido señal,
- una etiqueta epitópica,
- 5 • un sitio de escisión de proteasa,
- un GPCR de interés,
- un dominio de unión selectivo para la conformación que selecciona como diana el GPCR de interés

Alternativamente, según otra realización particular, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido quimérico descrito en el presente documento, en el que el ácido nucleico codifica desde 5' hasta 3':

- un péptido señal,
- una etiqueta epitópica,
- un sitio de escisión de proteasa,
- un dominio de unión selectivo para la conformación que selecciona como diana un GPCR de interés,
- 15 • el GPCR de interés

Tales moléculas de ácido nucleico se ejemplifican más adelante en la sección de ejemplos.

Además, la presente divulgación también prevé vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento, así como células huésped que expresan tales vectores de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos e inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión en virus, tales como baculovirus, virus del bosque de Semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insecto o de mamífero. La clonación y/o expresión de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento pueden realizarse según técnicas conocidas por el experto en la técnica.

La "célula huésped" según la presente divulgación puede ser de cualquier organismo procarionta o eucariota. Según una realización preferida, la célula huésped es una célula eucariota y puede ser de cualquier organismo eucariota, pero en realizaciones particulares se prevén células de levadura, planta, mamífero e insecto. La naturaleza de las células usadas dependerá normalmente de la facilidad y el coste de producción del polipéptido quimérico, las propiedades de glicosilación deseadas, el origen del polipéptido quimérico, la aplicación pretendida, o cualquier combinación de los mismos. Las células de mamífero pueden usarse, por ejemplo, para lograr una glicosilación compleja, pero puede no ser rentable producir proteínas en sistemas de células de mamífero.

Las células de plantas e insectos, así como levadura logran normalmente altos niveles de producción y son más rentables, pero pueden ser necesarias modificaciones adicionales para imitar los patrones de glicosilación compleja de las proteínas de mamífero. A menudo se usan células de levadura para la expresión de proteínas porque pueden cultivarse de manera económica, proporcionar altos rendimientos de proteína (secretada en el medio), y cuando se modifican apropiadamente pueden producir proteínas que tienen patrones de glicosilación adecuados. Además, la levadura ofrece una genética establecida que permite rápidas transformaciones, estrategias de localización de proteínas sometidas a prueba, y técnicas de fácil desactivación génica. Las células de insecto también son un sistema atractivo para expresar los GPCR porque las células de insecto ofrecen un sistema de expresión sin interferir en la señalización de GPCR de mamífero. Se conocen bien en la técnica células o líneas celulares eucariotas para la producción de proteínas, incluyendo líneas celulares con rutas de glicosilación modificadas, y se proporcionarán ejemplos no limitativos a continuación en el presente documento.

Las células huésped animales o de mamífero adecuadas para albergar, expresar y producir proteínas para su posterior aislamiento y/o purificación incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin *et al.*, 1986; Kolkekar *et al.*, 1997), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada como ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, R.U.), CHO clon 13 (GEIMG, Génova, IT), CHO clon B (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada como ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, R.U.), RR-CHOK1 designada como ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, R.U.), células CHO negativas para dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980) y células dp12.CHO (patente estadounidense n.º 5.721.121); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o células 293T o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, 1977, J. Gen. Virol., 36:59, o células GnTI KO HEK293S, Reeves *et al.* 2002); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL-10); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL-70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81);

5 células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23:243-251); células de carcinoma cervicouterino humano (HELA, ATCC CCL-2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982); células MCR 5; células FS4. Según una realización particular, las células son células de mamífero seleccionadas de células Hek293 o células COS.

10 Las líneas celulares que no son de mamífero a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, células de insecto, tales como sistemas de expresión en células Sf9/baculovirus (por ejemplo, revisión de Jarvis, Virology volumen 310, número 1, 25 de mayo de 2003, páginas 1-7), células vegetales tales como células de tabaco, células de tomate, células de maíz, células de algas o levaduras tales como especies de *Saccharomyces*, especies de *Schizosaccharomyces*, especies de *Hansenula*, especies de *Yarrowia* o especies de *Pichia*. Según realizaciones particulares, las células eucariotas son células de levadura de una especie de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* sp. (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), una especie de *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha*), una especie de *Yarrowia* (por ejemplo, *Yarrowia lipolitica*), una especie de *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), una especie de *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*), o una especie de *Komagataella* (por ejemplo, *Komagataella pastoris*). Según una realización específica, las células eucariotas son células de *Pichia*, y en la realización más particular células de *Pichia pastoris*.

20 Puede llevarse a cabo la transfección de células diana (por ejemplo, células de mamífero) siguiendo los principios expuestos por Sambrook y Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, volumen 3, capítulo 16, secciones 16.1-16.54). Además, también puede realizarse transducción viral usando reactivos tales como vectores adenovirales. La selección del sistema de vector viral, regiones reguladoras y célula huésped apropiados es conocimiento común dentro del nivel de conocimiento habitual en la técnica. Las células transfectadas resultantes se mantienen en cultivo o se congelan para su uso posterior según prácticas convencionales.

25 Por consiguiente, otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método para producir un polipéptido quimérico según la presente divulgación, comprendiendo el método al menos las etapas de:

a) expresar en un sistema de expresión celular adecuado (tal como se definió anteriormente en el presente documento) un ácido nucleico que codifica para un polipéptido quimérico según la presente divulgación, y opcionalmente

b) aislar y/o purificar dicho polipéptido quimérico.

30 Los polipéptidos quiméricos restringidos a nivel conformacional descritos anteriormente pueden considerarse por tanto herramientas proteicas individuales novedosas que son particularmente útiles para el examen y descubrimiento de fármacos (en su sentido más amplio), todo lo cual se detalla adicionalmente a continuación en el presente documento.

Aplicaciones

35 Los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento y los ácidos nucleicos que codifican para los mismos, complejos, células y composiciones celulares derivadas de los mismos, pueden usarse en una variedad de contextos y aplicaciones, por ejemplo y sin limitación, (1) para la separación directa y/o purificación de un polipéptido quimérico como proteína individual, en el que el GPCR de interés se estabiliza de manera constitutiva en una conformación de interés; (2) para estudios de cristalización y análisis estructural de alta resolución de los GPCR haciendo uso de un polipéptido quimérico descrito en el presente documento; (3) para el examen de ligandos y el descubrimiento (basado en la estructura) de fármacos, (4) para expresar de manera estable y constitutiva un GPCR como proteína de fusión individual en una conformación de interés en una superficie celular o en otra fracción de membrana celular, todo lo cual se describirá con mayor detalle a continuación.

Métodos de separación y purificación

45 Una ventaja clave de la presente divulgación es que un GPCR puede separarse y purificarse en una conformación de interés en una estequiometría 1:1 definida de GPCR con respecto un dominio de unión. Una ventaja particular de la presente divulgación es que el dominio de unión en el polipéptido quimérico puede estabilizar una conformación de receptor particular a una concentración intramolecular eficaz muy alta, incluso en ausencia de cualquier ligando. Además, los expertos habituales en la técnica reconocerán que los dominios de unión que se unen selectivamente a un estado plegado de un GPCR protegerán este GPCR frente a la desnaturalización química o térmica, aumentando por tanto la estabilidad conformacional y/o termoestabilidad. Por tanto, el polipéptido quimérico puede separarse de una mezcla, y opcionalmente purificarse como proteína individual en el que el receptor adopta la conformación que se estabiliza por el dominio de unión. Este polipéptido quimérico separado o purificado es una herramienta muy útil y directa para la posterior cristalización, caracterización de ligandos y examen de compuestos, inmunizaciones, entre otros.

55 Por consiguiente, la presente divulgación prevé un método de separar y/o purificar un polipéptido quimérico que comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión que se une específicamente al GPCR, comprendiendo el

método la etapa de separar y/o purificar el polipéptido quimérico mediante cualquier medio adecuado.

Alternativamente, puede desearse generar en primer lugar un complejo de un polipéptido quimérico tal como se describió anteriormente en el presente documento y un ligando de receptor (por ejemplo, un ligando ortostérico, un ligando alostérico, una proteína de unión natural tal como una proteína G, y similares), que entonces puede separarse posteriormente y purificarse eventualmente.

Por tanto, la presente divulgación también prevé un método de separar y/o purificar un complejo de un polipéptido quimérico y un ligando de receptor, comprendiendo el método la etapa de separar y/o purificar el complejo mediante cualquier medio adecuado.

En esencia, pueden usarse igualmente los mismos métodos que se usan con frecuencia para producir y purificar los GPCR (véase anteriormente) para la producción y purificación de los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación. Los métodos para aislar/purificar polipéptidos quiméricos tal como se describió anteriormente incluyen, sin limitación, métodos basados en afinidad tales como cromatografía de afinidad, purificación por afinidad, inmunoprecipitación, detección de proteínas, inmunoquímica, presentación a la superficie, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, entre otros, y todos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido quimérico puede expresarse en forma recombinante en una célula huésped, y purificarse posteriormente usando métodos basados en cromatografía de afinidad y/o anticuerpos. En realizaciones particulares, puede emplearse el sistema baculovirus/Sf-9 para la expresión, aunque también pueden usarse otros sistemas de expresión (por ejemplo, sistemas de células bacterianas, de levadura o de mamífero) (tal como se describe más adelante en el presente documento).

Cristalografía y aplicaciones en el diseño de fármacos basado en la estructura

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a la utilidad de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento en cristalografía de rayos X de los GPCR y sus aplicaciones en el diseño de fármacos basado en la estructura.

La cristalización de proteínas de membrana incluyendo los GPCR sigue representando un reto. Aunque están apareciendo métodos de expresión y purificación que permiten la generación de cantidades de miligramos, lograr estabilidad con estas moléculas es quizá el obstáculo más difícil de superar, especialmente en vista de las múltiples conformaciones que pueden adoptar estas proteínas. La estabilidad de receptor aumentada de los GPCR solubilizados en detergente los protege frente a la degradación proteolítica y/o agregación y facilita la purificación y concentración de muestras homogéneas de proteínas plegadas correctamente. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que tales muestras son el punto de partida preferido para la generación de cristales de difracción.

El propio proceso de cristalización es otro problema importante en el procedimiento de determinación de la estructura macromolecular mediante cristalografía de rayos X. Una cristalización satisfactoria requiere la formación de núcleos y su posterior crecimiento para dar cristales de tamaño adecuado. El crecimiento de cristales se produce generalmente de manera espontánea en una disolución sobresaturada como resultado de una nucleación homogénea. Pueden cristalizarse proteínas en un experimento de examen de matriz dispersa típico, en el que se toman muestras de forma extensa de precipitantes, aditivos y concentración de proteína, y pueden identificarse condiciones de sobresaturación adecuadas para la nucleación y el crecimiento de cristales para una proteína particular. Está relacionado con el enfoque de examen de matriz dispersa el generar una variación estructural en la propia proteína, por ejemplo añadiendo ligandos que se unen a la proteína, o realizando diferentes mutaciones, preferentemente en residuos de superficie de la proteína diana o intentando cristalizar diferentes ortólogos de especie de la proteína diana.

Dado que la cristalización implica una pérdida desfavorable de entropía conformacional en la molécula que va a ensamblarse en la red cristalina, los métodos que reducen la entropía conformacional de la diana mientras que está todavía en disolución deben potenciar la posibilidad de cristalización disminuyendo la penalización entrópica neta de la formación de la red cristalina. El enfoque de "reducción de la entropía de superficie" ha demostrado ser sumamente eficaz (Derewenda 2004). Asimismo, algunas parejas de unión tales como iones, ligandos de molécula pequeña y péptidos pueden reducir la heterogeneidad conformacional mediante la unión a y estabilización de un subconjunto de estados conformacionales de una proteína. Aunque tales parejas de unión son eficaces, no todas las proteínas tienen una pareja de unión conocida, e incluso cuando se conoce una pareja de unión, su afinidad, solubilidad y estabilidad química pueden no ser compatibles con los ensayos de cristalización.

La cristalización de GPCR para estudios estructurales de alta resolución es particularmente difícil por la superficie anfífila de estas proteínas de membrana. Incluidos en la membrana bicapa, 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 a las fases acuosas. Para obtener cristales tridimensionales perfectamente ordenados, un requisito previo al análisis estructural por rayos X a alta resolución, los GPCR se solubilizan con ayuda de detergentes y se purifican como complejos proteína-detergente. La micela de detergente cubre la superficie hidrófoba de la proteína de membrana a modo de una especie de correa (Hunte y Michel 2002; Ostermeier *et al.* 1995). Los complejos GPCR-detergente forman cristales tridimensionales en los que se realizan los

contactos entre moléculas de proteína adyacente mediante las superficies polares de la proteína que sobresalen de la micela de detergente (Day *et al.* 2007). Obviamente, la micela de detergente requiere de espacio en la red cristalina. Aunque interacciones de atracción entre las micelas podrían estabilizar el empaquetamiento cristalino (Rasmussen *et al.* 2007), estas interacciones no conducen a contactos cristalinos rígidos. Dado que muchas proteínas de membrana, incluyendo los GPCR contienen dominios hidrófilos relativamente pequeños o sumamente flexibles, una estrategia para aumentar la probabilidad de obtener cristales perfectamente ordenados es ampliar la superficie polar de la proteína y/o reducir su flexibilidad. El enfoque más fisiológico es usar una pareja de señalización nativa tal como una proteína G o arrestina. Desafortunadamente, las interacciones de los GPCR con proteínas G o arrestinas presentan una alta dependencia lipídica, y ha sido difícil formar complejos de suficiente estabilidad para cristalografía.

Por tanto, es una ventaja particular del polipéptido quimérico descrito en el presente documento que el dominio de unión se una a un epítipo conformacional en el GPCR a una concentración intramolecular eficaz muy alta, estabilizando así el receptor, reduciendo su flexibilidad conformacional y aumentando su superficie polar, facilitando la cristalización de una fusión rígida receptor-dominio de unión 1 a 1. Es una ventaja particular que el polipéptido quimérico descrito en el presente documento pueda cristalizarse en ausencia de cualquier ligando.

Se halló sorprendentemente que los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación pueden usarse como herramientas para aumentar la probabilidad de obtener cristales perfectamente ordenados minimizando la heterogeneidad conformacional en el GPCR de elección mediante fusión a un dominio de unión selectivo a nivel conformacional en una estequiometría 1:1 definida. Por tanto, según una realización, se prevé usar los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento con fines de cristalización. Ventajosamente, pueden formarse cristales de proteínas de fusión en los que el GPCR está atrapado en una conformación de receptor particular, más particularmente una conformación de receptor terapéuticamente relevante (por ejemplo, una conformación activa), tal como se asegura mediante la elección de un dominio de unión selectivo a nivel conformacional que forma parte de la proteína de fusión. El dominio de unión también reducirá la flexibilidad de regiones extracelulares tras la unión del GPCR para hacer crecer cristales perfectamente ordenados. Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, incluyendo Nanobodies, son especialmente adecuados para ello porque se unen a los epítopos conformacionales y se componen de un dominio globular rígido sencillo, carente de regiones de ligador flexibles a diferencia de los anticuerpos o fragmentos derivados convencionales tales como Fab.

Por tanto, según una realización preferida, la presente divulgación prevé polipéptidos quiméricos que comprenden un GPCR fusionado a un dominio de unión útiles como herramientas directas para cristalizar un GPCR, y eventualmente para resolver la estructura. Según una realización específica, la presente divulgación también prevé cristalizar un complejo de un polipéptido quimérico y un ligando de receptor (tal como se definió anteriormente en el presente documento). En una realización particularmente preferida del método anterior, el GPCR comprendido en el polipéptido quimérico o complejo está en una conformación de estado activo que revela nuevas características estructurales que son adecuadas para la selección como diana con moléculas pequeñas o productos biológicos y pueden permitir la identificación de compuestos que son selectivos para la conformación activa. En particular, estas nuevas características estructurales pueden aparecer en el sitio ortostérico o en un sitio alostérico, permitiendo el desarrollo de nuevos compuestos ortostéricos o alostéricos específicos para la conformación o fragmentos de los mismos, respectivamente. En otra realización, el GPCR comprendido en el polipéptido quimérico o complejo está en una conformación de estado inactivo (caracterizada por una afinidad aumentada por los agonistas inversos y/o por una afinidad disminuida por agonistas en comparación con el GPCR no restringido) o en una conformación funcional que conduce a señalización dependiente de β -arrestina (caracterizada por una afinidad aumentada por agonistas sesgados para β -arrestina en comparación con el GPCR no restringido).

Por tanto, el polipéptido quimérico descrito en el presente documento, opcionalmente en complejos con un ligando de receptor, puede cristalizarse usando cualquiera de una variedad de métodos de cristalización especializados para proteínas de membrana, muchos de los cuales se revisan en Caffrey (2003 & 2009). En términos generales, los métodos son métodos basados en lípidos que incluyen añadir lípido al complejo antes de la cristalización. Tales métodos se han usado previamente para cristalizar otras proteínas de membrana. Muchos de estos métodos, incluyendo el método de cristalización en fase cúbica lipídica y el método de cristalización de bicelas, aprovechan las propiedades de autoensamblaje espontáneo de lípidos y detergente como vesículas (método de fusión de vesículas), micelas discoideas (método de bicelas) y cristales líquidos o mesofases (en el método en mesofase o fase cúbica). Se describen métodos de cristalización en fases cúbicas lipídicas, por ejemplo, en: Landau *et al.* 1996; Gouaux 1998; Rummel *et al.* 1998; Nollert *et al.* 2004, Rasmussen *et al.* 2011a,b, publicaciones que se incorporan como referencia para la divulgación de esos métodos. Se describen métodos de cristalización en bicelas, por ejemplo, en: Faham *et al.* 2005; Faham *et al.* 2002. Según otra realización, la divulgación se refiere al uso de un polipéptido quimérico tal como se describe en el presente documento para resolver una estructura de una fusión GPCR-dominio de unión, y opcionalmente que comprende además un ligando de receptor. "Resolver la estructura" tal como se usa en el presente documento se refiere a determinar la disposición de átomos o las coordenadas atómicas de una proteína, y se realiza a menudo mediante un método biofísico, tal como cristalografía de rayos X.

En muchos casos, obtener un cristal con calidad para difracción es la barrera clave para resolver su estructura con resolución atómica. Por tanto, según realizaciones específicas, pueden usarse los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento para mejorar la calidad de difracción de los cristales de modo que puede resolverse la

estructura cristalina de la fusión GPCR-dominio de unión.

Además, se desea sumamente obtener información estructural de dianas de GPCR, por ejemplo para ayudar a guiar en el descubrimiento de fármacos de GPCR. Más allá de la cristalización de más GPCR, se usan especialmente métodos para adquirir las estructuras de receptores unidos a compuestos principales que tienen actividad farmacológica o biológica y cuya estructura química se usa como punto de partida para modificaciones químicas con el fin de mejorar la potencia, selectividad o parámetros farmacocinéticos. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que el polipéptido quimérico descrito en el presente documento es particularmente adecuado para la cocrystalización con compuestos principales que son selectivos para una conformación funcional no predominante (diferente de la conformación basal) inducida por el dominio de unión porque este dominio de unión puede aumentar sustancialmente la afinidad por compuestos selectivos para la conformación.

Según otra realización, la divulgación permite cristalizar el polipéptido quimérico en ausencia de cualquier ligando partiendo de una estequiometría 1:1 definida entre receptor y dominio de unión, mediante lo cual la alta concentración intramolecular eficaz del dominio de unión selectivo para la conformación puede estabilizar el receptor en la conformación deseada dentro de la red cristalina. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que tales cristales formados previamente de un receptor libre, estabilizados en una conformación funcional particular son un punto de partida ideal para experimentos de empapado, que tienen como objetivo resolver estructuras del receptor en complejos con fragmentos o compuestos que se unen al receptor en la conformación inducida por el dominio de unión.

Según otra realización, la presente divulgación engloba un método de determinación de la estructura cristalina de un polipéptido quimérico que comprende una fusión GPCR-dominio de unión, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un polipéptido quimérico según la divulgación, y
- b) permitir que el polipéptido quimérico cristalice

En realizaciones particulares del método anterior de determinación de la estructura cristalina, el polipéptido quimérico que comprende una fusión GPCR-dominio de unión comprende además un ligando de receptor, más específicamente un agonista, un agonista inverso, etc. unido al GPCR.

Dicha determinación de la estructura cristalina puede realizarse mediante un método biofísico tal como cristalografía de rayos X. El método puede comprender además una etapa para obtener las coordenadas atómicas del cristal (tal como se definió anteriormente en el presente documento).

Examen de ligandos y descubrimiento de fármacos

Se prevén en particular otras aplicaciones que hacen uso de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento, o ventajosamente, que hacen uso directo de las células huésped o cultivos celulares que comprenden polipéptidos quiméricos según la divulgación, o que usan preparaciones de membrana derivadas de los mismos, incluyendo examen de compuestos e inmunizaciones, que se describirá más adelante en el presente documento.

En el procedimiento de examen de compuestos, optimización de compuestos principales y descubrimiento de fármacos (incluyendo descubrimiento de anticuerpos), existe un requisito de ensayos de examen más rápidos, más eficaces, más económicos y especialmente que faciliten mucha información, que proporcionen información simultánea sobre diversas características de los compuestos y sus efectos sobre diversas rutas celulares (es decir, eficacia, especificidad, toxicidad y metabolismo de fármacos). Por tanto, existe la necesidad de examinar rápidamente y de manera económica grandes números de compuestos con el fin de identificar nuevos ligandos específicos de una proteína de interés, preferiblemente ligandos selectivos para la conformación, que pueden ser nuevos candidatos a fármaco potenciales. La presente divulgación soluciona este problema proporcionando dianas farmacológicas de GPCR que se estabilizan en una conformación con capacidad farmacológica no predominante, debido a la alta concentración intramolecular eficaz del dominio de unión selectivo para la conformación que se une covalentemente en una estequiometría 1 a 1. Esto permite identificar rápidamente y de manera fiable y diferenciar entre ligandos de diferentes perfiles funcionales, incluyendo ligandos con un perfil como agonista, un perfil como agonista inverso, un perfil como antagonista, un perfil como agonista sesgado, etc., en un único ensayo, aumentando así la velocidad y probabilidad de identificación de un ligando con las propiedades farmacológicas deseadas. En particular, se proporcionan los polipéptidos quiméricos y las células huésped que comprenden los mismos, así como cultivos de células huésped o preparaciones de membrana derivadas de los mismos, para los que se han descrito anteriormente en el presente documento preferencias específicas, son particularmente adecuados para ello. Por tanto, estos polipéptidos quiméricos, células huésped, así como cultivos de células huésped o preparaciones de membrana derivadas de los mismos, pueden usarse entonces como inmunógenos o reactivos de selección para el examen en una variedad de contextos.

Por tanto, según una realización preferida, la presente divulgación engloba el uso de los polipéptidos quiméricos, células huésped, cultivos de células huésped o preparaciones de membrana derivadas de los mismos, según la divulgación y tal como se describió anteriormente en el presente documento, en programas de examen y/o identificación de compuestos selectivos para la conformación de un GPCR, lo que podría conducir en última

instancia a nuevos candidatos a fármaco potenciales. Según una realización, la divulgación prevé un método de identificación de compuestos selectivos para la conformación, comprendiendo el método las etapas de

(i) proporcionar un polipéptido quimérico según la divulgación, y

(ii) proporcionar un compuesto de prueba, y

5 (iii) evaluar la unión selectiva del compuesto de prueba al GPCR comprendido en el polipéptido quimérico, y

(iv) seleccionar un compuesto selectivo a nivel conformacional.

Las preferencias específicas para los polipéptidos quiméricos, células huésped, cultivos de células huésped y preparaciones de membrana de los mismos son tal como se definieron anteriormente con respecto a aspectos anteriores de la divulgación. En una realización particular del método anterior, el compuesto selectivo para la conformación es un compuesto selectivo para una conformación activa de GPCR comprendido en el polipéptido quimérico. En otra realización particular del método anterior, el compuesto selectivo para la conformación es un compuesto selectivo para una conformación inactiva de GPCR comprendido en el polipéptido quimérico. En todavía otra realización del método anterior, el compuesto selectivo para la conformación es un compuesto selectivo para una conformación funcional que conduce a señalización dependiente de β -arrestina o cualquier otra conformación funcional de interés. En una realización preferida, los polipéptidos quiméricos tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen descritos más adelante en el presente documento, se proporcionan como células completas, o extractos celulares (orgánulos) tales como extractos de membrana o fracciones de los mismos, o pueden incorporarse en capas o vesículas lipídicas (que comprenden lípidos naturales y/o sintéticos), lipopartículas de alta densidad, o cualquier nanopartícula, tal como nanodiscos, o se proporcionan como virus o partículas pseudovirales (VLP), de modo que se conserva una funcionalidad suficiente de las proteínas respectivas. Se revisan en detalle los métodos para preparaciones de polipéptidos quiméricos que contienen GPCR a partir de fragmentos de membrana o extractos de membrana-detergente en Cooper (2004). Alternativamente, los polipéptidos quiméricos también pueden solubilizarse en detergentes. Los ensayos de examen para el descubrimiento de fármacos pueden ser ensayos en fase sólida (por ejemplo, perlas, columnas, portaobjetos, chips o placas) o en fase de disolución, por ejemplo un ensayo de unión, tal como ensayos de unión a radioligandos. En ensayos de alto rendimiento, es posible examinar hasta varios miles de compuestos diferentes en un único día en formatos de 96, 384 ó 1536 pocillos. Por ejemplo, puede usarse cada pocillo de una placa de microtitulación para ejecutar un ensayo independiente frente a un modulador potencial seleccionado, o, si han de observarse efectos del tiempo de incubación o la concentración, cada 5-10 pocillos pueden someter a prueba un único modulador. Por tanto, una única placa de microtitulación convencional puede someter a ensayo aproximadamente 96 moduladores. Es posible someter a ensayo muchas placas al día; son posibles hoy en día exámenes de ensayo de hasta aproximadamente 6.000, 20.000, 50.000 o más compuestos diferentes.

Diversos métodos pueden usarse para determinar la unión entre el GPCR estabilizado y un compuesto de prueba, incluyendo por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión a radioligandos, ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos basados en chips, inmunocitofluorescencia, tecnología de doble híbrido en levadura y presentación 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 métodos de detección de la unión entre un compuesto de prueba y una proteína de membrana incluyen métodos de ultrafiltración con espectroscopía de masas con pulverización iónica/HPLC u otros métodos (bio)físicos y analíticos. También pueden usarse métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, que conocen bien los expertos en la técnica. Se apreciará que puede detectarse un compuesto de prueba unido usando una etiqueta o un marcador individual asociado con el compuesto, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o un marcador de radioisótopo, tal como se describe más adelante en el presente documento.

En una realización, se determina si el compuesto altera la unión de GPCR comprendido en el polipéptido quimérico a un ligando de receptor (tal como se define en el presente documento). La unión de un GPCR a su ligando puede someterse a ensayo usando métodos de unión a ligandos convencionales conocidos en la técnica tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un ligando puede radiomarcarse o marcarse de manera fluorescente. El ensayo puede llevarse a cabo con células completas o con membranas obtenidas de las células o receptor solubilizado acuoso con un detergente. El compuesto se caracterizará por su capacidad para 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 aumentar 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.

Según una realización particularmente preferida, el método descrito anteriormente de identificación de compuestos selectivos para la conformación se realiza mediante un ensayo de unión a ligandos o ensayo de competencia, incluso más preferiblemente un ensayo de unión a radioligandos o de competencia. Lo más preferiblemente, el método descrito anteriormente de identificación de compuestos selectivos para la conformación se realiza en un ensayo comparativo, más específicamente, un ensayo de competencia de ligandos comparativo, incluso más

específicamente un ensayo de competencia de radioligandos comparativo, que se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos.

5 En caso de que el método descrito anteriormente se realice en un ensayo comparativo, se entenderá que el método comprenderá la etapa de comparar la unión de un compuesto de prueba para un GPCR comprendido en un polipéptido quimérico en el que el GPCR se estabiliza mediante un resto de dominio de unión selectivo para la conformación en una conformación funcional de interés (por ejemplo, una conformación activa o una conformación inactiva) con la unión del compuesto de prueba a un control. Dentro del alcance de la divulgación, el control puede ser el GPCR no fusionado correspondiente o un polipéptido quimérico del GPCR correspondiente fusionado a un resto de dominio de unión simulado (también denominado resto de unión de control o resto de unión irrelevante) que es un resto de dominio de unión que no se dirige a y/o no se une específicamente al GPCR correspondiente.

10 En una realización preferida particular, la etapa de evaluar la unión selectiva del compuesto de prueba al GPCR comprendido en el polipéptido quimérico en cualquiera de los métodos descritos anteriormente se realiza midiendo y/o calculando la afinidad (tal como se define en el presente documento) del compuesto de prueba por el polipéptido quimérico, tal como se ilustra también adicionalmente en la sección de ejemplos.

15 A menudo, se preferirá el examen de alto rendimiento de dianas de GPCR para compuestos selectivos para la conformación. Esto se facilitará mediante la inmovilización de un polipéptido quimérico según la divulgación sobre una superficie o soporte sólido adecuado que puede disponerse en serie o si no multiplexarse. Los ejemplos no limitativos de soportes sólidos adecuados incluyen perlas, columnas, portaobjetos, chips o placas.

20 Más particularmente, los soportes sólidos pueden estar en forma particulada (por ejemplo, perlas o gránulos, usados generalmente en columnas de extracción) o de lámina (por ejemplo, membranas o filtros, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de ensayo de microtitulación, tira reactiva, dispositivos de llenado capilar o similares) que pueden ser fibras o tubos planos, plegados o huecos. Las siguientes matrices se facilitan como ejemplos y no son exhaustivas, tales ejemplos podrían incluir sílice (sílice amorfa porosa), es decir la serie FLASH de cartuchos que contienen sílice irregular 60A (de 32-63 μm o 35-70 μm) suministrados por Biotage (una división de Dyax Corp.), soportes de agarosa o poli(acrilamida), por ejemplo la gama de productos Sepharose suministrada por Amersham Pharmacia Biotech, o los soportes Affi-Gel suministrados por Bio-Rad. Además existen polímeros macroporosos, tales como los soportes Affi-Prep estables a la presión suministrados por Bio-Rad. Otros soportes que podrían utilizarse incluyen: dextrano, colágeno, poliestireneo, metacrilato, alginato de calcio, vidrio de poro controlado, aluminio, titanio y cerámicas porosas. Alternativamente, la superficie sólida puede comprender parte de un sensor dependiente de la masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón superficial. Se comentan ejemplos adicionales de soportes disponibles comercialmente, por ejemplo, en, Protein Immobilisation, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1991). La inmovilización puede ser o bien no covalente o bien covalente. En particular, la inmovilización o adsorción no covalente sobre una superficie sólida del polipéptido quimérico según la divulgación puede producirse mediante un recubrimiento de superficie con cualquiera de un anticuerpo, o estreptavidina o avidina, o un ion de metal, que reconoce una etiqueta molecular unida al polipéptido quimérico, según técnicas convencionales que conoce el experto (por ejemplo, etiqueta de estrep., etiqueta de histidina, etc.). En particular, el polipéptido quimérico puede unirse a una superficie sólida mediante reticulación covalente usando químicas de acoplamiento convencionales. Una superficie sólida puede comprender de manera natural residuos reticulables adecuados para la unión covalente o puede recubrirse o derivatizarse para introducir grupos reticulables adecuados según métodos bien conocidos en la técnica. En una realización particular, se conserva una funcionalidad suficiente de la proteína inmovilizada tras el acoplamiento covalente directo a la matriz deseada mediante un resto reactivo que no contiene un brazo espaciador químico. Se comentan ejemplos adicionales e información más detallada sobre métodos de inmovilización de anticuerpos (fragmentos) sobre soportes sólidos en Jung *et al.* (2008); de manera similar, se revisan métodos de inmovilización de receptores de membrana en Cooper (2004). Los avances en la biología molecular, particularmente a través de mutagénesis dirigida al sitio, permiten la mutación de residuos de aminoácido específicos en una secuencia de proteína. 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 modificar por ingeniería una proteína específica para alterar la distribución de aminoácidos disponibles en la superficie implicados en el acoplamiento químico (Kallwass *et al.*, 1993), controlando en efecto la orientación de la proteína acoplada. Puede aplicarse un enfoque similar a los polipéptidos quiméricos según la divulgación, proporcionando así un medio de inmovilización orientada sin la adición de otras colas de péptido o dominios que contienen aminoácidos o bien naturales o bien no naturales. Se entenderá que puede introducirse una mutación en el resto de GPCR y/o el resto de dominio de unión del polipéptido quimérico y es necesario que se elija cuidadosamente de modo que no interfiera en las conformaciones estructurales y/o actividad biológica. Por ejemplo, en caso de que vaya a introducirse una mutación en el resto de dominio de unión que es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un Nanobody, se prefiere la introducción de mutaciones en la región de marco, minimizando la perturbación de la actividad de unión a antígeno del anticuerpo (fragmento). Convenientemente, las proteínas inmovilizadas pueden usarse en procesos de inmuno-adsorción tales como inmunoensayos, por ejemplo ELISA, o procesos de purificación por afinidad poniendo en contacto las proteínas inmovilizadas según la divulgación con una muestra de prueba según métodos habituales convencionales en la técnica. Alternativamente, y en particular con fines de alto rendimiento, las proteínas inmovilizadas pueden disponerse en serie o si no multiplexarse. Preferiblemente, las proteínas inmovilizadas según la divulgación se usan para el examen y la selección de compuestos que se unen

selectivamente a una conformación particular de un GPCR.

Se apreciará que puede inmovilizarse o bien el resto de dominio de unión o bien el resto de GPCR que forman parte de la fusión, dependiendo del tipo de aplicación o el tipo de examen que sea necesario realizar. Además, la elección del dominio de unión de estabilización de GPCR (que selecciona como diana un epítipo conformacional particular de GPCR), determinará la orientación de GPCR y, por consiguiente, el desenlace deseado de la identificación de compuestos, por ejemplo compuestos que se unen específicamente a partes extracelulares, partes intramembranarias o partes intracelulares de dicho GPCR estabilizado a nivel conformacional.

En una realización alternativa, el compuesto de prueba (o una biblioteca de compuestos de prueba) puede inmovilizarse sobre una superficie sólida, tal como una superficie de chip, mientras que el polipéptido quimérico se proporciona, por ejemplo, en una disolución de detergente o en una preparación de tipo membrana.

Por consiguiente, en una realización específica, se proporciona un soporte sólido en el que va a inmovilizarse un polipéptido quimérico según la divulgación para su uso en cualquiera de los métodos de examen anteriores.

Lo más preferiblemente, no se inmoviliza ni el polipéptido quimérico, ni el compuesto de prueba, por ejemplo en protocolos de selección de presentación en fago en disolución, o ensayos de unión a radioligandos.

Los compuestos que van a someterse a prueba pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una macromolécula, tal como una proteína, un azúcar, ácido nucleico o lípido. Normalmente, los compuestos de prueba serán compuestos químicos pequeños, péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos. Se apreciará que en algunos casos, el compuesto de prueba puede ser una biblioteca de compuestos de prueba. En particular, los ensayos de examen de alto rendimiento para compuestos terapéuticos tales como agonistas, antagonistas o agonistas inversos y/o moduladores forman parte de la divulgación. Con fines de alto rendimiento, pueden usarse bibliotecas de compuestos o bibliotecas combinatorias tales como bibliotecas de compuestos alostéricos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de anticuerpos, bibliotecas basadas en fragmentos, bibliotecas de compuestos sintéticos, bibliotecas de compuestos naturales, bibliotecas de presentación en fago y similares. Los expertos en la técnica conocen metodologías para preparar y examinar tales bibliotecas.

El compuesto de prueba opcionalmente puede unirse de manera covalente o no covalente a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados y las técnicas para su unión, uso y detección estarán claros para el experto, e incluyen, pero no se limitan a, cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads), colorantes fluorescentes (por ejemplo, todos los colorantes Alexa Fluor, isotiocianato de fluoresceína, Texas red, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, de polietileno, polipropileno, látex, etc.). Los expertos en la técnica conocen bien medios de detección de tales marcadores. Por tanto, por ejemplo, pueden detectarse los radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de centelleo, pueden detectarse los marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando a la enzima 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 dentro del contexto del primer aspecto de la divulgación con relación al polipéptido quimérico descrito en el presente documento.

Por tanto, según realizaciones específicas, el compuesto de prueba tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen anteriores 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 de los mismos, tal como Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos con puentes disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio o bien VL o bien VH, un anticuerpo de cadena pesada (A_{hc}), un anticuerpo de un solo dominio (A_{csd}), un Minibody, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o Nanobody), el dominio variable de los nuevos receptores de antígeno derivados de anticuerpos de tiburón (VNAR), un armazón proteico incluyendo un Alphabody, proteína A, proteína G, dominios con repeticiones de anquirina diseñadas (DARPin), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knotinas, dominios CH2 modificados por ingeniería (nanoanticuerpos), tal como se definió anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida, los métodos de examen de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria de productos químicos o péptidos que contiene un gran número de posibles ligandos terapéuticos. Tales "bibliotecas combinatorias" o "bibliotecas de compuestos" se examinan entonces en uno o más ensayos, tal como se describe en el presente documento, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (subclases o especies químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Una "biblioteca de compuestos" es una colección de productos químicos almacenados, usados habitualmente en última instancia en el examen de alto rendimiento. Una "biblioteca combinatoria" es una colección de diversos compuestos químicos generados o bien mediante síntesis química o bien mediante síntesis biológica, combinando varios "elementos estructurales" químicos.

La preparación y el examen de bibliotecas combinatorias los conocen bien los expertos en la técnica. Los compuestos así identificados pueden servir como “compuestos principales” convencionales o pueden usarse por sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales. Por tanto, en una realización adicional, los métodos de examen tal como se describieron anteriormente en el presente documento comprenden además modificar un compuesto de prueba que se ha mostrado que se une selectivamente a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido quimérico que comprende un GPCR en una conformación particular, y determinar si el compuesto de prueba modificado se une al GPCR cuando reside en la conformación particular.

Por tanto, según realizaciones más específicas, pueden usarse un complejo que comprende un polipéptido quimérico descrito en el presente documento y un ligando de receptor, en cualquiera de los métodos de examen anteriores. Preferiblemente, el ligando de receptor se elige del grupo que comprende una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado de los mismos, un producto natural, y similares. Más preferiblemente, el ligando de receptor es un agonista total, o un agonista parcial, un agonista sesgado, un antagonista o un agonista inverso, tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Puede desearse identificar y caracterizar ligandos naturales o endógenos de los GPCR diana. En particular, existe la necesidad de que los GPCR “dejen de ser huérfanos” para los que no se ha identificado un ligando de activación natural. Tales ligandos pueden recuperarse de muestras biológicas tales como extracto de tejido o sangre o de bibliotecas de ligandos. Por tanto, según una realización particular, el compuesto de prueba tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen anteriores se proporciona como muestra biológica. En particular, la muestra puede ser cualquier muestra adecuada extraída de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de líquido corporal tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo.

Aunque los métodos de examen tal como se describieron anteriormente son suficientes para determinar el perfil funcional de compuestos, el efecto funcional de un compuesto sobre la señalización posterior del GPCR diana puede evaluarse adicionalmente en ensayos secundarios. Por tanto, puede someterse a prueba la eficacia de los compuestos y/o composiciones que comprenden los mismos, usando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal adecuados conocidos *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico implicado.

Se apreciará que los polipéptidos quiméricos, las células huésped y derivados de las mismas, según la presente divulgación, pueden modificarse por ingeniería adicionalmente y, por tanto, son herramientas particularmente útiles para el desarrollo o la mejora de ensayos basados en células. Los ensayos basados en células son críticos para evaluar el mecanismo de acción de nuevas dianas biológicas y la actividad biológica de compuestos químicos. Por ejemplo, sin el propósito de ser limitativo, los ensayos basados en células actuales para los GPCR incluyen medidas de la activación de rutas (liberación de Ca^{2+} , generación de AMPc o actividad transcripcional); mediciones de tráfico de proteínas marcando con etiqueta los GPCR y elementos posteriores con GFP; y medidas directas de interacciones entre proteínas usando enfoques de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o doble híbrido en levadura.

Además, puede ser particularmente ventajoso inmunizar un animal con un polipéptido quimérico descrito en el presente documento, o una célula huésped o derivado de la misma que comprende el mismo, con el fin de producir anticuerpos, preferiblemente anticuerpos selectivos a nivel conformacional contra el GPCR diana. Por tanto, tales métodos de inmunización también se prevén en este caso. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos *in vivo*, y también se describieron anteriormente en el presente documento. Pueden inmunizarse cualquier animal adecuado, por ejemplo, un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca, cerdo, o un ave tal como una gallina o un pavo, o un pez, tal como un tiburón, usando cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica adecuadas para generar una respuesta inmunitaria. Tras la inmunización, pueden producirse bibliotecas de expresión que codifican para genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas u otros sistemas de presentación, según técnicas bien conocidas en la técnica. Además de eso, las bibliotecas de anticuerpos que se generan comprenden una colección de compuestos de prueba adecuados para su uso en cualquiera de los métodos de examen tal como se describieron anteriormente en el presente documento. Los anticuerpos que se han producido tal como se describió anteriormente en el presente documento también pueden ser herramientas de diagnóstico útiles para detectar específicamente los GPCR en un estado conformacional particular, y por tanto también forman parte de la presente divulgación.

En una realización, los polipéptidos quiméricos inmovilizados (tal como se describió anteriormente en el presente documento) pueden usarse para la selección de los dominios de unión incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o péptidos que se unen al receptor estabilizado a nivel conformacional. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que tales los dominios de unión, como ejemplo no limitativo, pueden seleccionarse mediante el examen de un conjunto, una colección o biblioteca de células que expresan los dominios de unión sobre su superficie, o bacteriófagos que presentan una fusión de genIII y Nanobody en su superficie, o células de levadura que presentan una fusión de la proteína de factor de apareamiento Aga2p, o mediante presentación al ribosoma entre otros.

Una realización particular se refiere al uso de tales polipéptidos quiméricos inmovilizados para el aislamiento de los

dominios de unión que son selectivos para la conformación del receptor que se induce por la alta concentración intramolecular eficaz del dominio de unión selectivo para la conformación que se une covalentemente al receptor en una estequiometría 1 a 1.

5 Todavía otro aspecto de la divulgación se refiere a un kit que comprende un polipéptido quimérico descrito en el presente documento, o una célula huésped o un cultivo de células huésped o una preparación de membrana según la divulgación. El kit puede comprender además una combinación de reactivos tales como tampones, etiquetas moleculares, constructos de vector, material de muestra de referencia, así como soportes sólidos adecuados, y similares. Un kit de este tipo puede ser útil para cualquiera de las aplicaciones de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender (una biblioteca de) compuestos de prueba útiles para aplicaciones de examen de compuestos.

10 Los siguientes ejemplos pretenden fomentar un conocimiento adicional de la presente divulgación. Aunque se describe la presente divulgación en el presente documento con referencia a realizaciones ilustradas, debe entenderse que la divulgación no se limita a las mismas. Los expertos habituales en la técnica y con acceso a las enseñanzas del presente documento reconocerán modificaciones y realizaciones adicionales dentro del alcance de la misma. Por tanto, la presente divulgación sólo está limitada por las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de constructos de proteína de fusión β 2AR-Nanobody

20 Las fusiones GPCR-Nanobody descritas en este ejemplo son polipéptidos quiméricos que contienen dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el GPCR β 2AR, el ligador GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 51) y un Nanobody, todos los cuales se fusionaron en este orden desde el extremo amino-terminal hasta el carboxilo-terminal. Se fusionaron los genes que codifican para estas proteínas tal como se describe a continuación (figura 2) y se clonaron en el vector pFastBac1 (Invitrogen, n.º de cat. 10359-016).

25 Se amplificó la parte de GPCR a partir de ADN que codificaba para el péptido señal (SP) de proteína hemaglutinina (HA) escindible derivado del virus influenza (MKTIIALSYIFCLVFA; SEQ ID NO: 52) seguido por el epítipo Flag (DYKDDDDA; SEQ ID NO: 53) seguido por un sitio de escisión de TEV (ENLYFQGF; SEQ ID NO: 54) seguido por la secuencia codificante de receptor β 2-adrenérgico humano que engloba de Gly2 a Gly365 (SEQ ID NO: 55). También se introdujo una mutación puntual de N187E en el constructo para alterar este sitio de glicosilación no deseado (β 2AR365N; Rasmussen *et al.*, 2011b). La modificación por ingeniería de receptor β 2-adrenérgico para dar β 2AR365N se realizó para aumentar los niveles de expresión celular del receptor en células Sf9.

30 Se amplificaron segmentos génicos de Nanobody a partir de fagémidos que codificaban para los Nanobodies respectivos. Nb80 (SEQ ID NO: 13) es un Nanobody específico de β 2AR que estabiliza el estado activo del β 2AR unido a los agonistas totales tales como BI-167107 (Rasmussen *et al.* 2011b). Nb71 (SEQ ID NO: 14) es otro Xaperone específico de β 2AR que estabiliza un estado activo (documento WO2012007593). Nb69 (SEQ ID NO: 15) es específico para el receptor muscarínico 3 y no tiene afinidad por β 2AR detectable.

35 Se fusionaron genéticamente el GPCR y el Nanobody en marco mediante una PCR de extensión por solapamiento. Por tanto, se usaron 20 ng de plásmido que contenía el ADNc de GPCR como molde en una reacción de PCR de 50 μ l (polimerasa Pfu, Fermentas, n.º de cat. EP0501) que contenía el 4% de DMSO para amplificar el ADN que codifica para β 2AR usando el cebador EP211 (5'-GCGGAATTCGAGCTCGCC-3'; SEQ ID NO: 56) y el cebador EP207 (5'-CCTCCGCCGATCCGCCACCTCCTCCACTCTGCTCCCCTGTG-3'; SEQ ID NO: 57). El cebador EP211 aloja un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5' de la secuencia codificante. El cebador EP207 incorpora parte del ligador GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 51) en el extremo C-terminal del receptor. Las condiciones de amplificación para esta reacción fueron de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 1 min y 30 s a 72°C seguido por 10 min a 72°C para amplificar la parte que codifica para GPCR del marco de lectura abierto de la fusión.

40 Nb69, Nb71 y Nb80 tienen todas las secuencias N-terminales y C-terminales idénticas. Se amplificaron los ADN de Nanobody con una polimerasa Pfu en una PCR en 50 μ l usando 5 ng de cada constructo con el cebador EP206 (GGCGGATCCGGCGGAGGTTTCGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGG; SEQ ID NO: 58) para incorporar una parte solapante del ligador GGGGSGGGGS en el extremo N-terminal del Nanobody y EP202 (TGGAATTCTAGATTAGTGATGGTGTGGTGTGAGGAGACGGTGACCTGGGT; SEQ ID NO: 59) para añadir la secuencia de una etiqueta His6 en el extremo C-terminal de la proteína de fusión que incorporaba un sitio de clonación de XbaI en el extremo 3' del gen. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación de 2 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 1 min a 72°C seguido por 10 min a 72°C para amplificar la parte que codifica para Nanobody de los híbridos.

45 Se purificaron fragmentos de PCR que codificaban para el GPCR o un Nanobody usando el kit de purificación de PCR (Promega) y se usaron como moldes en una nueva reacción de PCR de 50 μ l: se mezclaron 20 ng del fragmento de PCR amplificado EP211- β 2AR-EP207 (EP211 y EP207 se refieren a los cebadores que se han usado para la amplificación mediante PCR) con aproximadamente 20 ng de fragmento EP206-Nanobody-EP202

amplificado y se fusionaron con polimerasa KapaTaq (Sopaghem, n.º de cat. BK1002) mediante extensión por solapamiento de la siguiente manera. Tras fundir durante 2 min a 95°C y 5 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min y 45 s, se amplificaron los marcos de lectura abiertos de β 2AR-Nanobody fusionado usando cebadores EP202 y EP211 en 28 ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min y 45 s a 72°C) seguido por 10 min a 72°C. Se purificaron por separado fragmentos de PCR que contenían los diferentes marcos de lectura abiertos de β 2AR-Nanobody, se clonaron como fragmento *EcoRI-XbaI* en pFastBac1 y se transformaron en *E. coli* Top10. Se preparó ADN de plásmido a partir de colonias individuales y se confirmó la secuencia de los marcos de lectura abiertos mediante secuenciación. Los constructos se denominaron pFastBac β 2AR365N-Nb80 (referencia de laboratorio CA6836), pFastBac β 2AR365N-Nb69 (referencia de laboratorio CA6833) y pFastBac β 2AR365N-Nb71 (referencia de laboratorio CA6835). Las secuencias de aminoácidos codificadas por los diferentes constructos de fusión β 2AR365N-Nb se facilitan en la figura 2 (SEQ ID NO: 1-4).

Ejemplo 2: Expresión de fusiones β 2AR-Nanobody en células Sf9 infectadas por baculovirus

Para producir b́acmidos que codifican para fusiones β 2AR-Nanobody, se transformó un ng de cada fusión pFastBac β 2AR365N-Nanobody en las células DH10Bac™ usando el sistema de expresión en baculovirus Bac-to-Bac® según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, n.º de cat. 10359-016) y se sembraron en placa durante la noche en una placa de agar LB reciente con canamicina 50 μ g/ml, gentamicina 7 μ g/ml, tetraciclina 10 μ g/ml, X-gal 100 μ g/ml e IPTG 40 μ g/ml. Se escogieron las colonias blancas, se purificaron los b́acmidos y se confirmaron las secuencias de los marcos de lectura abiertos de β 2AR-Nanobody. También se transformó un plásmido que codificaba para el marco de lectura abierto de β 2AR, desprovisto del ligador y un Nanobody (pFastBac β 2AR365N) en las células DH10Bac™ para producir un b́acmido que codificaba para receptor no fusionado como control. Se produjo baculovirus recombinante mediante transfección de los b́acmidos β 2AR-Nanobody y el b́acmido β 2AR365N en células Sf9.

Para cada b́acmido se preparó una mezcla de transfección mezclando 1 ml de medio de cultivo de células de insecto sin complementar de Grace (Sigma, n.º de cat. G8142), 15 μ l de Cellfectin II (Invitrogen, n.º de cat. 10362-100) y 5 μ L de ADN de b́acmido (aproximadamente 3 μ g). Se incubó previamente esta mezcla de transfección durante 20 minutos a TA. A continuación, se resuspendieron 1×10^7 células Sf9 sedimentadas en la mezcla de transfección y se agitaron a 27°C. Tras 4 horas se añadieron 4 ml de medio de Sf9 ESF 921 libre de proteína (Expression systems LLC, n.º de cat. 96-001) y se hicieron crecer las células durante 48 h a 27°C y 130 rpm. Se añadieron 5 ml adicionales de medio de Sf9 ESF 921 y se incubaron las células durante otras de 24 h a 40 h antes de recoger la reserva de baculovirus recombinante P1 (P1) mediante centrifugación. Se preparó una reserva de baculovirus recombinante P2 diluyendo P1 100 veces en un cultivo de Sf9 reciente a una densidad de 3×10^6 células/ml y cultivando a 27°C y 130 rpm. Se recogieron reservas de virus P2 mediante centrifugación 72 h tras la infección. Se logró la expresión recombinante de las diferentes fusiones β 2AR365N-Nb a través de la infección de células Sf9 que se hicieron crecer de manera reciente a una densidad de 4 millones/ml (de 1:100 a 1:250) con las P2 reservas de baculovirus. Se cultivaron las células infectadas durante de 48 h a 55 h a 27°C (130 rpm) antes de la recogida. Se confirmó la expresión de híbridos GPCR-Nanobody mediante microscopía de fluorescencia con células vivas (ejemplo 3). Se lavaron las células que expresaban la proteína recombinante dos veces con PBS helada (Life technologies, n.º de cat. 10010-023) complementada con EDTA 1,5 mM, se sedimentaron y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 3: Confirmación de la expresión de proteínas de fusión β 2AR-Nanobody mediante microscopía de fluorescencia

Para monitorizar la expresión de las diferentes fusiones β 2AR365N-Nb, se analizaron células Sf9 no infectadas y células Sf9 infectadas con una reserva de baculovirus recombinante P1 (recogidas tras 72 h de infección) para determinar la expresión de receptor usando microscopía de fluorescencia. Con este fin, se diluyeron 15 μ l de cada cultivo celular en microportaobjetos de 8 pocillos (Ibidi, n.º de cat. 80821) en 200 μ l de PBS que contenían 1 μ g de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Flag (M2) (Sigma, n.º de cat. F3165) y 1 μ g de un anticuerpo de rata anti-IgG de ratón conjugado con FITC (ebioscience, n.º de cat. 11-4011) y se incubaron durante 15 min en la oscuridad. Una vez que se unieron las células a la superficie, se eliminó cuidadosamente el exceso de disolución de tinción. Se tomaron imágenes de células infectadas y células no infectadas con el microscopio invertido Eclipse TE2000 (Nikon). Se tomaron imágenes usando microscopía de transmisión y usando microscopía de transmisión de epifluorescencia usando el filtro de FITC. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron usando los mismos ajustes de exposición.

Comparando las imágenes de fluorescencia de células Sf9 no infectadas con células que expresan β 2AR365N-Nb80, β 2AR365N-Nb71, β 2AR365N-Nb69 o β 2AR365N no fusionado se demuestra que los polipéptidos quiméricos se expresan principalmente sobre la superficie celular de las células de insecto, de manera similar al receptor no fusionado (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Preparación de membranas a partir de células de insecto que expresan las fusiones β 2AR-Nanobody.

Se resuspendieron sedimentos celulares obtenidos mediante centrifugación de cultivos de 50 ml recientes de células Sf9 que expresan fusiones β 2AR-Nb recombinantes en 8 ml de tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasa

(Tris/HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, PMSF 0,2 mM). Se sometieron las células a lisis mediante trituración exhaustiva de los sedimentos resuspendidos usando un pequeño triturador de vidrio y una mano de almirez de teflón. Se recuperaron las membranas mediante centrifugación a 26000g. Se resuspendieron los sedimentos de membrana en 1,5 ml de tampón de almacenamiento (Tris/HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, sacarosa al 10%) y se almacenaron en alícuotas a 80°C. Se midieron las concentraciones de proteínas totales con el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific Pierce, n.º de cat. 23225) según las instrucciones del fabricante. Se confirmó adicionalmente la expresión de híbridos GPCR-Nanobody en células Sf9 infectadas por baculovirus mediante análisis del contenido en proteína de estas membranas de Sf9 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (ejemplo 5). Se analizaron las propiedades farmacológicas de estos híbridos GPCR-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos (ejemplo 6).

Ejemplo 5: Expresión de proteínas de fusión β2AR-Nanobody confirmada mediante inmunotransferencia de tipo Western

Se cargaron preparaciones de membrana (25 µg de proteína total) de las diferentes células Sf9 infectadas por baculovirus en un gel de SDS-PAGE al 12,5%. Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una lámina de nitrocelulosa y se bloqueó la membrana con leche desnatada al 4%. Se detectó la expresión de la proteínas recombinantes usando el anticuerpo anti-flag M2 (Sigma, n.º de cat. F3165) como anticuerpo primario y un conjugado de fosfatasa alcalina anti-ratón (Sigma, n.º de cat. A3562) en combinación con NBT y BCIP para desarrollar la inmunotransferencia (figura 3). La detección de bandas con el peso molecular apropiado (aproximadamente 57 y 43 kDa para el β2AR fusionado a Nanobody y no fusionado, respectivamente) confirma la expresión de la proteína de fusión para todos los constructos generados.

Ejemplo 6: Análisis de las propiedades farmacológicas de las fusiones β2AR-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Para analizar las propiedades farmacológicas de las diferentes fusiones β2AR365N-Nanobody se realizaron experimentos de competencia de radioligandos comparativos usando el agonista natural epinefrina (Sigma n.º de cat. E4250), clorhidrato de (-)-isoproterenol (agonista total, Sigma n.º de cat. 16504), salbutamol (agonista parcial, Sigma n.º de cat. S8260), clorhidrato de ICI-118,551 (agonista inverso, Sigma n.º de cat. 1127) o clorhidrato de alprenolol (antagonista neutro, Sigma n.º de cat. A8676) y carvedilol (antagonista, Sigma n.º de cat. C3993) como agente competidor y el antagonista neutro [³H]-dihidroalprenolol como radioligando. El efecto farmacológico de los diferentes ligandos es según Kahsai *et al.* (2011).

Se realizaron experimentos de unión de competencia de radioligandos en membranas de células de insecto Sf9 que expresaban β2AR365N (Nanobody no fusionado), β2AR365N-Nb80, β2AR365N-Nb71 o β2AR365N-Nb69. Se mezclaron membranas de células sf9 que expresaban las diferentes proteínas recombinantes (ejemplos 2 y 4, 5 µg de proteína total) con (-)-isoproterenol, epinefrina, salbutamol, ICI118,551 o alprenolol a concentraciones que oscilaban entre 10⁻¹¹ M y 10⁻⁴ M en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). A continuación, se añadió el radioligando [³H]-dihidroalprenolol (concentración final de 2 nM) a cada dilución y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 µl). Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre mediante filtración sobre unifiltros Whatman GF/C (Perkin Elmer, n.º de cat. 6005174) usando un colector FilterMate de 96 pocillos (Perkin Elmer). Tras la filtración, se lavaron las membranas retenidas sobre las placas de filtro con tampón de lavado helado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) y se secaron los filtros durante 1 hora a 50°C. Tras añadir 40 µl de líquido de centelleo (MicroScint™-O, Perkin Elmer, n.º de cat. 6013611), se midió la radiactividad (cpm) retenida sobre los filtros en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux. Los datos representan la media ± EEM (error estándar de la media) de cada experimento realizado por triplicado. Los valores de CI50 se determinaron mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

En una primera serie de experimentos, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión β2AR365N-Nb80 con las propiedades de la quimera β2AR365N-Nb69 (figura 4). Nb80 es un Xaperone que se une selectivamente a β2AR unido a agonista y muestra comportamiento de tipo proteína G, estabilizando por tanto la conformación de estado activo del receptor en el complejo agonista•β2AR•Nb 80 (Rasmussen *et al.* 2011b). Nb69 es un Nanobody simulado que se une específicamente al receptor muscarínico M3 de rata sin afinidad por β2AR detectable. Se encontró que las propiedades farmacológicas de la quimera β2AR365N-Nb80 son profundamente diferentes de las propiedades del receptor fusionado a Nb69 de control. En comparación con la quimera de Nb69, el β2AR fusionado al Nanobody con comportamiento de tipo proteína G (Nb80) muestra afinidades aumentadas por agonistas (epinefrina, isoproterenol, salbutamol) y afinidades reducidas por los agonistas inversos (ICI-118,551), lo cual se muestra a modo de ejemplo mediante las CI50 moduladas de los ligandos sometidos a prueba sobre el Nb80 y la fusión simulada (tabla 3). Esto demuestra que la quimera β2AR365N-Nb80, pero no la quimera simulada β2AR365N-Nb69 de control, adopta una conformación de estado activo caracterizada por afinidades aumentadas por agonistas y afinidades reducidas por los agonistas inversos.

La afinidad aumentada de la quimera β2AR365N-Nb80, en comparación con β2AR365N-Nb69 de control, por el agonista natural epinefrina puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión

- competitiva representados en la figura 4A dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb80$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 2080$. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb80$ por el agonista sintético isoprotenerol puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb80$ (figura 4B), dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 670$. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb80$ por el agonista sintético parcial salbutamol puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 4D dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb80$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 370$.
- De manera similar, la afinidad reducida de la quimera $\beta 2AR365N-Nb80$, en comparación con $\beta 2AR365N-Nb69$ de control por el agonista inverso ICI-118,551 puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 4E dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb80$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 0,023$.
- Particularmente, la fusión $\beta 2AR-Nb80$ tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista neutro alprenolol en comparación con la quimera $\beta 2AR365N-Nb69$ de control. De hecho, las CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb80$ y $\beta 2AR365N-Nb69$ por alprenolol (figura 4C) son muy similares, de manera que concuerda con el hecho de que los antagonistas neutros son ligandos no selectivos que se unen a diferentes conformaciones funcionales.
- De manera notable, la fusión $\beta 2AR-Nb80$ tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista carvedilol en comparación con la quimera $\beta 2AR365N-Nb69$ de control. De hecho, las CI_{50} de carvedilol detectadas con $\beta 2AR365N-Nb80$ y $\beta 2AR365N-Nb69$ (figura 4F) son muy similares (diferencia inferior a un factor 2).
- En una segunda serie de experimentos, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión $\beta 2AR365N-Nb80$ con las propiedades del receptor $\beta 2AR365N$ no fusionado (figura 5). $\beta 2AR$ fusionado a el Nanobody con comportamiento de tipo proteína G (Nb80) muestra afinidades 3 órdenes de magnitud superiores por el agonista natural epinefrina, lo que indica que la quimera $\beta 2AR365N-Nb80$, pero no el receptor de control no fusionado, adopta una conformación de estado activo caracterizada por afinidades aumentadas por agonistas. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb80$, en comparación con $\beta 2AR365N$ no fusionado de control, por el agonista natural epinefrina puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 5A dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N$ no fusionado entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb80$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 1370$ (tabla 3).
- De manera notable, la fusión $\beta 2AR-Nb80$ tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista carvedilol en comparación con el $\beta 2AR365N$ no fusionado de control. De hecho, las CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb80$ y $\beta 2AR365N-Nb69$ no fusionado por carvedilol (figura 5B y tabla 3) son muy similares.
- En un tercer experimento, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión $\beta 2AR365N-Nb71$ con las propiedades de la quimera $\beta 2AR365N-Nb69$ (figura 6 y tabla 3). Nb71 es otro Nanobody que se une selectivamente a la conformación activa de $\beta 2AR$ (documento WO2012007594). Se encontró que las propiedades farmacológicas de la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$ también muestran afinidades aumentadas por agonistas (isoproterenol, salbutamol) y afinidades reducidas por el agonista inverso ICI-118,551, lo que muestra que la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$, pero no la quimera $\beta 2AR365N-Nb69$ de control, adopta una conformación de estado activo caracterizada por afinidades aumentadas por agonistas y afinidades reducidas por los agonistas inversos. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$, en comparación con $\beta 2AR365N-Nb69$ de control, por el agonista natural epinefrina puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 6A dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb71$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 2030$. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$ por el agonista sintético isoprotenerol puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 6B dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb71$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 80$. La afinidad aumentada de la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$ por el agonista sintético parcial salbutamol puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 6D dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50}^{alta} de $\beta 2AR365N-Nb71$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 450$.
- De manera similar, la afinidad reducida de la quimera $\beta 2AR365N-Nb71$, en comparación con $\beta 2AR365N-Nb69$ de control, por el agonista inverso ICI-118,551 puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI_{50} de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 6E dividiendo la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb69$ entre la CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb71$, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 0,01$.
- Particularmente, la fusión $\beta 2AR-Nb71$ tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista neutro alprenolol en comparación con la quimera $\beta 2AR365N-Nb69$ de control. De hecho, las CI_{50} de $\beta 2AR365N-Nb71$ y $\beta 2AR365N-Nb69$ por alprenolol (figura 6C) son muy similares, de manera que concuerda con el hecho de que los antagonistas

neutros son ligandos no selectivos que se unen a diferentes conformaciones funcionales.

De manera notable, la fusión β 2AR-Nb71 tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista carvedilol en comparación con la quimera β 2AR365N-Nb69 de control. De hecho, las CI50 de β 2AR365N-Nb71 y β 2AR365N-Nb69 por carvedilol (figura 6F) son muy similares.

5 Ejemplo 7: Termoestabilidad conformacional de la fusión β 2AR-Nanobody.

Una de las estrategias para la estabilización de los GPCR, concretamente la termoestabilización de los GPCR, se basa en la mutagénesis sistemática acoplada con ensayos de termoestabilidad en presencia de (radio)ligandos para examinar mutantes con termoestabilidad mejorada (Tate 2012). Desafortunadamente, los receptores que se termoestabilizan en presencia de un agonista no muestran un aumento significativo de las afinidades por sus agonistas respectivos (Serrano-Vega *et al.* 2008, Shibata *et al.* 2009, Lebon *et al.* 2011), lo que indica que estos receptores termoestabilizados no adoptan la conformación totalmente activa del receptor.

Para determinar si la fusión β 2AR365N-Nb80, una proteína de fusión con todas las propiedades del receptor β 2AR en estado activo, tiene una termoestabilidad aumentada, se realizaron ensayos de termoestabilidad con β 2AR365N-Nb80 y β 2AR365N-Nb69 para medir si un Nanobody con comportamiento de tipo proteína G (Nb80) que estabiliza la conformación activa del receptor también aumenta su termoestabilidad, lo que conduce a un receptor termoestabilizado conformacional verdadero.

Para solubilizar los receptores, se incubaron membranas (aproximadamente 1 mg de proteína de membrana total) de células Sf9 que expresaban o bien β 2AR365N-Nb80 o bien β 2AR365N-Nb69 durante una hora sobre hielo en DDM al 1% (Tris HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, n-dodecilo- β -D-maltósido al 1%, leupeptina 10 μ g/ml, PMSF 0,2 mM). A continuación se retiró el material insoluble mediante centrifugación durante 5 min a 17000g. A continuación, se diluyeron los receptores solubilizados con tampón (Tris HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM) hasta una concentración de DDM de DDM al 0,08% y se retiró el material insoluble de nuevo mediante centrifugación (20000g durante 20 min a 4°C). Se diluyeron alícuotas de 20 μ l del receptor solubilizado hasta 90 μ l con tampón de ensayo (Tris HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, n-dodecilo- β -D-maltósido al 1%) y se dejaron sobre hielo durante 30 min.

Se evaluó la termoestabilidad incubando alícuotas diluidas en ausencia de cualquier ligando a una temperatura especificada durante 30 min. Tras 30 minutos, se añadió radioligando en exceso (concentración final de 5 nM) a cada muestra y se dejaron las muestras sobre hielo durante 45 min.

Para cuantificar la fracción restante de receptor funcional, se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre mediante filtración en gel en una columna de sephadex G50 de 2 ml equilibrada con tampón de ensayo helado. Se recogió el radioligando unido a receptor en un volumen de 1 ml y se diluyó en 6 ml de líquido de centelleo (Optiphase Hisafe2, PerkinElmer, n.º de cat. 1200-436) para contar la radiactividad (cpm) en un analizador de centelleo en líquido Tri-carb2810TR (Perkin Elmer). Se estimó la unión no específica midiendo la radiactividad que quedaba en la fracción de proteína en presencia de 1 μ M de alprenolol frío.

Los datos representan la media \pm EEM (experimentos realizados por triplicado) del radioligando que se une específicamente al receptor a una temperatura dada, con respecto al ligando unido a receptor a 0°C. Estos experimentos indican que la quimera β 2AR365N-Nb80 solubilizada (Tf =33°C) tiene una mayor termoestabilidad que β 2AR365N-Nb69 (Tf = 29°C) en DDM al 0,08% (figura 7). Dado que Nb80 estabiliza la conformación activa de β 2AR, se concluye que la quimera β 2AR365N-Nb80 representa un receptor termoestabilizado conformacional.

40 Ejemplo 8: Comparación de las propiedades farmacológicas de la fusión β 2AR-Nanobody con el β 2AR no fusionado en complejo con Nanobody añadido de manera exógena.

Para comparar la eficacia de Nb80 fusionado frente a no fusionado para estabilizar el estado activo de β 2AR, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión β 2AR365N-Nb80 con el β 2AR365N no fusionado en complejo con Nb80 añadido de manera exógena. Se realizaron experimentos de competencia de radioligandos comparativos similares tal como se describió en el ejemplo 6. Se usó el agonista natural epinefrina (Sigma, n.º de cat. E4250) como agente competidor y [³H]-dihidroalprenolol como radioligando. Se sometieron a ensayo la fusión β 2AR365N-Nb69, y β 2AR365N en complejo con Nb69 añadido de manera exógena en paralelo como controles. Se realizaron experimentos de unión de competencia de radioligandos con membranas de células de insecto Sf9 (5 μ g de proteína total) que expresaban β 2AR365N (Nanobody no fusionado), β 2AR365N-Nb80 o β 2AR365N-Nb69. Se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban la fusión β 2AR365N-Nb80 o la fusión β 2AR365N-Nb69 con diferentes concentraciones de epinefrina que oscilaban entre 10⁻¹ M y 10⁻⁴ M en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MaCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). En paralelo, se añadieron diferentes concentraciones de Nb80 o Nb69 purificados, que oscilaban entre 50 pM y 500 nM, a membranas de células Sf9 que expresaban el β 2AR365N no fusionado antes de mezclarlas con las diferentes concentraciones de epinefrina que oscilaban entre 10⁻¹⁰ M y 10⁻⁴ M en tampón de unión. A continuación, se añadió el radioligando [³H]-dihidroalprenolol (concentración final de 2 nM) a cada condición y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de

agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 μ l). Se recogieron las membranas unidas a ligando y se midió la radiactividad tal como se describió en el ejemplo 6. Los datos representan la media \pm EEM de cada punto de datos realizado por triplicado.

5 Los datos representan la media \pm EEM de cada experimento realizado por triplicado. Los valores de CI50 se determinaron mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

10 Tal como puede observarse en la figura 8, la afinidad de β 2AR365N no fusionado por el agonista natural epinefrina depende de la concentración de Nb80, aumentando la afinidad aparente de manera simultánea con concentraciones crecientes de Nb80 añadido de manera exógena. El desplazamiento de potencia de epinefrina de β 2AR365N en presencia de Nb80 500 nM es de sólo 87 veces, mientras que es de 534 veces para la fusión β 2AR365N-Nb80 (calculado dividiendo la CI50 de la fusión simulada entre las CI50 respectivas de β 2AR365N no fusionado en presencia de Nb80 añadido de manera exógena y β 2AR365N-Nb80). Sólo en presencia de Nb80 exógeno 5 μ M, la CI50 obtenida con el β 2AR365N no fusionado es idéntica a la obtenida con la fusión β 2AR365N-Nb80. Tienen que añadirse 5 μ M de Nb80 libre al receptor no fusionado para medir una afinidad comparable de β 2AR365N no fusionado y la fusión β 2AR365N-Nb80 por el agonista natural epinefrina. Por tanto, la concentración intramolecular eficaz de Nb80 en la fusión β 2AR365N-Nb80 parece ser superior a 500 nM.

20 Se determinó que la cantidad de β 2AR en las membranas de Sf9 era de aproximadamente 20 pmol/mg de proteína de membrana total para la fusión β 2AR365N-Nb80. Por tanto, cinco μ g de las membranas de Sf9 con β 2AR365N-Nb80 contienen aproximadamente 0,1 pmol de β 2AR. Cinco μ M de Nb80 añadido de manera exógena (en 250 μ l de volumen de reacción) corresponden a aproximadamente 1,25 nmol de Nb80. Se requiere un exceso molar de 12500 veces de Nb80 añadido de manera exógena con respecto a β 2AR para restringir el receptor en su estado activo unido a epinefrina con la misma eficacia en comparación con la fusión β 2AR-Nb80 en las condiciones sometidas a prueba y suponiendo una expresión igual de β 2AR tanto si está fusionado a Nb80 como si no.

25 Los resultados obtenidos mediante el ensayo comparativo de competencia de radioligandos con el β 2AR restringido en el estado activo frente al restringido (ejemplos 6 y 8) permiten distinguir agonistas (parciales) (razones de CI50 > 10) de antagonistas y agonistas inversos (razones de CI50 < 1) (tabla 3). La capacidad para distinguir y predecir el modo de acción de compuestos sometidos a prueba a concentraciones nM- μ M (agonista, agonista parcial, antagonista, agonista inverso) sin la necesidad de un ensayo de señalización de receptor celular es una ventaja para el examen de compuestos.

Ejemplo 9: Generación de constructos de proteína de fusión M2R-Nanobody

30 La fusión GPCR-Nanobody descrita en este ejemplo es un polipéptido quimérico que contiene dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el GPCR receptor de acetilcolina muscarínico M2 (M2R), el ligador GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 49) y un Nanobody, todos los cuales se fusionaron en este orden desde el extremo amino-terminal hasta el carboxilo-terminal. Se fusionaron los genes que codifican para estas proteínas tal como se describe a continuación (figura 9) y se clonaron en el vector pFastBac1.

35 La parte de GPCR, sintetizada sintéticamente, codifica para el péptido señal (SP) de proteína hemaglutinina (HA) escindible derivado del virus influenza (MKTIIALSYIFCLVFA; SEQ ID NO: 52) seguido por el epítipo Flag (DYKDDDD; SEQ ID NO: 50) seguido por un sitio de escisión de TEV (ENLYFQG; SEQ ID NO: 51) seguido por la secuencia codificante de receptor de acetilcolina muscarínico M2 humano que engloba de Met1 a Arg466 con una delección del bucle intracelular 3: sustituyendo los aminoácidos de Pro233 a Lys374 por Thr y Arg. Se introdujeron mutaciones puntuales (N2D, N3D, N6D, N9D) en el constructo para alterar sitios de glicosilación (M2 Δ i3R; SEQ ID NO: 5). Esta modificación por ingeniería de receptor muscarínico se realizó para aumentar los niveles de expresión celular del receptor en células Sf9.

45 Nb9-1 (SEQ ID NO: 16) es un Nanobody que se une selectivamente a M2 Δ i3R unido a agonista y muestra comportamiento de tipo proteína G (también denominado mimético de proteína G), estabilizando por tanto la conformación de estado activo del receptor en el complejo agonista•M2 Δ i3R•Nb9-1. Se optimizó la fusión M2 Δ i3R-Nb9-1 para la expresión en células de insecto y se sintetizó mediante Geneart (pMK-RQM2 Δ i3-Nb9-1; referencia de laboratorio CA7908; Life technologies). Se clonó la fusión receptor-Nanobody como fragmento BgIII-XbaI en el vector pFastBac1 abierto mediante BamHI-XbaI dando como resultado pFastBac1-M2 Δ i3R-Nb9-1 (referencia de laboratorio CA7911). Se construyó un constructo de control que codificaba sólo para el marco de lectura abierto de M2 Δ i3R sin ligador y un Nanobody (pFastBac1-M2 Δ i3R; referencia de laboratorio CA7914) mediante clonación del fragmento BgIII-XbaI de pMK-RQM2 Δ i3R (sintetizado mediante Geneart, referencia de laboratorio 7909) en el vector pFastBac1. Se transformaron todos los constructos en células *E. coli* Top10. Las secuencias de aminoácidos codificadas por el constructo de control M2 Δ i3R y el constructo de fusión M2 Δ i3R-Nb se muestran en las figuras 9B y C (SEQ ID NO: 5 y 6). Se preparó el constructo de fusión M2 Δ i3R-Nb9-8 de manera similar. Nb9-8 (SEQ ID NO: 17) es otro ejemplo de un Nanobody específico para M2R con comportamiento de tipo proteína G (Kruse, 2013).

Ejemplo 10: Expresión de fusión M2 Δ i3R-Nanobody y de M2 Δ i3R en células Sf9 infectadas por baculovirus

Para producir b cmidos que codificaban para la fusión M2 i3R-Nanobody, se transformó un ng de pFastBac1-M2 i3R-Nb9-1 en células DH10BacTM usando el sistema de expresión en baculovirus Bac-to-Bac[®] según las instrucciones del fabricante y se sembraron en placa durante la noche tal como se describió en el ejemplo 2. Se escogieron las colonias blancas, se purificaron los b cmidos y volvieron a confirmarse las secuencias de los marcos de lectura abiertos. Se produjo baculovirus recombinante en células Sf9 mediante transfección del bécrido M2 i3R-Nanobody9-1 y el bécrido M2 i3R.

Se prepararon reservas de baculovirus P1 y P2 tal como se describió en el ejemplo 2. Se logró la expresión recombinante de M2 i3R o la fusión M2 i3R-Nb9-1 a través de la infección de células Sf9 que se hicieron crecer de manera reciente a una densidad de 4×10^6 /ml con reservas de baculovirus P2 diluidas 100 veces. Se cultivaron las células infectadas durante de 48 h a 60 h a 27 C (130 rpm) antes de la recogida. Se confirmó la expresión de híbridos GPCR-Nanobody mediante microscopía de fluorescencia con células vivas. Se lavaron las células que expresaban la proteína recombinante dos veces con PBS helada (pH 7,4, EDTA 1,5 mM), se sedimentaron y se almacenaron a -80 C.

Ejemplo 11: Preparación de membranas a partir de células de insecto que expresan M2 i3R o la fusión M2 i3R-Nb.

Se procesaron sedimentos celulares obtenidos mediante centrifugación de cultivos de 50 ml recientes de células Sf9 que expresaban M2 i3R recombinante o fusión M2 i3R-Nb para dar extractos de membrana y se almacenaron exactamente tal como se describió en el ejemplo 4. Se midieron las concentraciones de proteínas totales con el kit de ensayo de proteínas BCA según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las propiedades farmacológicas de estos híbridos GPCR-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos (ejemplo 12).

Ejemplo 12: Análisis de las propiedades farmacológicas de la fusión M2 i3R-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Para analizar las propiedades farmacológicas de la fusión M2 i3R-Nanobody se realizaron experimentos de competencia de radioligandos comparativos usando carbacol (agonista total, Sigma n.  de cat. C4382) y oxotremorina M (agonista, Sigma n.  de cat. O100) como agente competidor y [³H]-N-metil-escopolamina (Perkin Elmer n.  de cat. NET636001MC) como radioligando. Se realizaron experimentos de unión de competencia de radioligandos con membranas de células de insecto Sf9 que expresaban o bien M2 i3R (Nanobody no fusionado) o bien M2 i3R-Nb9-1. Se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban las diferentes proteínas recombinantes (ejemplos 10 y 11, 10  g de proteína total) o bien con carbacol o bien con oxotremorina M a concentraciones que oscilaban entre 10^{-9} M y 10^{-2} M en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). A continuación, se añadió el radioligando [³H]-N-metil-escopolamina (concentración final de 0,5 nM) a cada dilución y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 él). Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre mediante filtración sobre unifiltros Whatman GF/C (Perkin Elmer, n.  de cat. 6005174) usando un colector FilterMate de 96 pocillos (Perkin Elmer). Tras la filtración, se lavaron las membranas retenidas sobre las placas de filtro con tampón de lavado helado (Tris-HCl 20 mM pH 7,4) y se secaron los filtros durante 1 hora a 50 C. Tras añadir 35 él de líquido de centelleo (MicroScintTM-O, Perkin Elmer, n.  de cat. 6013611), se midió la radiactividad (cpm) retenida sobre los filtros en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux.

Se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión M2 i3R-Nb9-1 con las propiedades de M2 i3R (figura 10). Se encontró que las propiedades farmacológicas de la quimera M2 i3R-Nb9-1 eran diferentes de las propiedades de M2 i3R de control, mostrado a modo de ejemplo por las CI50 y la razón de CI50 de los ligandos sometidos a prueba sobre la fusión M2 i3R-Nb9-1 y M2 i3R (tabla 4). La afinidad aumentada de la quimera M2 i3R-Nb9-1, en comparación con M2 i3R no fusionado de control, por el agonista sintético carbacol se calcula como la razón $CI50_{M2 i3R} / CI50^{alta}_{M2 i3R-Nb9-1}$ (figura 10A), dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de $\cong 67$. La razón obtenida para el agonista sintético oxotremorina M es de 316, lo que muestra que la quimera M2 i3R-Nb9-1 adopta una conformación de estado activo (figura 10B). De manera similar, la fusión M2 i3R-Nb9-8 tiene una mayor afinidad por el agonista sintético carbacol en comparación con M2 i3R no fusionado (datos no mostrados).

Ejemplo 13: Generación de constructos de proteína de fusión  1AR-Nanobody

La fusión GPCR-Nanobody descrita en este ejemplo es un polipéptido quimérico que contiene dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el receptor  1-adrenérgico ( 1AR), el ligador GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 60) y un Nanobody, todos los cuales se fusionaron en este orden desde el extremo amino-terminal hasta el carboxilo-terminal. Se fusionaron los genes que codifican para estas proteínas (figura F11A) tal como se describe a continuación.

Se sintetizó un gen de  1AR sintético mediante Geneart (pMK-RQ hbeta1AR; referencia de laboratorio CA CA7910). Codifica para el péptido señal (SP) de proteína hemaglutinina (HA) escindible derivado del virus influenza (MKTIIALSIFYFCLVFA; SEQ ID NO: 52) seguido por el  pitopo Flag (DYKDDDDA; SEQ ID NO: 53) seguido por un sitio de escisión de TEV (ENLYFQG; SEQ ID NO: 51) seguido por la secuencia codificante de receptor  1-

adrenérgico humano que engloba de Pro50 a Arg401 (hβ1AR, Uniprot P08588). La secuencia que codifica para β1AR contiene una delección del bucle intracelular 3 (de Ser260 a Gly304) y dos mutaciones puntuales C392S, C393S para mejorar los niveles de expresión celular del receptor en células Sf9. Alineaciones de las secuencias de aminoácidos de β1AR y β2AR indican que las cadenas laterales de aminoácido que constituyen el epítipo Nb80 en el complejo β2AR•Gs (Rasmussen *et al.* 2011a) son idénticas entre β1AR y β2AR excepto por R318 (numeración de β1AR; Uniprot P08588) que se sustituye por lisina en β2AR. Basándose en esta observación, se introdujo una mutación puntual adicional R318K para crear el epítipo Nb80 completo en el β1AR.

Se clonaron segmentos génicos de Nanobody que codificaban para los Nanobodies respectivos a partir de los plásmidos descritos en el ejemplo 1. Nb80 (SEQ ID NO: 13) es un Nanobody para β2AR que estabiliza el estado activo del β2AR unido a agonistas totales tales como BI-167107 (Rasmussen *et al.* 2011b). Nb69 (SEQ ID NO: 15) es específico para el receptor muscarínico 3 y no tiene afinidad por β2AR detectable.

Se clonó el receptor β1AR como fragmento BglIII-BamHI de pMK-RQ hbeta1AR (referencia de laboratorio CA7910) en el vector pFastBac β2AR365N-Nb80 abierto mediante BamHI (CA6836) para sustituir al receptor β2AR dando como resultado pFastBac-hβ1AR-Nb80 (referencia de laboratorio CA7923). Se construyó un constructo de control pFastBac-hβ1AR-Nb69 (referencia de laboratorio CA7924) que codificaba para el marco de lectura abierto de β1AR unido a Nb69 mediante clonación del mismo fragmento BglIII-BamHI de pMKRQ hbeta1AR en pFastBac β2AR365N-Nb69 (CA6833) para sustituir al receptor β2AR. Se transformaron todos los constructos en células *E. coli* Top10. Las secuencias de aminoácidos codificadas por los constructos de fusión hbeta1AR-Nb se muestran en las figuras 11B-C (SEQ ID NO: 7 y 8).

Ejemplo 14: Expresión de fusiones β1AR-Nanobody en células Sf9 infectadas por baculovirus.

Para producir bécmidos que codificaban para una de las fusiones β1AR-Nanobody, se transformó un ng de pFastBac-hβ1AR-Nb80 o pFast-Bac-β1AR-Nb69 en células DH10Bac™ usando el sistema de expresión en baculovirus Bac-to-Bac® según las instrucciones del fabricante y se sembraron en placa durante la noche tal como se describió en el ejemplo 2. Se escogieron las colonias blancas, se purificaron los bécmidos y volvieron a confirmarse las secuencias de los marcos de lectura abiertos. Se produjo baculovirus recombinante en células Sf9 mediante transfección del bécrido β1AR-Nb80 y el bécrido β1AR-Nb69.

Se prepararon reservas de baculovirus P1 y P2 tal como se describió en el ejemplo 2. Se logró la expresión recombinante de la fusión β1AR-Nb80 o β1AR-Nb69 a través de la infección de células Sf9 que se hicieron crecer de manera reciente a una densidad de 4×10^6 /ml con reservas de baculovirus P2 diluidas 100 veces. Se cultivaron células infectadas durante de 48 h a 60 h a 27°C (130 rpm) antes de la recogida. Se lavaron las células que expresaban la proteína recombinante dos veces PBS helada (pH 7,4, EDTA 1,5 mM), se sedimentaron y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 15: Preparación de membranas a partir de células de insecto que expresan la fusión hβ1AR-Nb80 o hβ1AR-Nb69.

Se procesaron sedimentos celulares obtenidos mediante centrifugación de cultivos de 50 ml recientes de células Sf9 que expresaban fusión hβ1AR-Nb69 o hβ1AR-Nb80 recombinante para dar extractos de membrana y se almacenaron exactamente tal como se describió en el ejemplo 4. Se midieron las concentraciones de proteínas totales con el kit de ensayo de proteínas BCA según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las propiedades farmacológicas de estos híbridos GPCR-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos (ejemplo 16).

Ejemplo 16: Análisis de las propiedades farmacológicas de la fusión hβ1AR-Nanobody mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Para analizar las propiedades farmacológicas de las diferentes fusiones hβ1AR-Nanobody, se realizaron experimentos de competencia de radioligandos comparativos usando el agonista natural epinefrina, después agonista inverso clorhidrato de ICI-118,551 o el antagonista neutro clorhidrato de alprenolol como agente competidor y el antagonista neutro [³H]-dihidroalprenolol como radioligando. El efecto farmacológico de los diferentes ligandos es según Kahsai *et al.* (2011). Se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban las diferentes proteínas recombinantes (ejemplos 14 y 15, 5 μg de proteína total) con epinefrina, ICI118,551 o alprenolol a concentraciones que oscilaban entre 10^{-11} M y 10^{-4} M en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). A continuación, se añadió el radioligando [³H]-dihidroalprenolol (concentración final de 2 nM) a cada dilución y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 μl). Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre tal como se describió en el ejemplo 6. Los datos representan la media ± EEM (error estándar de la media) de cada experimento realizado por triplicado. Los valores de CI50 se determinaron mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

En esta serie de experimentos, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión hβ1AR-Nb80 con las

propiedades de la fusión h β 1AR-Nb69 (figura 12A). Se encontró que las propiedades farmacológicas de la quimera h β 1AR-Nb80 son profundamente diferentes de las propiedades del receptor fusionado a Nb69 de control. En comparación con la quimera de Nb69, h β 1AR fusionado al Nanobody con comportamiento de tipo proteína G (Nb80) muestra una afinidad aumentada por el agonista epinefrina y una afinidad disminuida por el agonista inverso (ICI-118,551), mostrado a modo de ejemplo por las CI50 moduladas de los ligandos sometidos a prueba sobre la fusión h β 1AR-Nb80 y la fusión h β 1AR-Nb69 (tabla 5). Esto demuestra que la quimera h β 1AR-Nb80, pero no la quimera simulada β 2AR365N-Nb69 de control, adopta una conformación de estado activo caracterizada por afinidades aumentadas por agonistas y afinidades reducidas por los agonistas inversos.

La afinidad aumentada de la quimera h β 1AR-Nb80, en comparación con h β 1AR-Nb69 de control, por el agonista natural epinefrina pueden calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 12A dividiendo la CI50 de h β 1AR-Nb69 entre la CI50^{alta} de h β 1AR-Nb80, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de \cong 68. La afinidad reducida de la quimera h β 1AR-Nb80, en comparación con h β 1AR-Nb69 de control, por el agonista inverso ICI-118,551 puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 12B dividiendo la CI50 de h β 1AR-Nb69 entre la CI50^{alta} de h β 1AR-Nb80, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de \cong 0,077.

De manera notable, la fusión h β 1AR-Nb80 tiene poco efecto sobre la afinidad por el antagonista neutro alprenolol en comparación con la quimera h β 1AR-Nb69 de control. De hecho, las CI50 de β 2AR365N-Nb80 y β 2AR365N-Nb69 por alprenolol (figura 12C) son muy similares, de manera que concuerda con el hecho de que los antagonistas neutros son ligandos no selectivos que se unen a diferentes conformaciones funcionales.

Ejemplo 17: Generación de constructo de fusión β 2AR-Nb60.

Las fusiones GPCR-Nanobody descritas en este ejemplo son polipéptidos quiméricos que contienen dos proteínas diferentes conectadas con un ligador peptídico: el GPCR β 2AR, el ligador GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 51) y Nb60, todos los cuales se fusionaron en este orden desde el extremo amino-terminal hasta el carboxilo-terminal. Se fusionaron los genes que codifican para esta proteína tal como se describió en el ejemplo 1 con ajustes menores.

Se amplificó la parte de GPCR a partir de ADN que codificaba para el péptido señal (SP) de proteína hemaglutinina (HA) escindible derivado del virus influenza (MKTIIALSYIFCLVFA; SEQ ID NO: 52) seguido por el epítipo Flag (DYKDDDDA; SEQ ID NO: 53) seguido por un sitio de escisión de TEV (ENLYFQGF; SEQ ID NO: 54) seguido por la secuencia codificante de receptor β 2-adrenérgico humano que engloba de Gly2 a Gly365 (SEQ ID NO: 55). También se introdujo una mutación puntual de N187E en el constructo para alterar este sitio de glicosilación no deseado (β 2AR365N; Rasmussen *et al.*, 2011b). La modificación por ingeniería del receptor β 2-adrenérgico para dar β 2AR365N se realizó para aumentar los niveles de expresión celular del receptor en células Sf9.

Se amplificó el segmento génico de Nanobody a partir de fagémidos que codificaban para el Nb60. Nb60 (SEQ ID NO: 18) es un Nanobody específico para β 2AR que se describe que estabiliza una conformación de β 2AR inactiva e inhibe significativamente la activación de proteína G y el reclutamiento de β -arrestina (Staus *et al.* 2013).

Se fusionaron genéticamente el GPCR y el Nanobody en marco mediante una PCR de extensión por solapamiento. Por tanto, se usaron 2 ng de plásmido que contenía el ADNc de GPCR como molde en una reacción de PCR de 50 μ l (polimerasa Phusion, (Biolabs, n.º de cat. M0530S)) para amplificar el ADN que codifica para β 2AR (CA6817) usando el cebador EP232 (5'-GCAGATCTCGGTCCGAAG-3'; SEQ ID NO: 61) y el cebador EP207 (5'-CCTCCGCCGATCCGCCACCTCCTCCACTCTGCTCCCCTGTG-3'; SEQ ID NO: 57). El cebador EP232 se hibrida en el sentido 5' del sitio de restricción *Eco*RI en el extremo 5' de la secuencia codificante. El cebador EP207 incorpora parte del ligador GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 51) en el extremo C-terminal del receptor. Las condiciones de amplificación para esta reacción fueron de 30 s a 98°C, 25 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 64,5°C, 30 s a 72°C seguido por 5 min a 72°C para amplificar la parte que codifica para GPCR del marco de lectura abierto de la fusión.

Nb60 tiene una secuencia N-terminal y C-terminal idéntica a la de los Nanobodies en el ejemplo 1. Este ADN de Nanobody se amplificó tal como se describió en el ejemplo 1 usando 2 ng de molde (CA2760) y polimerasa Phusion en una reacción de 50 μ l. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación de 30 min a 98°C, 25 ciclos de 10 s a 98°C y 10 s a 72°C seguido por 5 min a 72°C para amplificar la parte que codifica para Nanobody de los híbridos.

Se purificaron fragmentos de PCR que codificaban para el GPCR o un Nanobody usando el kit de purificación de PCR (Promega) y se usaron como moldes en una nueva reacción de PCR de 50 μ l: se mezclaron 6 ng del fragmento de PCR amplificado EP232- β 2AR-EP207 (EP232 y EP207 se refieren a los cebadores que se han usado para la amplificación mediante PCR) con aproximadamente 2 ng de fragmento EP206-Nanobody-EP202 amplificado y se fusionaron con polimerasa Phusion mediante extensión por solapamiento de la siguiente manera. Tras fundir durante 30 s a 98°C y 5 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 72°C, se amplificaron los marcos de lectura abiertos de β 2AR-Nanobody fusionados usando cebadores EP232 y EP202 en 25 ciclos (10 s a 98°C, 30 s a 67°C, 40 s a 72°C) seguido por 5 min a 72°C. Se purificó el fragmento de PCR que contenía el marco de lectura abierto de β 2AR-Nb60, se clonó como fragmento *Eco*RI-*Xba*I en pFastBac1 y se transformó en *E. coli* Top10. Se preparó ADN de plásmido

a partir de una única colonia y se confirmó la secuencia del marco de lectura abierto mediante secuenciación. Los constructos se denominaron pFastBac β 2AR365N-Nb60 (referencia de laboratorio CA8235). Las secuencias de aminoácidos codificadas por los diferentes constructos de fusión β 2AR365N-Nb se facilitan en la figura 2E (SEQ ID NO: 4).

- 5 Ejemplo 18: Expresión de β 2AR-Nb60 en células Sf9 infectadas por baculovirus y preparación de membranas a partir de células de insecto que expresan la fusión β 2AR-Nb60

Para expresar la fusión β 2AR365N-Nb60 en células Sf9, se preparó un báculo que codificaba para la fusión β 2AR-Nb60 y se infectaron células Sf9 tal como se describió en el ejemplo 2. Se prepararon membranas a partir de células de insecto que expresaban la fusión β 2AR-Nb60 tal como se describió en el ejemplo 4. Las propiedades farmacológicas de estos híbridos GPCR-Nanobody se han analizado mediante ensayos de competencia de radioligandos (ejemplo 19).

Ejemplo 19: Análisis de las propiedades farmacológicas de la fusión β 2AR-Nb60 mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Para analizar las propiedades farmacológicas de la fusión β 2AR365N-Nb60 se realizaron experimentos de competencia de radioligandos comparativos usando el agonista natural epinefrina, clorhidrato de (-)-isoproterenol (agonista total) y clorhidrato de ICI-118,551 (agonista inverso) como agente competidor y el antagonista neutro [3 H]-dihidroalprenolol como radioligando. El efecto farmacológico de los diferentes ligandos es según Kahsai *et al.* (2011).

Se realizaron experimentos de unión de competencia de radioligandos con membranas de células de insecto Sf9 que expresaban β 2AR365N-Nb80, β 2AR365N-Nb60 o β 2AR365N-Nb69. Se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban las diferentes proteínas recombinantes (ejemplos 2 y 4, 5 μ g de proteína total) con concentraciones de epinefrina, (-)-isoproterenol o ICI118,551 que oscilaban entre 10^{-11} M y 10^{-2} M en tampón de unión (Tris 75 mM pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). A continuación, se añadió el radioligando [3 H]-dihidroalprenolol (concentración final de 2 nM) a cada dilución y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 μ l). Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre tal como se describió en el ejemplo 6. Los datos representan la media \pm EEM (error estándar de la media) de cada experimento realizado por triplicado. Los valores de CI50 se determinaron mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

En estos experimentos, se compararon las propiedades farmacológicas de la fusión β 2AR365N-Nb60 con las propiedades de la quimera β 2AR365N-Nb80 y β 2AR365N-Nb69 (figura 13A). Nb60 es un Nanobody que se reivindica que estabiliza una conformación de β 2AR inactiva (Staus *et al.* 2013), Nb80 es un Nanobody que se une selectivamente a β 2AR unido a agonista y muestra comportamiento de tipo proteína G, estabilizando por tanto la conformación de estado activo del receptor en el complejo agonista \cdot β 2AR \cdot Nb 80 (Rasmussen *et al.* 2011b). Nb69 es un Nanobody simulado que se une específicamente al receptor muscarínico M3 de rata sin afinidad por β 2AR detectable. Se encontró que las propiedades farmacológicas de la quimera β 2AR365N-Nb60 son profundamente diferentes de las propiedades del receptor fusionado a Nb69 de control. En comparación con la quimera de Nb69, β 2AR fusionado a Nb60 muestra afinidades reducidas por agonistas (epinefrina, isoproterenol) y tiene poco efecto sobre la afinidad por el agonista inverso ICI-118,551, mostrado a modo de ejemplo por las CI50 moduladas de los ligandos sometidos a prueba sobre la fusión de Nb60 y de Nb69 (tabla 6). Esto demuestra que la quimera β 2AR365N-Nb60, pero no la quimera simulada β 2AR365N-Nb69 de control, adopta una conformación que difiere de la conformación de estado activo unida a agonista y difiere de la conformación basal del receptor. Esta conformación se caracteriza por afinidades reducidas por agonistas. Los presentes resultados muestran claramente que diferentes Nanobodies pueden estabilizar diferentes estados conformacionales de un receptor.

La afinidad reducida de la quimera β 2AR365N-Nb60 (frente a la afinidad aumentada de la quimera β 2AR365N-Nb80), en comparación con β 2AR365N-Nb69 de control por el agonista natural epinefrina, puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 13A dividiendo la CI50 de β 2AR365N-Nb69 entre la CI50 de β 2AR365N-Nb60, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de \approx 0,0046 (frente a \approx 855 para la fusión de Nb80 en comparación con la fusión de Nb69). La afinidad reducida de la quimera β 2AR365N-Nb60 por el agonista sintético isoproterenol puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión competitiva dividiendo la CI50 de β 2AR365N-Nb69 entre la CI50 de β 2AR365N-Nb60 (figura 13B), dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de \approx 0,012 (frente a \approx 155 para la fusión de Nb80 en comparación con la fusión de Nb69).

Ejemplo 20: Generación de constructos de fusión receptor de opioides μ -Nanobody.

La secuencia de aa de Mor1 está altamente conservada entre diferentes especies de mamíferos. Más específicamente, la homología de secuencia entre especies para los dominios topológicos intracelulares predichos (ICL + extremo C-terminal) entre Mor1 de ratón, ganado bovino, cerdo y ser humano es $>$ 90%. Sabiendo que Nb33 interacciona con epítomos intracelulares de Mor1 de ratón, se prevé que Nb33 también establezca la conformación activa de hMor1, ya que sólo hay una sustitución conservada en ICL2 (indicado mediante ‘:’ en la figura 14) y una

sustitución semiconservada en el extremo C-terminal (indicado mediante '.' en la figura 14).

Las fusiones GPCR-Nanobody descritas en este ejemplo codifican para polipéptidos quiméricos similares a los descritos en el ejemplo 1. En este caso, se describe el receptor de opioides mu humano (hMor1, secuencia de referencia de NCBI NMR_000914,1) genéticamente fusionado a Nanobody Nb33 (referencia de laboratorio XA8633) y separado por un ligador Gly-Ser de 34 aa (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG; SEQ ID NO: 62). Se optimizó un marco de lectura abierto que codificaba para hMor1 para su expresión en células de insecto y se sintetizó de manera personalizada como fragmento *EcoRI-HindIII* en GeneArt (Life Technologies). En la figura 15 se representa un dibujo del gen híbrido sintético. En comparación con las fusiones de β 2AR representadas en la figura 2A, para las fusiones de receptor de opioides i) se omite el sitio de escisión de TEV y ii) se sustituye β 2AR365N por la secuencia de nt de Mor1 humano que codifica para los residuos de aa 1-360 con una delección adicional de residuos de aa 2-5 (DSSA) y seguido inmediatamente por una inserción de sitio de escisión 3C (LEVLFGQP) antes del ligador 34GS. Nb33 (referencia de laboratorio XA8633; SEQ ID NO: 19) muestra comportamiento de tipo proteína $G_{i/o}$ (también denominado mimético de proteína $G_{i/o}$) y estabiliza selectivamente la conformación de estado activo de Mor1 en el complejo agonista•Mor1•Nb33. De manera similar a G_i , añadir cantidades en exceso de Nb33 aumenta la afinidad de Mor1 de ratón por agonista Dmt1-Dalda al menos 10 veces. En the constructo de fusión, la secuencia codificante de Nb33 se modificó por ingeniería para introducir un sitio de restricción *PstI* único en FR1. Se clonó el gen sintético que codificaba para hMOR1-34GSNb33 como fragmento *EcoRI-HindIII* en pFastBac1 y se transformó en *E. coli* TG1, dando como resultado pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb33 (referencia de laboratorio XA8901). La secuencia de aa codificante de la fusión se representa en la figura 15A. En paralelo, se generó otra fusión de hMOR1 con un Nanobody irrelevante como constructo de control que expresaba la conformación predominante de Mor1. Por tanto, se intercambié la secuencia que codificaba para Nb33 en pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb33 por un segmento génico que codificaba para el Nanobody Nb10 (referencia de laboratorio CA4910). Nb10 (SEQ ID NO: 20) es un Nanobody bien caracterizado específico para epítomos extracelulares de una quimiocina GPCR y no tiene afinidad por Mor1 detectable. Para preparar el segmento génico que codificaba para Nb10 para la fusión, volvió a amplificarse Nb10 mediante PCR usando cebadores A6E (5'-GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3'; SEQ ID 63) que introduce un sitio *PstI* en FR1 (cambiando V por Q) del Nanobody y Gill (5'-CCACAGACAGCCCTCATAG-3'; SEQ ID 64), hibridándose este último oligómero al gen III. Como molde, se usaron 5 ng de una preparación de ADN del fagémido pXAP100 que expresaba la fusión de gen III de Nb10. Las condiciones de amplificación para esta reacción fueron de 3 min a 94°C y 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C seguido por 10 min a 72°C. Tras la purificación, se sometió el amplicón a digestión doble con *PstI* (introducido mediante el oligómero A6E) y *BstEII* (un sitio único que se produce de manera natural en FR4), se purificó y se ligó en el fragmento *PstI-BstEII* purificado en gel de 6,2 kpb derivado de pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb33, dando como resultado pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb10. En la figura 15C se representa la secuencia de aa codificante de la fusión hMOR1-34GS-Nb10 (SEQ ID NO: 20). Tras la clonación, se preparó ADN de plásmido de ambos constructos de fusión a partir de colonias individuales y se confirmó la secuencia del gen híbrido mediante secuenciación.

Ejemplo 21: Expresión de fusiones receptor de opioides mu-Nanobody en células Sf9 infectadas por baculovirus.

Para producir bácmidos que codifican para fusiones Mor1-Nanobody, se transformaron cinco ng de pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb33 o pFastBac1::hMOR1-34GS-Nb10 en las células DH10Bac™. Se produjo baculovirus recombinante transfectando los bácmidos Mor1-Nanobody en células Sf9. Se usó cada bácmido para la transfección de Sf9 mediada por Cellfectin II tal como se describió en el ejemplo 2, excepto porque se recogió el baculovirus recombinante P1 72 h tras la transfección para la fusión de Nb10 y 48 h para la fusión de Nb33. Se almacenaron reservas de virus P1 a -80°C como alícuotas de sobrenadante de cultivo congelado de manera instantánea añadiendo suero de ternero fetal (FCS) al 5% (concentración final). Se preparó una reserva de baculovirus recombinante P2 diluyendo P1 de 50 a 1000 veces en un cultivo de Sf9 reciente a una densidad de 1×10^6 células/ml y cultivando a 27°C y 130 rpm. Se recogieron reservas de virus P2 mediante centrifugación 48 y 72 h tras la infección y se almacenaron tal como se describió anteriormente a -80°C hasta su uso adicional. Se lavaron los sedimentos celulares dos veces con PBS helada (Life Technologies, n.º de cat. 10010-023), complementado con EDTA 1,5 mM, se almacenaron a -80°C para preparar membranas. Se logró la expresión recombinante de las diferentes fusiones Mor1-Nb a través de la infección de células Sf9 que se hicieron crecer de manera reciente a una densidad de 2×10^6 células/ml con reservas de baculovirus P2 diluidas 50, 200 y 1000 veces. Como expresión de control negativo, se infectaron células Sf9 en paralelo con P2 de M2R no relacionado marcado con etiqueta Flag. Se cultivaron las células infectadas durante 48 h a 27°C (130 rpm) antes de la recogida. Se lavaron los sedimentos celulares dos veces en PBS helada (pH 7,4, EDTA 1,5 mM) y se almacenaron a -80°C hasta que se prepararon las membranas. Se confirmó la sobreexpresión de quimeras GPCR-Nanobody mediante citometría de flujo (datos no mostrados).

Ejemplo 22: Análisis de las propiedades farmacológicas de la fusión hMOR1-Nb mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Se evaluó la sobreexpresión de hMOR1-34GS-Nb33 o hMOR1-34GS-Nb10 en células Sf9 mediante un ensayo de radioligando con membranas (P2) para verificar el plegamiento de Mor1 nativo y la estabilización del conformero activo mediante Nb33. Para preparar membranas, se resuspendieron alícuotas de 1×10^7 células Sf9 con hMor1 en 1 ml de tampón de lisis helado que contenía inhibidores de proteasa (ejemplo 4). Se homogeneizó la suspensión

celular sobre hielo aplicando 6 pulsos de 10 s con una mezcladora celular Utraturrax de volumen pequeño (IKA). Se centrifugó el homogeneizado celular durante 35 min a 15000 x g en una centrifugadora previamente enfriada. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de membranas en Tris HCl 75 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa al 10% y se almacenó a -80°C hasta su uso adicional. Se determinó el contenido de proteínas totales de la preparación de membrana usando el kit de ensayo de proteínas BCA según las instrucciones del fabricante.

Se confirmó la sobreexpresión de Mor1 recombinante como fusión de Nanobody (membranas con hMOR1-34GS-Nb33 y hMOR1-34GS-Nb10; P2, 72 h de incubación) en un ensayo de radioligandos midiendo la unión total (TB) y no específica (NS) de radioligando antagonista [³H]-diprenorfina (Perkin Elmer, n.º de cat. NET1121).

Se evalúan las propiedades farmacológicas de Mor1 recombinante en un ensayo de competencia de radioligandos (Manglik *et al*, 2012) con membranas con hMOR1-34GS-Nb33 o hMOR1-34GS-Nb10 (P2, 72 h de expresión). Se transfieren 15 µg de membranas con hMor1-34GSNb33 o hMor1-34GS-Nb10 Sf9 en TBB (Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM) que contenía BSA al 1% como tampón de unión a una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añade una dilución en serie de agente competidor agonista frío (Dmt1-Dalda o KGOP01) o antagonista (naloxona). Tras añadir 1 nM de [³H]-diprenorfina (concentración final), se incuba la mezcla de reacción (volumen total de 125 µl) durante 1 h a temperatura ambiente. Se separa [³H]-diprenorfina unida a membrana del radioligando no unido en un colector FilterMate de 96 pocillos haciéndolo pasar sobre un filtro Whatman GF/C previamente empapado con TBB con BSA al 1% y se lava con TBB helado. Se secan los filtros durante 1 hora a 50°C. Tras añadir 35 µl de líquido de centelleo (MicroScint™-O), se midió la radiactividad (cpm) retenida sobre los filtros en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux. Se calcula el porcentaje de unión a radioligandos residual y las curvas de un experimento representativo se representan en la figura 16. Cada valor en el gráfico representa el promedio de 3 puntos de datos. Se determinaron los valores de CI50 mediante análisis de regresión no lineal, con la ecuación de log CI50 de ajuste de un sitio usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Las CI50 obtenidas para todos los ligandos sometidos a prueba se indican en la Tabla x. La CI50 de agonista Dmt-DALDA sobre membranas de Sf9 con hMor1-34GS-Nb33 y hMor1-34GS-Nb10 son de 655 y 18, respectivamente. Para cada ligando agonista sometido a prueba (Dmt1-Dalda o KGOP01), las afinidades más altas (CI50 más bajas) se demuestran con las membranas con hMor1-34GSNb33 en comparación con las obtenidas con membranas con hMor1-34GS-Nb10. Para cada agonista, una razón de CI50 ≥ 20 (tabla 7) indica su preferencia por el receptor de Mor1 en estado activo restringido. Para el antagonista naloxona, las CI50 no difieren significativamente independientemente de si se determinan con membranas con hMor1-34GS-Nb33 o con hMor1-34GS-Nb10. Estos datos respaldan que la fusión de Nb33 expresa Mor1 como confórmero activo y tiene una mayor afinidad por agonistas que por el antagonista naloxona.

Ejemplo 23: Examen de biblioteca de fragmentos usando un ensayo de desplazamiento de radioligandos comparativo con las fusiones β2AR-Nb.

El ejemplo 6 ilustra que las propiedades farmacológicas de la fusión β2AR365N-Nb80 son fundamentalmente diferentes en comparación con la fusión β2AR365N-Nb69: la fusión de Nb80 se une preferentemente a agonistas naturales y sintéticos, mientras que muestra una menor afinidad por los agonistas inversos. Los ejemplos 12, 16, 19 ilustran adicionalmente las propiedades farmacológicas modificadas de fusiones GPCR-Nb particulares. Basándose en este conocimiento, se sometió a prueba si estas diferencias farmacológicas pueden aprovecharse para el descubrimiento de fármacos.

Como ejemplo, se examinó una biblioteca de fragmentos para identificar fragmentos que se unen con afinidades diferentes a β2AR365N-Nb80 frente a β2AR365N-Nb69.

Para identificar fragmentos que se unen con afinidades diferentes a β2AR365N-Nb80 frente a β2AR365N-Nb69, se examinaron 1000 fragmentos de la biblioteca de fragmentos Maybridge RO3 que contiene fragmentos con un peso molecular en el intervalo de 80 a 300 Da, para determinar fragmentos selectivos para la conformación. Se disolvieron todos los fragmentos en DMSO al 100% a una concentración de 200 mM. En primer lugar se diluyeron los 1000 fragmentos de Maybridge diferentes hasta 20 mM en DMSO al 100%, a continuación se diluyeron 40 veces en tampón de unión (Tris 75 mM, pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,05%). En un experimento de unión de competencia de radioligandos comparativo, se mezclaron membranas de células Sf9 (5 µg de proteína total en 100 µl de tampón de unión) que expresaban la fusión β2AR365N-Nb80 con 100 µl de cada uno de los 1000 fragmentos diluidos en 12 placas de 96 pocillos. En paralelo, se mezclaron membranas de células Sf9 (5 µg de proteína total en 100 µl de tampón de unión) que expresaban la fusión β2AR365N-Nb69 con 100 µl de cada uno de los mismos 1000 fragmentos diluidos en series separadas de placas de 96 pocillos. A continuación, se añadió radioligando [³H]-dihidroalprenolol (50 µl, concentración final de 2 nM) a cada muestra (2000 muestras en total) y se incubaron todas durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (el volumen de reacción total por punto de ensayo era de 250 µl). La concentración de examen final de cada fragmento era de 200 µM. Cada placa de 96 pocillos también incluía membranas incubadas con epinefrina (1E-7 M) y alprenolol (1E-6 M, 1E-8 M) como controles. Se recogieron las membranas y se midió la radiactividad de [³H]-dihidroalprenolol restante tal como se describió en el ejemplo 6. Razonando que la mayor parte de los fragmentos no desplazarán el radioligando, se calculó para cada placa de 96 pocillos el número promedio de cuentas por pocillo (excluyendo los controles) y se

usó este valor promedio para normalizar todos los puntos de datos en esa placa (expresado en %). Estos datos normalizados se usaron para comparar la unión de cada fragmento para β 2AR365N-Nb80 frente a β 2AR365N-Nb69 dividiendo el valor normalizado obtenido con β 2AR365N-Nb69 entre el valor normalizado obtenido con β 2AR365N-Nb80. Las razones mayores de 1 indican que un fragmento es selectivo para (tiene una mayor afinidad por) β 2AR365N-Nb80. Las razones menores de 1 indican que un fragmento es selectivo para β 2AR365N-Nb69.

Para medir la reproducibilidad de este ensayo, volvieron a someterse a ensayo por duplicado los 44 fragmentos más selectivos para β 2AR365N-Nb80, los 44 fragmentos más selectivos para β 2AR365N-Nb69 y los 44 fragmentos que desplazan el radioligando en β 2AR365N-Nb80 y β 2AR365N-Nb69 en una medida similar y se clasificaron una vez más usando los datos de los tres ensayos independientes. Este ensayo comparativo permite clasificar las coincidencias de fragmentos de β 2AR en tres perfiles funcionales separados:

- Fragmentos que son más selectivos para β 2AR365N-Nb80 en comparación con β 2AR365N-Nb69, similares al agonista de β 2AR natural y sintético epinefrina y isoproterenol, respectivamente (perfil de agonista).

- Fragmentos que desplazan el radioligando en β 2AR365N-Nb80 y β 2AR365N-Nb69 en una medida similar, similares a alprenolol (perfil de antagonista)

- Fragmentos que son más selectivos para β 2AR365N-Nb69 en comparación con β 2AR365N-Nb80, similares a ICI118551 (perfil de agonista inverso).

Como ejemplo representativo, en la figura 17 se presenta el % de unión a [3 H]-dihidroalprenolol de 6 fragmentos lo que muestra que puede determinarse el perfil de los diferentes fragmentos según su eficacia: 2 fragmentos, representados por AC23506, CC56213, de los 12 fragmentos clasificados más altos que tienen un perfil de agonista, se unen preferentemente a la conformación activa de β 2AR, 2 fragmentos (KM08985, AW00189) de los fragmentos mejor clasificados que tienen un perfil de agonista inverso se unen preferentemente a la conformación predominante (perfil de agonista inverso) y 2 fragmentos (CC46746, CC44914) se unen a ambas conformaciones con la misma afinidad (perfil de antagonistas). De manera notable, sólo un fragmento de las 12 mejores coincidencias con perfil de agonista tiene una estructura de catecolamina, característica para los agonistas de β 2AR endógenos y varios sintéticos.

Ejemplo 24: Análisis de los perfiles de actividad de los fragmentos seleccionados mediante ensayos de competencia de radioligandos comparativos.

Los perfiles de las 18 coincidencias de fragmentos seleccionadas, 12 con el perfil de actividad de agonista, 3 con el perfil de actividad de antagonista y 3 con el perfil de actividad de agonista inverso, se confirmaron posteriormente comparando las curvas de respuesta a la dosis sobre la fusión β 2AR365N-Nb80 frente a la fusión β 2AR365N-Nb69 tal como se describió en el ejemplo 6. En resumen, se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban las diferentes proteínas de fusión recombinantes con cada una de las 18 coincidencias de fragmentos, oscilando las concentraciones entre 4×10^{-7} M y 4×10^{-4} M en tampón de unión, se añadió el radioligando [3 H]-dihidroalprenolol a cada mezcla y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación. Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre tal como se describió en el ejemplo 6. Los datos representan la media \pm DE (desviación estándar) de cada experimento realizado por triplicado. Se generaron gráficos mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Las curvas de respuesta a la dosis con la fusión β 2AR365N-Nb80 estabilizada en estado activo frente a la fusión β 2AR365N-Nb69 (la conformación predominante del receptor) confirman los perfiles de actividad de los 18 fragmentos elegidos en el ejemplo 23. Sorprendentemente, 11 de los 12 fragmentos identificados que pertenecen al perfil de agonista nunca se han asociado con ligandos de β 2AR con actividad agonista. (En la figura 18 se muestra un ejemplo representativo de una curva de respuesta a la dosis de 2 fragmentos para cada perfil de actividad (agonista, antagonista, agonista inverso)). Los fragmentos AC23506, CC56213 se unen claramente con una mayor afinidad a la fusión β 2AR365N-Nb80 estabilizada en estado activo que a la fusión β 2AR365N-Nb69 (figura 18A). Para los fragmentos KM08985, AW00189 se observa lo contrario (figura 18C) mientras que los fragmentos CC46746, CC44914 con un perfil antagonista se unen a ambas conformaciones con la misma afinidad (figura 18B).

Ejemplo 25: Análisis de propiedades farmacológicas de fragmentos elaborados mediante ensayos de radioligandos comparativos.

Para demostrar que el ensayo de radioligandos comparativo puede guiar la elaboración de fragmentos con un perfil agonista, se eligió un fragmento CC56213 basándose en sus curvas de respuesta a la dosis para la elaboración. Posteriormente se sometieron a prueba múltiples variantes químicas en el ensayo de radioligandos comparativo (figura 19) tal como se describió en el ejemplo 6. En resumen, se mezclaron membranas de células Sf9 que expresaban la fusión β 2AR365N-Nb80 o las proteínas de fusión β 2AR365N-Nb69 con cada uno de los fragmentos elaborados (denominados compuestos 8, 9, 10) así como con el fragmento original CC56213, oscilando las concentraciones entre 10^{-9} M y 10^{-3} M en tampón de unión, se añadió el radioligando [3 H]-dihidroalprenolol a cada mezcla y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación. Se separó el radioligando unido a receptor del radioligando libre tal como se describió en el ejemplo 6. Los datos

representan la media \pm EEM (error estándar de la media) de cada experimento realizado por triplicado. Se generaron gráficos mediante análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

El compuesto 8 tenía una afinidad disminuida en comparación con el fragmento original (datos no mostrados) mientras que los compuestos 9 y 10 tenían una potencia aumentada en comparación con el fragmento original CC56213. La afinidad mejorada de los fragmentos elaborados (compuestos 9, 10) frente a los compuestos originales se demostró calculando los valores de CI50 para cada conformero de β 2AR. La afinidad aumentada de la quimera β 2AR365N-Nb80 por los compuestos elaborados 9, 10 y el fragmento original CC56213 en comparación con el β 2AR365N-Nb69 de control puede calcularse a partir de la razón de los valores de CI50 de los experimentos de unión competitiva representados en la figura 19 dividiendo la CI50 de β 2AR365N-Nb69 entre la CI50 de β 2AR365N-Nb80, dando como resultado un desplazamiento de potencia aparente de \cong 71, 94, 22 para los compuesto 9, 10, CC56213, respectivamente. De manera notable, el compuesto 10 no sólo es más potente que su fragmento original CC56213 sino que es cinco veces más selectivo para el β 2AR estabilizado en estado activo.

Ejemplo 26: Determinación de perfiles para el agonismo con los ensayos de biosensor de cAMP de ADRB2 (HitHunter - DiscoverX)

Para someter a prueba si los fragmentos con un 'perfil de agonista' (12 fragmentos descritos en los ejemplos 23 y 24) pueden inducir señalización de β 2AR, se sometieron a prueba los 18 fragmentos del ejemplo 23 en las instalaciones de DiscoverX a 2 concentraciones (2 mM y 100 μ M) en un ensayo celular, midiendo la activación de β 2AR mediada por proteína G. El % de DMSO en el ensayo HitHunter era \leq 1%, una concentración que se demostró que no era tóxica para las células con β 2AR usadas. Como controles se incluyeron epinefrina (1 μ M y 50 nM) y alprenolol (0,1 μ M y 5 nM) en el ensayo. El ensayo de cAMP HitHunter[®] (DiscoverX) monitoriza la activación de un GPCR mediante la acumulación de cAMP mensajero secundario. La síntesis máxima de cAMP provocada por el agonista de control isoproterenol se estableció como el 100% y el comportamiento agonista de los compuestos sometidos a prueba se expresó con respecto al agonismo de isoproterenol (datos no mostrados). De manera notable, en las concentraciones sometidas a prueba, el bioensayo HitHunter sólo identifica tres fragmentos, incluyendo CC56213, que provocan una actividad de señalización de β 2AR detectable y dependiente de la dosis. Una característica bien conocida de las bibliotecas de fragmentos es que muchos fragmentos son tóxicos para células a concentraciones mM y no se identificarán en ensayos celulares. Por tanto, parece que pueden identificarse múltiples fragmentos con un perfil de actividad biológica particular que no pueden identificarse en ensayos celulares actualmente usados para el examen de fragmentos y HTS.

30

Tabla 1. Lista de Nanobodies

Número de referencia de Nanobody	Notación abreviada de Nanobody	SEQ ID NO	Secuencia
CA2780	Nb80	13	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINTMGWY RQAPGKQRELVAIIHSGGSTNYANSVKGRFTISRDNAA NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVKDYGAVLYEYDYWG QGTVTVSS
CA2771	Nb71	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYELRWY RQAPGKQHELVAGITGGNTYYADSVKGRFTISRDNAAK NTVYLQMSNLRPEDTAVYACNANWDLSDYWGGQT QTVTVSS
CA5669	Nb69	15	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGLTSLNYAMGW FRQAPGKEREVFAADTWNGNTYHQDSVKGRFTISRDNAAK NAKNTVYLQMNLYLKPEDTAVYYCAARGSRSSAYSSS DYTYRGQGTQTVTVSS
	Nb9-1	16	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGHTFSSARMYW VRQAPGKEREVFAAISRSFGFTYSADSVKGRFTISRDIAN NTVYLQMNSLQPEDTAIYTCYAAYLDEFYNDYTHYWG LGTQTVTVSS
	Nb9-8	17	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGFDFDNFDDYAI GWFRQAPGQEREGVSCIDPSDGSTIYADSAKGRFTISS DNAENTVYLQMNLYLKPEDTAVYYVCSAWTLFHSDEYW GQGTQTVTVSS

CA2760	Nb60	18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSLNDMGW YRQAPGKLRLELVAAITSGGSTKYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNAKVAGTFSIYDYWGQ GTQVTVSS
XA8633	Nb33	19	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVDSERTSYPMGWFR RAPGKEREFVASITWSGIDPTYADSVADRFTISRVDAN NTLYLQMNSLKHEDTAVYYCAARAPVGGQSSSPYDYDY WGQGTQVTVSS
CA4910	Nb10	20	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFRSIVSMAWY RQAPGKQRELVASSNSGGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYWCNVQNRPLPGFDFAFSGR SIAETYWGQGTQVTVSS

Tabla 2. CDR de Nanobodies indicados

Número de referencia de Nanobody	Notación abreviada de Nanobody	CDR1	CDR2	CDR3
CA2780	Nb80	GSIFSINT (SEQ ID NO: 21)	IHSGGST (SEQ ID NO: 29)	NVKDYGAVLYEYDY (SEQ ID NO: 37)
CA2771	Nb71	GFAFSSYE (SEQ ID NO: 22)	ITTGGNT (SEQ ID NO: 30)	NANWDLSDY (SEQ ID NO: 38)
CA5669	Nb69	GLTLSNYA (SEQ ID NO: 23)	DTWNGNT (SEQ ID NO: 31)	AARGSRRSAYSSSDYTY (SEQ ID NO: 39)
	Nb9-1	GHTFSSAR (SEQ ID NO: 24)	ISRSGFT (SEQ ID NO: 32)	YAAILDEFYNDYTHY (SEQ ID NO: 40)
	Nb9-8	GDFDFNFDDYA (SEQ ID NO: 25)	IDPSDGST (SEQ ID NO: 33)	SAWTLFHSDEY (SEQ ID NO: 41)
	Nb60	GSIFSLND (SEQ ID NO: 26)	ITSGGST (SEQ ID NO: 34)	NAKVAGTFSIYDY (SEQ ID NO: 42)
XA8633	Nb33	ERTSYP (SEQ ID NO: 27)	ITWSGIDP (SEQ ID NO: 35)	AARAPVGGQSSSPYDYDY (SEQ ID NO: 43)
CA4910	Nb10	GFRSIVS (SEQ ID NO: 28)	SNSGGST (SEQ ID NO: 36)	NVQNRPLPGFDFAFSGRSIAETY (SEQ ID NO: 44)

Tabla 3. Desplazamientos de potencia dependientes de ligando con β 2AR restringido en el estado activo. Los valores representan la razón de la CI50 del β 2AR no restringido indicado (como fusión con Nb69 simulado o como receptor no fusionado) con respecto a la CI50 del receptor restringido en el estado activo (fusión de Nb80 o Nb71)

Ligando	Actividad biológica	Razones de CI50		
		β 2AR365N-Nb80 (frente a fusión simulada β 2AR365N-Nb69)	β 2AR365N-Nb80 (frente a β 2AR365N)	β 2AR365N-Nb71 (frente a fusión simulada β 2AR365N-Nb69)
epinefrina	Agonista total (ligando endógeno)	2072	1375	2032
isoproterenol	Agonista total	670	ND	80
alprenolol	Antagonista neutro	4	ND	1,5
salbutamol	Agonista parcial	373	ND	454
ICI-118,551	Agonista inverso	0,023	ND	0,01
carvedilol	Antagonista	0,4	0,22	0,6

ND: no determinado

5

Tabla 4. CI50 de ligandos para M2 Δ i3R-Nb9-1 en comparación con M2 Δ i3R

Ligando	Actividad biológica	CI50 (μ M)		Razón de CI50
		M2 Δ i3R-Nb9-1	M2 Δ i3R	CI50 _{M2Δi3R} /CI50 _{M2Δi3R-Nb9-1} ^{alta}
carbacol	Agonista total	7,17	482	67,22
oxotremorina M	Agonista total	0,31	98,4	316

Tabla 5. CI50 de ligandos para h β 1AR-Nb80 en comparación con β 2AR-Nb69

Ligando	Actividad biológica	CI50 (nM)	Razón de CI50
---------	---------------------	-----------	---------------

		hβ1AR-Nb80	hβ1AR-Nb69	CI50 _{hβ1AR-Nb69} /CI50 ^{alta} _{hβ1ARNb80}
epinefrina	Agonista total (ligando endógeno)	5,48	376	68,67
alprenolol	Antagonista neutro	14,61	14,44	0,988
ICI-118,551	Agonista inverso	10450	805	0,077

Tabla 6. CI50 de ligandos para el β2AR-Nb60 en comparación con β2AR-Nb69

Ligando	Actividad biológica	CI50 (nM)		Razón de CI50
		β2AR-Nb60	β2AR-Nb69	CI50 _{β2AR-Nb69} /CI50 _{β2AR-b60}
epinefrina	Agonista total (ligando endógeno)	284000	1310	0,0046
isoprotenerol	Agonista total	69200	836	0,012
ICI-118,551	Agonista inverso	22,8	11,4	0,5

Tabla 7. CI50 y preferencia en veces de ligandos para conformeros de Mor1 predominante (hMor1-34GS-Nb10) y estabilizado en el estado activo (hMor1-34GS-Nb33).

Ligando	CI50 (nM)		
	hMor1-34GS-Nb33	hMor1-34GS-Nb10	CI50 _{Nb33} /CI50 _{Nb10}
Dmt1-Dalda (agonista)	18	655	36
KGOP01 (agonista)	3,8	76,7	20
Naloxona (antagonista)	21	49	2

Bibliografía

- 5 • Binz *et al.*, Nature Biotech., 22: 575-582 (2004)
- Bokoch, M. P., Y. Zou, S. G. Rasmussen, C. W. Liu, R. Nygaard, D. M. Rosenbaum, J. J. Fung, H. J. Choi, F. S. Thian, T. S. Kobilka, J. D. Puglisi, W. I. Weis, L. Pardo, R. S. Prosser, L. Mueller y B. K. Kobilka (2010). "Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor." Nature 463(7277): 108-112.
- Caffrey (2003). Membrane protein crystallization. J Struct. Biol. 2003 142:108-32.
- 10 • Caffrey, M. & Cherezov, V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. Nat Protoc 4, 706-731, (2009).
- Chasin *et al.*, 1986, Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556.
- Chelikani *et al* Protein Sci. 2006 15:1433-40
- 15 • Chen, I. y A. Y. Ting (2005). "Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells." Curr Opin Biotechnol 16(1): 35-40.
- Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science 318, 1258-1265, doi:1150577 [pii] 10.1126/science.1150577 (2007).
- Christopoulos, A. (2002). "Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery." Nat Rev Drug Discov 1(3): 198-210.
- 20 • Chun, E., A. A. Thompson, W. Liu, C. B. Roth, M. T. Griffith, V. Katritch, J. Kunken, F. Xu, V. Cherezov, M. A. Hanson y R. C. Stevens (2012). "Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors." Structure 20(6): 967-976.
- Danley, D. E. (2006). "Crystallization to obtain protein-ligand complexes for structure-aided drug design." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 62(Pt 6): 569-575.
- 25 • Day P.W., Rasmussen S.G., Parnot C., Fung J.J., Masood A., Kobilka T.S., Yao X.J., Choi H.J., Weis W.I. y Rohrer D.K. *et al.*, A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography, Nat Methods 4 (2007), págs. 927-929.
- Derewenda Z. S. Rational protein crystallization by mutational surface engineering, Structure (Camb) 12 (2004), págs. 529-535.
- 30 • Desmyter A, Spinelli S, Payan F, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S, Cambillau C. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology. J Biol Chem. 2002 Jun 28;277(26):23645-50.
- Deveraux *et al.* 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395

- Dimitrov DS. Engineered CH2 domains (nanoantibodies). MAbs. Enero-febrero de 2009;1(1):26-8.
- Eroglu *et al* EMBO 2002 3: 491^96
- Eroglu *et al* Proc. Natl. Acad. Sci. 2003 100: 10219-10224
- 5 • Faham *et al* Crystallization of bacteriorhodopsin from bicelle formulations at room temperature. Protein Sci. 2005 14:836-40. 2005
- Faham *et al*, Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. J Mol Biol. 2002 Feb 8;316(1): 1-6.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, *et al.* (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacological reviews 57(2): 279-288.
- 10 • Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, *et al.* (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Molecular Pharmacology 63(6): 1256-1272.
- Früh V, Zhou Y, Chen D, Loch C, Ab E, Grinkova YN, Verheij H, Sligar SG, Bushweller JH, Siegal G. Application of fragment-based drug discovery to membrane proteins: identification of ligands of the integral membrane enzyme DsbB. Chem Biol. 27 de agosto de 2010;17(8):881-91.
- 15 • Galandrin S, Oligny-Longpré G, Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. Trends Pharmacol Sci. Agosto de 2007;28(8):423-30.
- Gebauer M, Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol. Junio de 2009;13(3):245-55.
- George *et al.* 2002, Nat Rev Drug Discov 1:808.
- 20 • Gouaux, It's not just a phase: crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. Structure. 1998 6:5-10;
- Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK. Structure of the μ -opioid receptor bound to naltrindole. Nature. 16 de mayo de 2012;485(7398):400-4.
- 25 • Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. Nature. 25 de enero de 2012;482(7386):547-51.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363, 446-448, doi:10.1038/363446a0 (1993).
- 30 • Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, Desale H, Clemons B, Cahalan SM, Schuerer SC, Sanna MG, Han GW, Kuhn P, Rosen H, Stevens RC. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. Science. 17 de febrero de 2012;335(6070):851-5.
- Heilker *et al* 2009. Drug Discovery Today 14:231-240.
- Hunte C. y Michel H., Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, Curr Opin Struct Biol 12 (2002), págs. 503-508.
- 35 • Kahsai, A. W., K. Xiao, S. Rajagopal, S. Ahn, A. K. Shukla, J. Sun, T. G. Oas y R. J. Lefkowitz (2011). "Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor." Nat Chem Biol 7(10): 692-700.
- Kallwass *et al*, Biotechnol. Lett., 15 (1), 29-34, 1993
- Kenakin 2002, Trends Pharmacol Sci 25:186.
- 40 • Kenakin TP (2009) Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. Nature reviews Drug discovery 8: 617-626
- Kobilka, B. K. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. Anal Biochem 231, 269-271 (1995).
- Koide *et al*, J. Mol Biol, 284: 1141-1151 (1998)
- 45 • Kolakowski, L. F. (1994). "GCRDB - A G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR DATABASE." Receptors & Channels 2(1): 1-7.

- Kolkekar *et al.*, 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909.
- Korotkov KV, Pardon E, Steyaert J, Hol WG. Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure*. 13 de febrero de 2009;17(2):255-65.
- 5 • Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 22 de febrero de 2012;482(7386):552-6.
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 5 de diciembre de 2013;504(7478).
- 10 • Lagerström, M. C. y H. B. Schiöth (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." *Nature reviews. Drug discovery* 7: 339-357.
- Landau *et al*, Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 93:14532-5
- Lawson, A. D. (2012). "Antibody-enabled small-molecule drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 11(7): 519-525.
- 15 • Lebon, G., K. Bennett, A. Jazayeri y C. G. Tate (2011). "Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor." *J Mol Biol* 409(3): 298-310.
- Lebon, G., T. Warne y C. G. Tate (2012). "Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors." *Curr Opin Struct Biol* 22(4): 482-490.
- Lee GM, Craik CS (2009). Trapping moving targets with small molecules. *Science*. Apr 10;324(5924):213-5.
- 20 • Lefranc, M. P., C. Pommie, *et al.* (2003). "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." *Developmental and Comparative Immunology* 27(1): 55-77.
- Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, Wüthrich K. Biased signaling pathways in β 2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science*. 2012 Mar 2;335(6072):1106-10.
- Luca *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100 :10706-1 1
- 25 • Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. Crystal structure of the m-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. 21 de marzo de 2012;485(7398):321-6.
- Mansoor *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006 103: 3060-3065
- Marchese *et al.* *Genomics* 23: 609-618, 1994
- 30 • Mary, S., M. Damian, M. Louet, N. Floquet, J. A. Fehrentz, J. Marie, J. Martinez y J. L. Baneres (2012). "Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21): 8304-8309.
- Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68
- Muralidharan, V. y T. W. Muir (2006). "Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins." *Nat Methods* 3(6): 429-438.
- 35 • Niu *et al*, *Biophys J.* 2005 89: 1833-1840
- Nollert *et al* *Lipidic cubic phases as matrices for membrane protein crystallization Methods.* 2004 34:348-53
- Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.
- 40 • Ostermeier C., Iwata S., Ludwig B. y Michel H., Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase, *Nat Struct Biol* 2 (1995), págs. 842-846.
- Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745 (2000).
- Popp, M. W., J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner y H. L. Ploegh (2007). "Sortagging: a versatile method for protein labeling." *Nature chemical biology* 3: 707-708.
- 45 • Probst *et al.* 1992, *DNA Cell Biol.* 1992 11 : 1 -20

- Rabuka, D. (2010). "Chemoenzymatic methods for site-specific protein modification." *Curr Opin Chem Biol* 14(6): 790-796.
- Rajagopal, S., K. Rajagopal y R. J. Lefkowitz (2010). "Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors." *Nature reviews. Drug discovery* 9: 373-386.
- 5 • Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 19 de julio de 2011a;477(7366):549-55.
- 10 • Rasmussen, S. G., H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis y B. K. Kobilka (2011b). "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor." *Nature* 469(7329): 175-180.
- 15 • Rasmussen, S. G. F., H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. X. Schertler, W. I. Weis y B. K. Kobilka (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* 450: 383-387.
- Reeves *et al.* 2002, *PNAS*, 99: 13419
- Rich RL, Errey J, Marshall F, Myszka DG. Biacore analysis with stabilized G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem*. 2011 Feb 15;409(2):267-72.
- Riechmann y Muyldermans J. *Immunol. Methods* 2000; 240: 185-195.
- 20 • Rios *et al.* 2001, *Pharmacol Ther* 92:71
- Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens y B. K. Kobilka (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." *Science* 318(5854): 1266-1273.
- 25 • Rosenbaum, D. M. *et al.* Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236-240 (2011).
- Rosenbaum D. M., S. G. Rasmussen, y B. K. Kobilka, *Nature* 459 (7245), 356 (2009).
- Rummel *et al*, *Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins*. *J. Struct. Biol.* 1998 121 :82-91;
- 30 • Serrano-Vega, M. J., F. Magnani, Y. Shibata y C. G. Tate (2008). "Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(3): 877-882.
- Shibata, Y., J. F. White, M. J. Serrano-Vega, F. Magnani, A. L. Aloia, R. Grisshammer y C. G. Tate (2009). "Thermostabilization of the neurotensin receptor NTS1." *Journal of Molecular Biology* 390(2): 262-277.
- Shimada *et al* *J. Biol. Chem.* 2002 277:31774-80
- 35 • Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*. 2011 Jun 22;475(7354):65-70.
- Shoichet, B. K. y B. K. Kobilka (2012). "Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* 33(5): 268-272.
- 40 • Skerra, J. *Molecular Recognition*, 13:167-187 (2000).
- Starovasnik MA, Braisted AC, Wells JA. Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sep 16; 94(19):10080-5.
- Staus DP, Wingler LM, Strachan RT, Rasmussen SGF, Pardon E, Ahn S, *et al.* Regulation of Beta-2-Adrenergic Receptor Function by Conformationally Selective Single-domain Intrabodies. *Mol Pharmacol*. 6 de diciembre de 2013.
- 45 • Steyaert J, Kobilka BK (2011). Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr Opin Struct Biol*. Aug;21(4):567-72.
- Tate, C. G. (2012). "A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures." *Trends Biochem*

Sci.

- Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216
- Warne, T., R. Moukhametzianov, J. G. Baker, R. Nehmé, P. C. Edwards, A. G. W. Leslie, G. F. X. Schertler y C. G. Tate (2011). "The structural basis for agonist and partial agonist action on a β 1-adrenergic receptor." Nature 469: 241-244.
- Wesolowski *et al.* (2009), Med. Microbiol. Immunol. 198:157
- White, J. F., N. Noinaj, Y. Shibata, J. Love, B. Kloss, F. Xu, J. Gvozdenovic-Jeremic, P. Shah, J. Shiloach, C. G. Tate y R. Grisshammer (2012). "Structure of the agonist-bound neurotensin receptor." Nature 490(7421): 508-513.
- Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang XP, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JD1c. Nature. 21 de marzo de 2012;485(7398):327-32.
- Xu, F., *et al.* (2011). "Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor." Science 332(6027): 322-327.
- Yao, X., C. Parnot, X. Deupi, V. R. P. Ratnala, G. Swaminath, D. Farrens y B. Kobilka (2006). "Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor." Nature chemical biology 2: 417-422.
- Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, Green HF, Pandey A, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Coughlin SR, Kobilka BK. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. Nature. 20 de diciembre de 2012;492(7429):387-92.

Lista de secuencias

- <110> VIB VZW VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL
- <120> Polipéptidos quiméricos novedosos para fines de examen y descubrimiento de fármacos
- <130> JS/FUS/441
- <150> Documento US 61/758.518
- <151> 30-01-2013
- <150> Documento EP 13154552.7
- <151> 08-02-2013
- <150> Documento EP 13187265.7
- <151> 03-10-2013
- <160> 64
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 531
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fusión GPCR-Nanobody
- <400> 1

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Phe
 20 25 30

Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg Ser
 35 40 45

His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val
 50 55 60

Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe
 65 70 75 80

Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln
 85 90 95

Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val
 100 105 110

Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys
 115 120 125

ES 2 654 675 T3

Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp
 130 135 140

Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val
 145 150 155 160

Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu
 165 170 175

Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val Ser
 180 185 190

Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala Thr
 195 200 205

His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Glu Glu Thr Cys Cys Asp Phe
 210 215 220

Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Tyr
 225 230 235 240

Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln Glu
 245 250 255

Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe His
 260 265 270

Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His Gly
 275 280 285

Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu Lys
 290 295 300

Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro Phe
 305 310 315 320

Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Arg Lys
 325 330 335

Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Ile Gly Tyr Val Asn Ser Gly Phe
 340 345 350

Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe Gln
 355 360 365

Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Tyr Gly Asn Gly

ES 2 654 675 T3

370

375

380

Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly
385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
405 410 415

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser
420 425 430

Ile Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys
435 440 445

Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile His Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr
450 455 460

Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala
465 470 475 480

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
485 490 495

Val Tyr Tyr Cys Asn Val Lys Asp Tyr Gly Ala Val Leu Tyr Glu Tyr
500 505 510

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
515 520 525

His His His
530

<210> 2

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 2

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Phe
20 25 30

Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg Ser
35 40 45

ES 2 654 675 T3

His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val
 50 55 60
 Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln
 85 90 95
 Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val
 100 105 110
 Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys
 115 120 125
 Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp
 130 135 140
 Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu
 165 170 175
 Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val Ser
 180 185 190
 Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala Thr
 195 200 205
 His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Glu Glu Thr Cys Cys Asp Phe
 210 215 220
 Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Tyr
 225 230 235 240
 Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln Glu
 245 250 255
 Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe His
 260 265 270
 Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His Gly
 275 280 285
 Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu Lys

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 3

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Phe
 20 25 30

Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg Ser
 35 40 45

His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val
 50 55 60

Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe
 65 70 75 80

Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln
 85 90 95

Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val
 100 105 110

Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys
 115 120 125

Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp
 130 135 140

Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val
 145 150 155 160

Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu
 165 170 175

Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val Ser
 180 185 190

Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala Thr
 195 200 205

His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Glu Glu Thr Cys Cys Asp Phe
 210 215 220

Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Tyr

ES 2 654 675 T3

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Tyr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
485 490 495

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Gly Ser Arg Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser
500 505 510

Ser Ser Asp Tyr Thr Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 4

<211> 530

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 4

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Phe
 20 25 30

Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg Ser
 35 40 45

His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val
 50 55 60

Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe
 65 70 75 80

Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln
 85 90 95

Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val
 100 105 110

Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys
 115 120 125

Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp
 130 135 140

Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val

ES 2 654 675 T3

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
405 410 415

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser
420 425 430

Ile Phe Ser Leu Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys
435 440 445

Leu Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr
450 455 460

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
465 470 475 480

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
485 490 495

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Lys Val Ala Gly Thr Phe Ser Ile Tyr Asp
500 505 510

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 5

<211> 356

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 5

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Met Asp
20 25 30

Asp Ser Thr Asp Ser Ser Asp Asn Ser Leu Ala Leu Thr Ser Pro Tyr
35 40 45

Lys Thr Phe Glu Val Val Phe Ile Val Leu Val Ala Gly Ser Leu Ser
50 55 60

Leu Val Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Met Val Ser Ile Lys Val

ES 2 654 675 T3

Ile Asn Ser Thr Ile Asn Pro Ala Cys Tyr Ala Leu Cys Asn Ala Thr
325 330 335

Phe Lys Lys Thr Phe Lys His Leu Leu Met Cys His Tyr Lys Asn Ile
340 345 350

Gly Ala Thr Arg
355

<210> 6

<211> 506

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 6

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Met Asp
 20 25 30

Asp Ser Thr Asp Ser Ser Asp Asn Ser Leu Ala Leu Thr Ser Pro Tyr
 35 40 45

Lys Thr Phe Glu Val Val Phe Ile Val Leu Val Ala Gly Ser Leu Ser
 50 55 60

Leu Val Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Met Val Ser Ile Lys Val
 65 70 75 80

Asn Arg His Leu Gln Thr Val Asn Asn Tyr Phe Leu Phe Ser Leu Ala
 85 90 95

Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly Val Phe Ser Met Asn Leu Tyr Thr Leu
 100 105 110

Tyr Thr Val Ile Gly Tyr Trp Pro Leu Gly Pro Val Val Cys Asp Leu
 115 120 125

Trp Leu Ala Leu Asp Tyr Val Val Ser Asn Ala Ser Val Met Asn Leu
 130 135 140

Leu Ile Ile Ser Phe Asp Arg Tyr Phe Cys Val Thr Lys Pro Leu Thr
 145 150 155 160

Tyr Pro Val Lys Arg Thr Thr Lys Met Ala Gly Met Met Ile Ala Ala

ES 2 654 675 T3

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Arg
420 425 430

Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
435 440 445

Ser Arg Asp Ile Ala Asn Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
450 455 460

Gln Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Thr Cys Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp
465 470 475 480

Glu Phe Tyr Asn Asp Tyr Thr His Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Gln Val
485 490 495

Thr Val Ser Ser His His His His His His
500 505

<210> 7

<211> 488

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 7

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro
 20 25 30

Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu Met Ala
 35 40 45

Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile Val Ala
 50 55 60

Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe Ile Met
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val Pro Phe
 85 90 95

Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser Phe Phe
 100 105 110

Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile

ES 2 654 675 T3

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
370 375 380

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg
385 390 395 400

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile His Ser Gly
405 410 415

Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
420 425 430

Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
435 440 445

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Lys Asp Tyr Gly Ala
450 455 460

Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
465 470 475 480

Ser Ser His His His His His His
485

<210> 8

<211> 492

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 8

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro
20 25 30

Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu Met Ala
35 40 45

Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile Val Ala
50 55 60

Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe Ile Met
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val Pro Phe

ES 2 654 675 T3

				85						90						95
Gly	Ala	Thr	Ile	Val	Val	Trp	Gly	Arg	Trp	Glu	Tyr	Gly	Ser	Phe	Phe	
			100					105					110			
Cys	Glu	Leu	Trp	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Leu	Cys	Val	Thr	Ala	Ser	Ile	
		115					120					125				
Glu	Thr	Leu	Cys	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Thr	Ser	
	130					135					140					
Pro	Phe	Arg	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	
145					150					155					160	
Val	Cys	Thr	Val	Trp	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Pro	Ile	
				165					170					175		
Leu	Met	His	Trp	Trp	Arg	Ala	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Arg	Arg	Cys	Tyr	
			180					185					190			
Asn	Asp	Pro	Lys	Cys	Cys	Asp	Phe	Val	Thr	Asn	Arg	Ala	Tyr	Ala	Ile	
		195					200					205				
Ala	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Val	Pro	Leu	Cys	Ile	Met	Ala	Phe	
	210					215					220					
Val	Tyr	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	Gln	Val	Lys	Lys	Ile	
225					230					235					240	
Asp	Arg	Ala	Gly	Lys	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Lys	Glu	
				245					250					255		
Gln	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Met	Gly	Val	Phe	Thr	Leu	
			260					265					270			
Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Phe	His	Arg	
		275					280					285				
Glu	Leu	Val	Pro	Asp	Arg	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Asn	Trp	Leu	Gly	Tyr	
	290					295					300					
Ala	Asn	Ser	Ala	Phe	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Cys	Arg	Ser	Pro	Asp	Phe	
305					310					315					320	
Arg	Lys	Ala	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Arg	
				325					330					335		

ES 2 654 675 T3

Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 340 345 350

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
 355 360 365

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 370 375 380

Thr Ala Ser Gly Leu Thr Leu Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
 385 390 395 400

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Asp Thr Trp Asn
 405 410 415

Gly Asn Thr Tyr His Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 420 425 430

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Tyr Leu Lys
 435 440 445

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Gly Ser Arg Arg
 450 455 460

Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Asp Tyr Thr Tyr Arg Gly Gln Gly Thr
 465 470 475 480

Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
 485 490

<210> 9

<211> 550

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 9

ES 2 654 675 T3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Met Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn
20 25 30

Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro

ES 2 654 675 T3

Leu Val Val Val Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile
305 310 315 320

Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln
325 330 335

Thr Val Ser Trp His Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys
340 345 350

Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys
355 360 365

Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro Thr Ser Ser Asn Ile Leu Glu Val Leu
370 375 380

Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
405 410 415

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
420 425 430

Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Asp Ser Glu
435 440 445

Arg Thr Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu
450 455 460

Arg Glu Phe Val Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Ile Asp Pro Thr Tyr
465 470 475 480

Ala Asp Ser Val Ala Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Asn
485 490 495

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys His Glu Asp Thr Ala
500 505 510

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Ala Pro Val Gly Gln Ser Ser Ser Pro
515 520 525

Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
530 535 540

His His His His His His
545 550

<210> 10

ES 2 654 675 T3

<211> 555

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 10

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Met Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn
20 25 30

Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro
50 55 60

Cys Gly Pro Asn Arg Thr Asp Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro
65 70 75 80

Pro Thr Gly Ser Pro Ser Met Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu
85 90 95

Tyr Ser Ile Val Cys Val Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met
100 105 110

Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr
115 120 125

Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile
145 150 155 160

Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser
165 170 175

Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys
180 185 190

His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile
195 200 205

ES 2 654 675 T3

Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val
 210 215 220

Met Phe Met Ala Thr Thr Lys Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Phe Ser His Pro Thr Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile
 245 250 255

Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val
 260 265 270

Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser
 275 280 285

Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val
 290 295 300

Leu Val Val Val Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile
 305 310 315 320

Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln
 325 330 335

Thr Val Ser Trp His Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys
 340 345 350

Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys
 355 360 365

Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro Thr Ser Ser Asn Ile Leu Glu Val Leu
 370 375 380

Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 405 410 415

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
 420 425 430

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 435 440 445

Ser Phe Arg Ser Ile Val Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
 450 455 460

ES 2 654 675 T3

Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ser Ser Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn
465 470 475 480

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
485 490 495

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
500 505 510

Ala Val Tyr Trp Cys Asn Val Gln Asn Arg Leu Pro Gly Phe Asp Ala
515 520 525

Phe Ser Gly Arg Ser Ile Ala Glu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
530 535 540

Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
545 550 555

<210> 11

<211> 548

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 11

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Ala Met Gly Pro Gly Asn Ile Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Asp Pro Leu Ala Pro Ala Ser Cys Ser Pro Ala Pro Gly Ser
35 40 45

Trp Leu Asn Leu Ser His Val Asp Gly Asn Gln Ser Asp Pro Cys Gly
50 55 60

Pro Asn Arg Thr Gly Leu Gly Gly Ser His Ser Leu Cys Pro Gln Thr
65 70 75 80

Gly Ser Pro Ser Met Val Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser
85 90 95

Ile Val Cys Val Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val
100 105 110

ES 2 654 675 T3

Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe
115 120 125

Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln
130 135 140

Ser Val Asn Tyr Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Asn Ile Leu Cys
145 150 155 160

Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe
165 170 175

Thr Leu Cys Thr Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro
180 185 190

Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Val Asn
195 200 205

Val Cys Asn Trp Ile Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe
210 215 220

Met Ala Thr Thr Lys Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr
225 230 235 240

Phe Ser His Pro Thr Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val
245 250 255

Phe Ile Phe Ala Phe Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr
260 265 270

Gly Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser
275 280 285

Lys Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val
290 295 300

Val Val Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val
305 310 315 320

Ile Ile Lys Ala Leu Ile Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val
325 330 335

Ser Trp His Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn
340 345 350

Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg
355 360 365

ES 2 654 675 T3

Glu Phe Cys Ile Pro Thr Ser Ser Thr Ile Leu Glu Val Leu Phe Gln
 370 375 380

Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 420 425 430

Arg Pro Gly Gly Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Asp Ser Glu Arg Thr
 435 440 445

Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 450 455 460

Phe Val Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Ile Asp Pro Thr Tyr Ala Asp
 465 470 475 480

Ser Val Ala Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Asn Asn Thr
 485 490 495

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys His Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 500 505 510

Tyr Cys Ala Ala Arg Ala Pro Val Gly Gln Ser Ser Ser Pro Tyr Asp
 515 520 525

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His
 530 535 540

His His His His
 545

<210> 12

<211> 553

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión GPCR-Nanobody

<400> 12

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

ES 2 654 675 T3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Met Gly Pro Gly Asn Ile Ser Asp
 20 25 30
 Cys Ser Asp Pro Leu Ala Pro Ala Ser Cys Ser Pro Ala Pro Gly Ser
 35 40 45
 Trp Leu Asn Leu Ser His Val Asp Gly Asn Gln Ser Asp Pro Cys Gly
 50 55 60
 Pro Asn Arg Thr Gly Leu Gly Gly Ser His Ser Leu Cys Pro Gln Thr
 65 70 75 80
 Gly Ser Pro Ser Met Val Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser
 85 90 95
 Ile Val Cys Val Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val
 100 105 110
 Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe
 115 120 125
 Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln
 130 135 140
 Ser Val Asn Tyr Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Asn Ile Leu Cys
 145 150 155 160
 Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe
 165 170 175
 Thr Leu Cys Thr Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro
 180 185 190
 Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Val Asn
 195 200 205
 Val Cys Asn Trp Ile Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe
 210 215 220
 Met Ala Thr Thr Lys Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Phe Ser His Pro Thr Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val
 245 250 255
 Phe Ile Phe Ala Phe Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr
 260 265 270

ES 2 654 675 T3

Gly Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser
 275 280 285
 Lys Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val
 290 295 300
 Val Val Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val
 305 310 315 320
 Ile Ile Lys Ala Leu Ile Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val
 325 330 335
 Ser Trp His Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn
 340 345 350
 Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg
 355 360 365
 Glu Phe Cys Ile Pro Thr Ser Ser Thr Ile Leu Glu Val Leu Phe Gln
 370 375 380
 Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 420 425 430
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Phe
 435 440 445
 Arg Ser Ile Val Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
 450 455 460
 Arg Glu Leu Val Ala Ser Ser Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala
 465 470 475 480
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 485 490 495
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
 500 505 510
 Tyr Trp Cys Asn Val Gln Asn Arg Leu Pro Gly Phe Asp Ala Phe Ser
 515 520 525

ES 2 654 675 T3

Gly Arg Ser Ile Ala Glu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 530 535 540

Val Ser Ser His His His His His His
 545 550

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb80

<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 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

10 <210> 14

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Nb71

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 654 675 T3

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> 15

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb69

<400> 15

ES 2 654 675 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 Thr Ala Ser Gly Leu Thr Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Ala Asp Thr Trp Asn Gly Asn Thr Tyr His Gln 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 Tyr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Arg Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Asp Tyr Thr
 100 105 110

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

<210> 16

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb9-1

<400> 16

ES 2 654 675 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 His Thr Phe Ser Ser Ala
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Tyr Leu Asp Glu Phe Tyr Asn Asp Tyr Thr His Tyr Trp Gly
100 105 110

Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb9-8

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp

ES 2 654 675 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 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> 19

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb33

<400> 19

ES 2 654 675 T3

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Asp Ser Glu Arg Thr Ser Tyr Pro Met
 20 25 30

Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ser
 35 40 45

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

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

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

Arg Ala Pro Val Gly Gln Ser Ser Ser Pro Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nb10

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de Nb69
 5 <400> 23
Gly Leu Thr Leu Ser Asn Tyr Ala
1 5
 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de Nb9-1
 <400> 24
Gly His Thr Phe Ser Ser Ala Arg
1 5
 15 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> CDR1 de Nb9-8
 <400> 25
Gly Phe Asp Phe Asp Asn Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5 10
 <210> 26
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de Nb60
 <400> 26
Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn Asp
 30 **1 5**
 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de Nb33
 <400> 27
Glu Arg Thr Ser Tyr Pro
 5 **1** **5**
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> CDR1 de Nb10
 <400> 28
Gly Ser Phe Arg Ser Ile Val Ser
 1 **5**
 <210> 29
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Nb80
 20 <400> 29
Ile His Ser Gly Gly Ser Thr
 1 **5**
 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Nb71
 <400> 30
Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr
 1 **5**
 30 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> CDR2 de Nb69
 <400> 31
Asp Thr Trp Asn Gly Asn Thr
1 5
 <210> 32
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Nb9-1
 10 <400> 32
Ile Ser Arg Ser Gly Phe Thr
1 5
 <210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Nb9-8
 <400> 33
Ile Asp Pro Ser Asp Gly Ser Thr
1 5
 20 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> CDR2 de Nb60
 <400> 34
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5
 <210> 35
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Nb33
 <400> 35

Ile Thr Trp Ser Gly Ile Asp Pro
 1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de Nb10

<400> 36

Ser Asn Ser Gly Gly Ser Thr

10 1 5

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> CDR3 de Nb80

<400> 37

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

<210> 38

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Nb71

25 <400> 38

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

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Nb69

<400> 39

ES 2 654 675 T3

Ala Ala Arg Gly Ser Arg Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Thr Tyr

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Nb9-1

<400> 40

Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Glu Phe Tyr Asn Asp Tyr Thr His Tyr
1 5 10 15

10 <210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR3 de Nb9-8

<400> 41

Ser Ala Trp Thr Leu Phe His Ser Asp Glu Tyr
1 5 10

<210> 42

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Nb60

<400> 42

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

25 <210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CDR3 de Nb33

<400> 43

ES 2 654 675 T3

Ala Ala Arg Ala Pro Val Gly Gln Ser Ser Ser Pro Tyr Asp Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 44

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Nb10

<400> 44

Asn Val Gln Asn Arg Leu Pro Gly Phe Asp Ala Phe Ser Gly Arg Ser
1 5 10 15

Ile Ala Glu Thr Tyr
20

10 <210> 45

<211> 398

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 45

ES 2 654 675 T3

Met Asp Ser Ser Ala Gly Pro Gly Asn Ile Ser Asp Cys Ser Asp Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Ala Ser Cys Ser Pro Ala Pro Gly Ser Trp Leu Asn Leu
 20 25 30

Ser His Val Asp Gly Asn Gln Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn Arg Thr
 35 40 45

Gly Leu Gly Gly Ser His Ser Leu Cys Pro Gln Thr Gly Ser Pro Ser
 50 55 60

Met Val Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val Cys Val
 65 70 75 80

Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr
 85 90 95

Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu
 100 105 110

Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr
 115 120 125

Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Asn Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile
 130 135 140

Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr
 145 150 155 160

Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu
 165 170 175

Asp Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Val Asn Val Cys Asn Trp
 180 185 190

Ile Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr
 195 200 205

Lys Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro
 210 215 220

ES 2 654 675 T3

Thr Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala
225 230 235 240

Phe Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile
245 250 255

Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp
260 265 270

Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Ala Val
275 280 285

Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile Lys Ala
290 295 300

Leu Ile Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp His Phe
305 310 315 320

Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr
325 330 335

Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe Cys Ile
340 345 350

Pro Thr Ser Ser Thr Ile Glu Gln Gln Asn Ser Ala Arg Ile Arg Gln
355 360 365

Asn Thr Arg Glu His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg Thr Asn
370 375 380

His Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro
385 390 395

<210> 46

<211> 400

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

Met Asp Ser Ser Ala Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn Cys Thr Asp Ala
1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Trp Val
20 25 30

Asn Leu Ser His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn
35 40 45

ES 2 654 675 T3

Arg Thr Asp Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro Pro Thr Gly Ser
 50 55 60

Pro Ser Met Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val
 65 70 75 80

Cys Val Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val
 85 90 95

Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu
 100 105 110

Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val
 115 120 125

Asn Tyr Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile
 130 135 140

Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu
 145 150 155 160

Cys Thr Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys
 165 170 175

Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys
 180 185 190

Asn Trp Ile Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala
 195 200 205

Thr Thr Lys Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser
 210 215 220

His Pro Thr Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Ala Phe Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu
 245 250 255

Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu
 260 265 270

Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val
 275 280 285

Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile
 290 295 300

ES 2 654 675 T3

Lys Ala Leu Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp
305 310 315 320

His Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val
325 330 335

Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe
340 345 350

Cys Ile Pro Thr Ser Ser Asn Ile Glu Gln Gln Asn Ser Thr Arg Ile
355 360 365

Arg Gln Asn Thr Arg Asp His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg
370 375 380

Thr Asn His Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro
385 390 395 400

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de factor Xa

<400> 47

Ile Glu Gly Arg

1

10 <210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> sitio de escisión de trombina

<400> 48

Leu Val Pro Arg

1

<210> 49

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de escisión de enterocinasa

<400> 49
Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 <210> 50
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sitio de escisión de PreScission (o 3C)
 <400> 50
 10 **Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro**
 1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Ligador
 <400> 51
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 52
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus influenza A
 <400> 52
Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15
 25 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> epítipo Flag
 <400> 53
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Ala
 1 5
 <210> 54

ES 2 654 675 T3

Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg
 1 5 10 15

Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp
 20 25 30

Val Met Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val
 35 40 45

Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu
 50 55 60

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

Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met
 85 90 95

Lys Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile
 100 105 110

Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala
 115 120 125

Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu
 130 135 140

Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala
 165 170 175

Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Asn Glu Thr Cys Cys Asp
 180 185 190

ES 2 654 675 T3

Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe
 195 200 205

Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln
 210 215 220

Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe
 225 230 235 240

His Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His
 245 250 255

Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu
 260 265 270

Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro
 275 280 285

Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Arg
 290 295 300

Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Ile Gly Tyr Val Asn Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe
 325 330 335

Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Tyr Gly Asn
 340 345 350

Gly Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Tyr His Val
 355 360 365

Glu Gln Glu Lys Glu Asn Lys Leu Leu Cys Glu Asp Leu Pro Gly Thr
 370 375 380

Glu Asp Phe Val Gly His Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Asn Ile Asp
 385 390 395 400

Ser Gln Gly Arg Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu
 405 410

<210> 56

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 56
gcggaattcg agctcgcc 18
5 <210> 57
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador
<400> 57
cctccgccgg atccgccacc tcctccactc tgctcccctg tg 42
<210> 58
<211> 50
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 58
20 ggcggatccg gcggaggttc gcaggtgcag ctgcaggagt ctgggggagg 50
<210> 59
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Cebador
<400> 59
tggaattcta gattagtgat ggtgatggtg gtgtgaggag acggtgacct ggg 54
<210> 60
30 <211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Ligador
35 <400> 60

ES 2 654 675 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20

<210> 61

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 61

gcagatctcg gtccgaag 18

10 <210> 62

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Ligador

<400> 62

gggsggggs gggsggggs gggsggggs ggs 34

<210> 63

<211> 29

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 63

25 gatgtgcagc tgcaggagtc tggrggagg 29

<210> 64

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador

<400> 64

ccacagacag ccctcatag 19

35

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido quimérico que comprende un GPCR fusionado a un dominio de unión selectivo para la conformación, en el que dicho dominio de unión es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y en el que dicho dominio de unión se dirige contra y/o puede unirse específicamente al GPCR, en el que el GPCR se estabiliza en una conformación activa o inactiva tras la unión del dominio de unión y en el que dicho GPCR que se estabiliza en dicha conformación activa o inactiva tiene una afinidad aumentada por un ligando selectivo para la conformación en comparación con el GPCR no fusionado correspondiente.
2. Polipéptido quimérico según la reivindicación 1, en el que el dominio de unión se fusiona al GPCR o bien directamente o bien a través de un ligador.
3. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-2, en el que la conformación activa es una conformación de agonista, una conformación de agonista parcial o una conformación de agonista sesgado.
4. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-2, en el que la conformación inactiva es una conformación de agonista inverso.
5. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio de unión se une a un epítipo intracelular de GPCR, preferiblemente un epítipo intracelular comprendido en un sitio de unión para una proteína de señalización posterior, más preferiblemente un epítipo intracelular comprendido en el sitio de unión a proteína G.
6. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-5, en el que el dominio variable sencillo de inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo de cadena pesada, preferiblemente en el que el dominio variable sencillo de inmunoglobulina comprende una secuencia de VHH o una secuencia de Nanobody.
7. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-6, en el que el GPCR es un GPCR que se produce de manera natural, o una variante de un GPCR que se produce de manera natural o una forma truncada de un GPCR que se produce de manera natural, en el que el GPCR se elige preferiblemente del grupo que comprende un GPCR de la familia de glutamato de los GPCR, un GPCR de la familia de rodopsina de los GPCR, un GPCR de la familia de adhesión de los GPCR, un GPCR de la familia de Frizzled/Taste2 de los GPCR y un GPCR de la familia de secretina de los GPCR.
8. Complejo que comprende un polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7 y un ligando de receptor.
9. Polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7, o complejo según la reivindicación 8, que es cristalino.
10. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7.
11. Célula huésped, preferiblemente una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto, que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 10.
12. Composición de membrana que comprende el polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7 o complejo según la reivindicación 8.
13. Método para presentar un GPCR en una conformación activa o inactiva en la superficie celular o en una fracción de membrana celular particular de una célula huésped, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una célula huésped según la reivindicación 11 y cultivar la célula en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido quimérico.
14. Método de identificación de compuestos selectivos para la conformación, preferiblemente compuestos agonistas tales como un anticuerpo o una molécula pequeña agonista, comprendiendo el método las etapas de
 - (i) proporcionar un polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7, y
 - (ii) proporcionar un compuesto de prueba, y
 - (iii) evaluar la unión selectiva del compuesto de prueba al GPCR comprendido en el polipéptido quimérico.
15. Uso de un polipéptido quimérico según las reivindicaciones 1-7 o un complejo según la reivindicación 8 para cristalizar y/o para resolver la estructura de GPCR o para capturar un GPCR en un estado conformacional funcional.

Figura 1

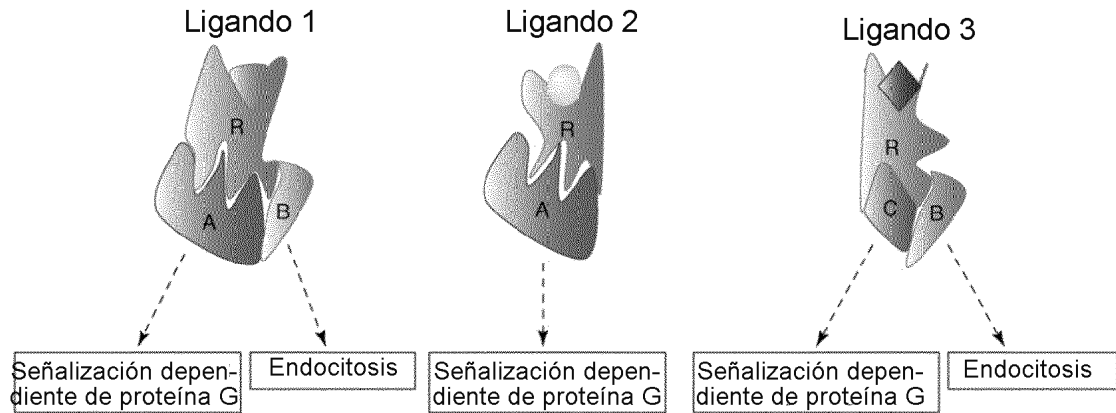


Figura 2A

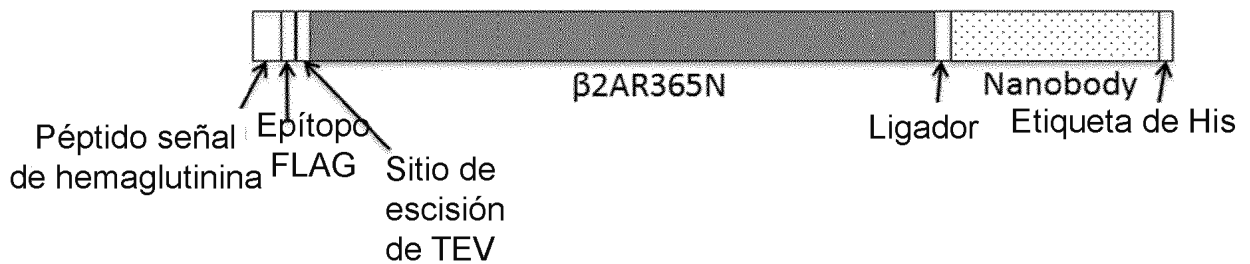


Figura 2B

$\beta 2AR365N$ -Nb80, SEQ ID NO: 1

MKTIIALS~~YIFCLVFADYKDDDDA~~ENLYFQGF~~G~~QPGNGSAFLLAPNRS~~HAPDHDVTQQRD~~
 EVWVVG~~M~~GIVMSLIVLAI~~V~~FGNVLVITAI~~A~~KFERLQ~~T~~VTNYFIT~~S~~LACADLVMGLAVV~~P~~F
 GAAHILMKM~~W~~TFGNFWCFW~~T~~SIDVLCVTASIE~~T~~LCVIAVD~~R~~YFAIT~~S~~PFKYQ~~S~~LLTKNK
 ARVILMVWIVSGL~~T~~SFLPIQ~~M~~HWRATHQEA~~I~~NCYAEETCC~~D~~FFTNQAYAIASSIV~~S~~FY
 VPLVIMV~~F~~VYSRVFQEA~~K~~RQLQKIDKSEGR~~F~~HVQ~~N~~LSQVEQDGR~~T~~GHGLRRSSK~~F~~CLKEH
 KALK~~T~~LGIIMGT~~F~~TLCWLPFFIVNIVHVIQ~~D~~NLIRKEVYIL~~L~~NWIGYVNSGFN~~P~~LIYCRS
 PDFRIAFQ~~E~~LLCLRRSSLKAYGN~~G~~YSSNGNTGEQ~~S~~GGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAG
 GSLRLS~~C~~AA~~S~~GSIFSINTMGWYRQAPGKQ~~R~~ELVAAIHSGGSTNYANSVKGRFTISRDNAA
 NTVYLQ~~M~~NSLKPEDTAVYYCNVKDYGAVLYEYDYWGQGTQ~~V~~TVSSHHHHHH

Figura 2C

$\beta 2AR365N$ -Nb71, SEQ ID NO: 2

MKTIIALS~~YIFCLVFADYKDDDDA~~ENLYFQGF~~G~~QPGNGSAFLLAPNRS~~HAPDHDVTQQRD~~
 EVWVVG~~M~~GIVMSLIVLAI~~V~~FGNVLVITAI~~A~~KFERLQ~~T~~VTNYFIT~~S~~LACADLVMGLAVV~~P~~F
 GAAHILMKM~~W~~TFGNFWCFW~~T~~SIDVLCVTASIE~~T~~LCVIAVD~~R~~YFAIT~~S~~PFKYQ~~S~~LLTKNK
 ARVILMVWIVSGL~~T~~SFLPIQ~~M~~HWRATHQEA~~I~~NCYAEETCC~~D~~FFTNQAYAIASSIV~~S~~FY
 VPLVIMV~~F~~VYSRVFQEA~~K~~RQLQKIDKSEGR~~F~~HVQ~~N~~LSQVEQDGR~~T~~GHGLRRSSK~~F~~CLKEH
 KALK~~T~~LGIIMGT~~F~~TLCWLPFFIVNIVHVIQ~~D~~NLIRKEVYIL~~L~~NWIGYVNSGFN~~P~~LIYCRS
 PDFRIAFQ~~E~~LLCLRRSSLKAYGN~~G~~YSSNGNTGEQ~~S~~GGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQPG
 GSLRLS~~C~~AA~~S~~GF~~F~~SSYELRWYRQAPGKQ~~H~~ELVAGIT~~T~~TGNTYYADSVKGRFTISRDN~~A~~K
 NTVYLQ~~M~~NSNLRPEDTAVYACNANWDL~~L~~SDYWGQGTQ~~V~~TVSSHHHHHH

Figura 2D

β2AR365N-Nb69, SEQ ID NO: 3

MKTIIALS~~YIFCLVFADYKDDDDAENLYFQ~~GFQPGNGSAFLAPNRSHAPDHDVTQQRD
 EVVVVGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFERLQTVTNYFITSACADLVMGLAVVPF
 GAAHILMKMWTFGNFWCEFWT SIDVLCVTASIELTLCVIAVDRIYFAITSPFKYQSLT~~KNK~~
 ARVIILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYAEETCCDFFTNQAYAIASSIVSFY
 VPLVIMVFVYSRVFQEAQRQLQKIDKSEGRFHVQNL~~SQVEQDGR~~TGHGLRRSSKFC~~LKEH~~
 KALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNI~~VHVIQDNLIRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRS~~
 PDFRIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGGGGGGGGSQVQLQESGGGLVQAG
 GSLRLSCTASGLTLSNYAMGWRQAPGKERE~~FVAADTWNGNTYHQDSVKGRFTISR~~DN~~AK~~
 NTVYLQMNLYLKPEDTAVYYCAARGSRRSAYYSSSDYTYRGQGTQVTVSSHHHHHH

Figura 2E

β2AR365N-Nb60, SEQ ID NO: 4

MKTIIALS~~YIFCLVFADYKDDDDAENLYFQ~~GFQPGNGSAFLAPNRSHAPDHDVTQQRDEVVVVGMGIVMSLIVLAI
 FGNVLVITAIKFERLQTVTNYFITSACADLVMGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWT SIDVLCVTASIELTLCVIAV
 DRYFAITSPFKYQSLT~~KNKARVIILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYAEETCCDFFTNQAYAIASSIVSFYVPL~~
 VIMVFVYSRVFQEAQRQLQKIDKSEGRFHVQNL~~SQVEQDGR~~TGHGLRRSSKFC~~LKEH~~KALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNI
 VHVIQDNLIRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGGGGGGGGSQ
 VQLQESGGGLVQAGGSLRLS~~CAASGSIFSLNDMGWYRQAPGK~~RELVA~~AITSGGSTKYADSVKGRFTISR~~DN~~AKNTWLQ~~
 MNSLKAEDTAVYYCNAKVAGTFSIYDYGQGTQVTVSSHHHHHH

Figura 3

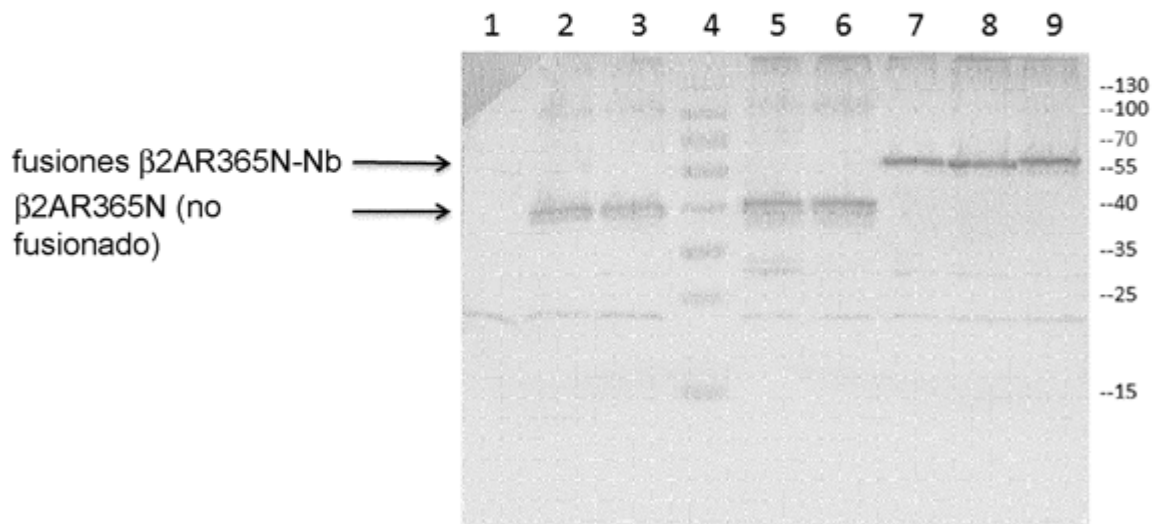


Figura 4A

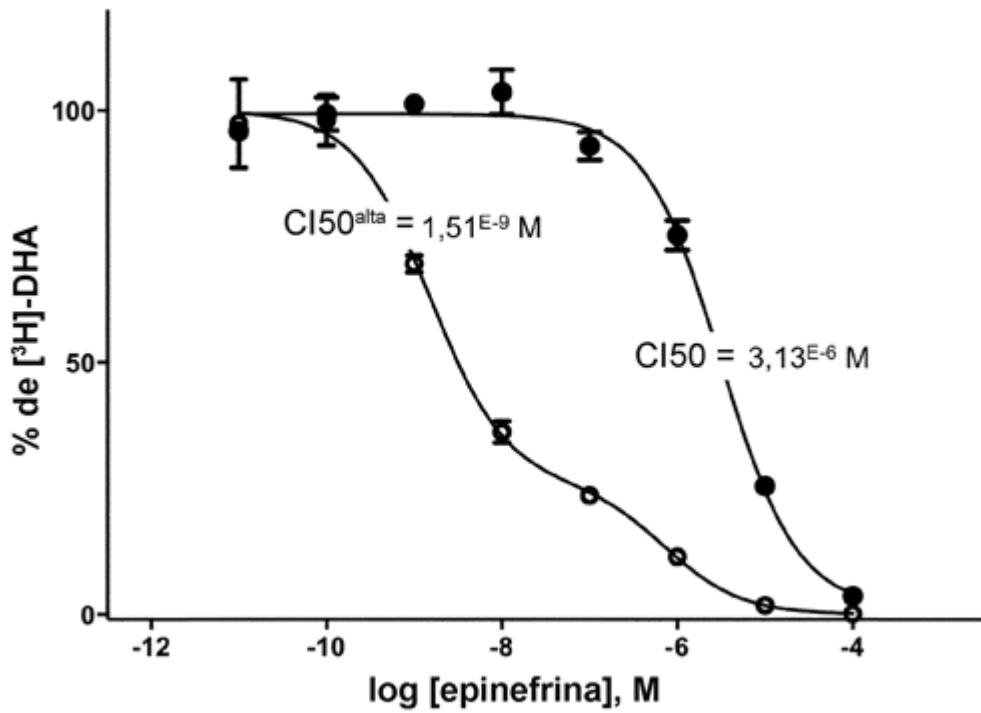


Figura 4B

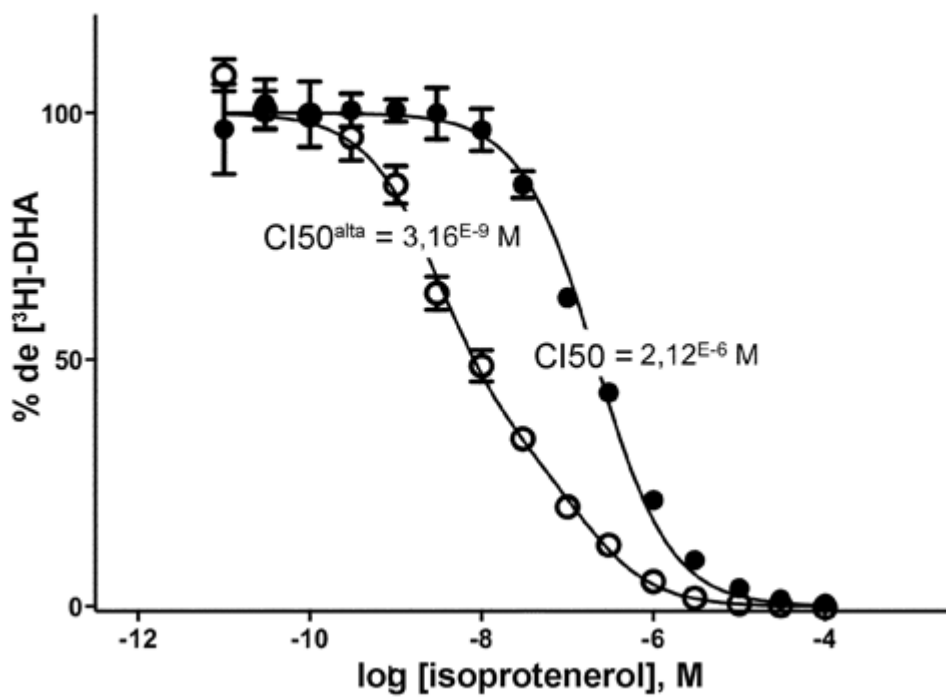


Figura 4C

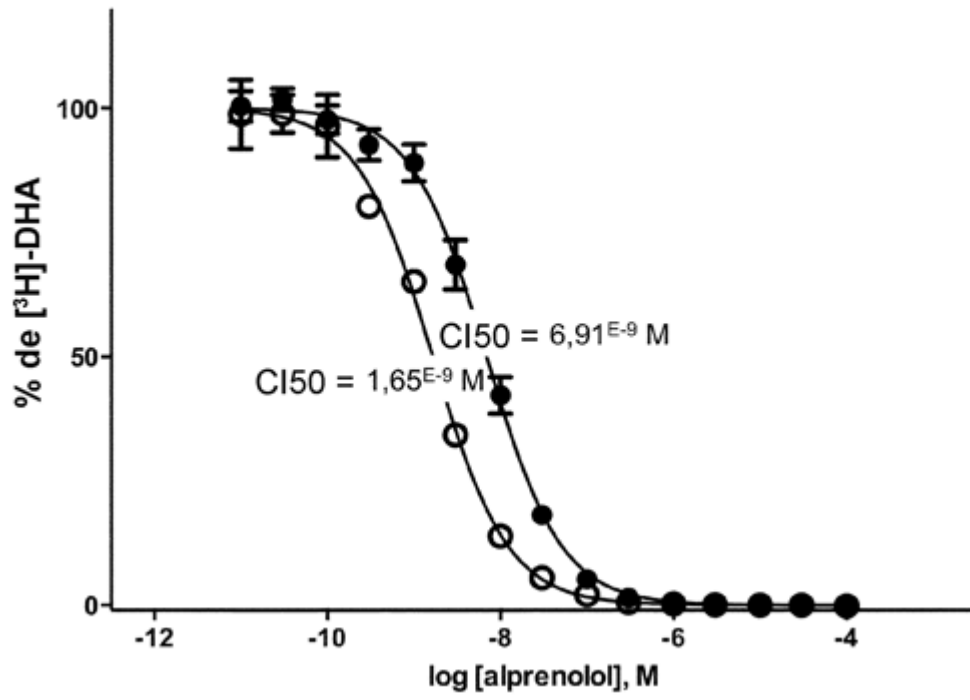


Figura 4D

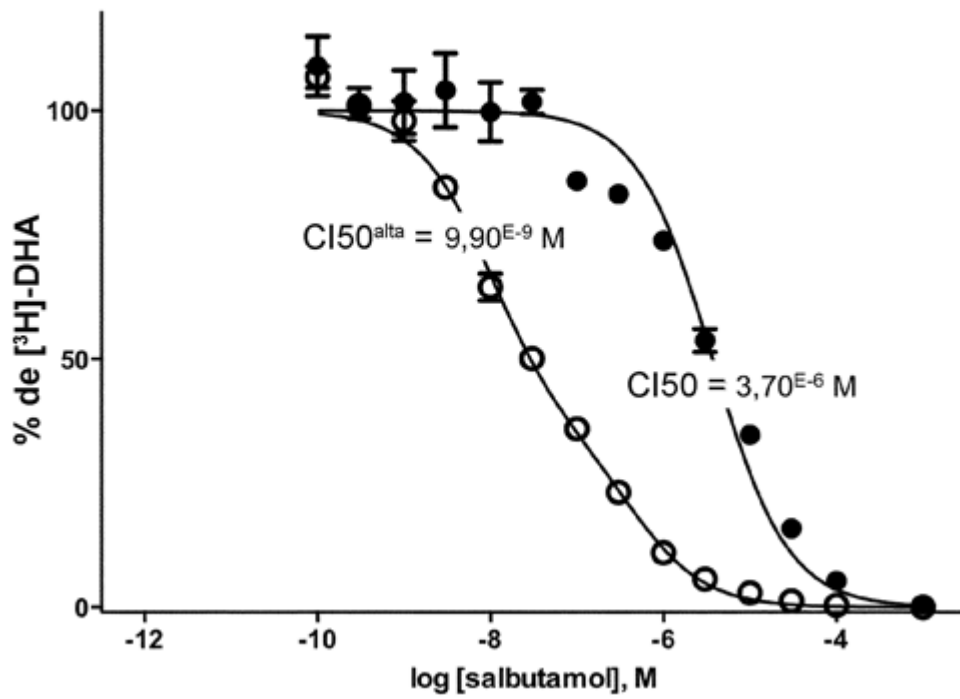


Figura 4E

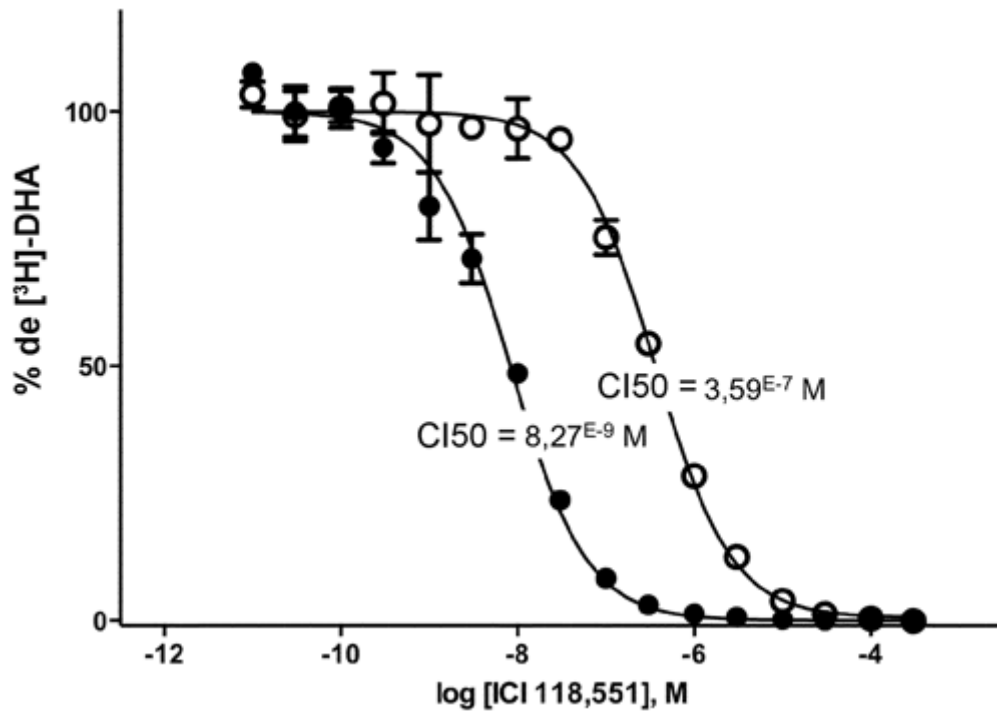


Figura 4F

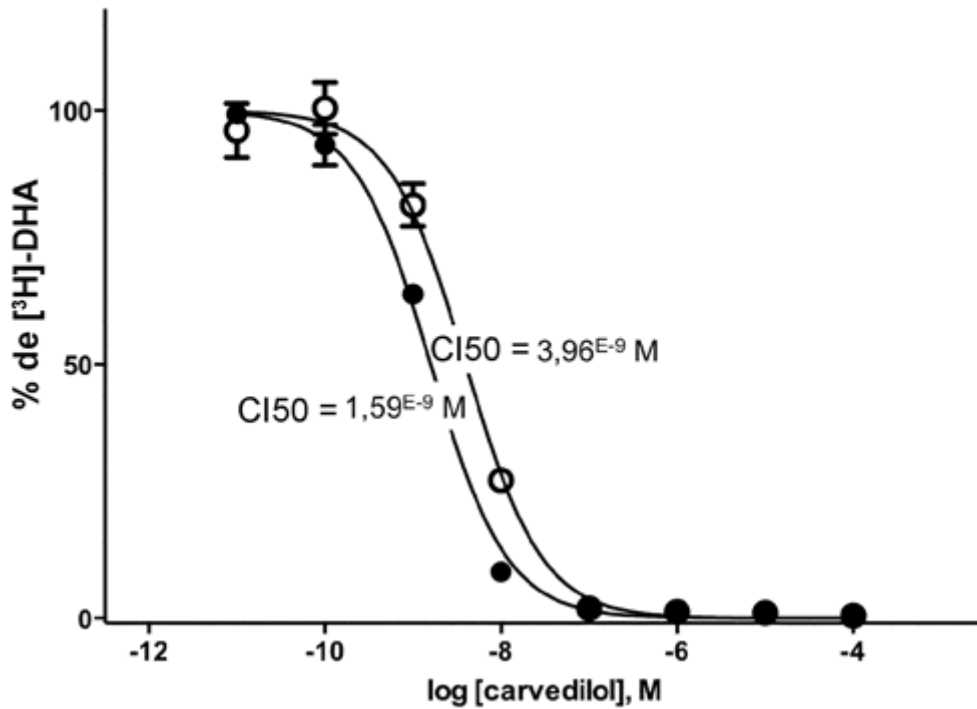


Figura 5A

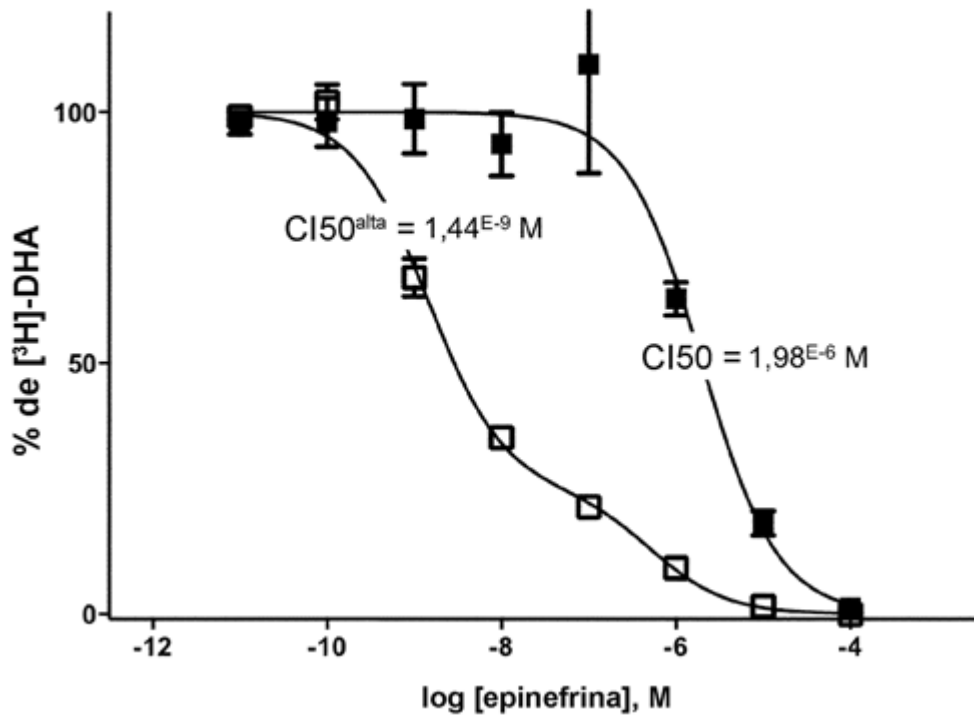


Figura 5B

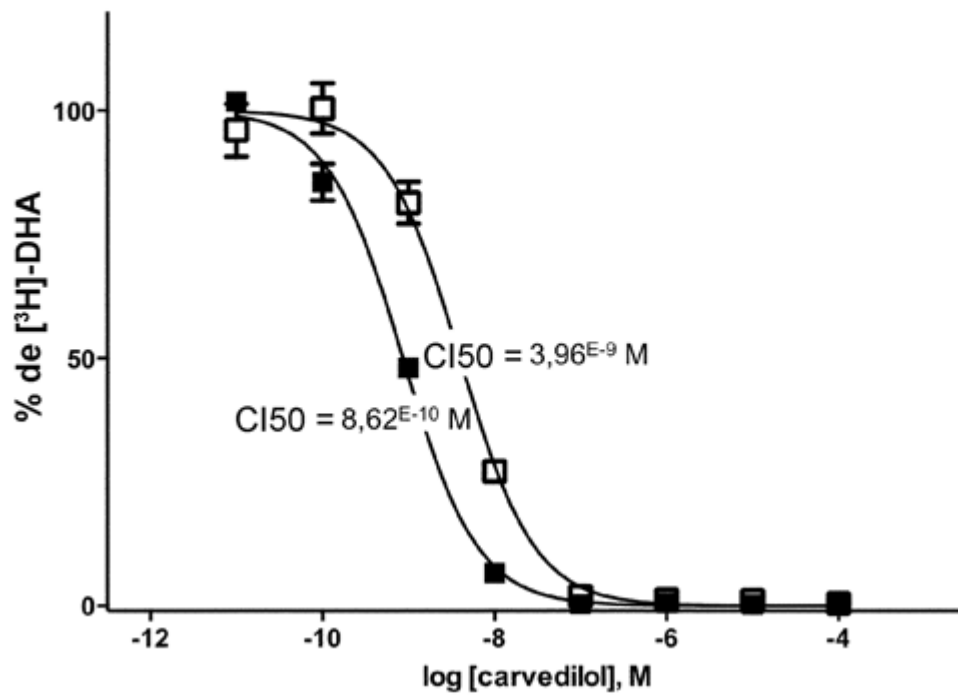


Figura 6A

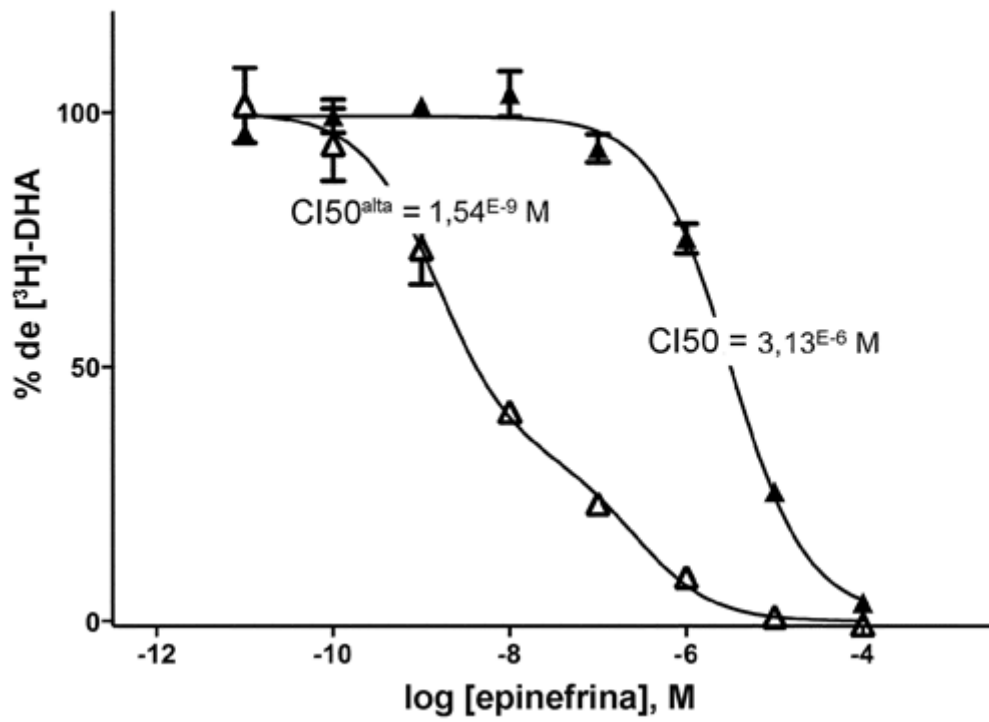


Figura 6B

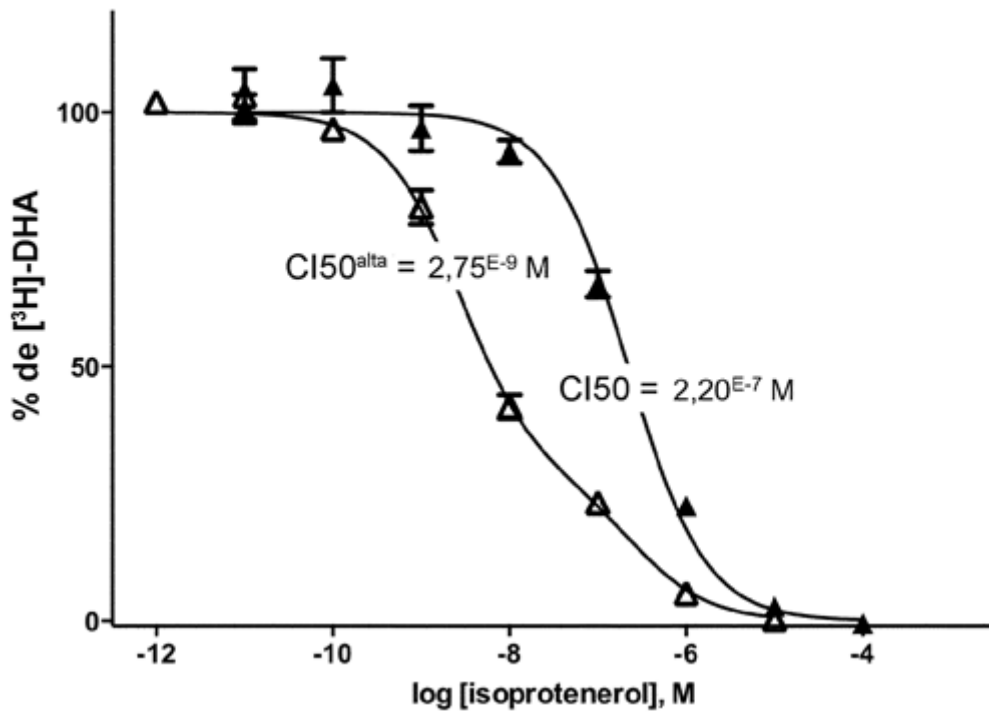


Figura 6C

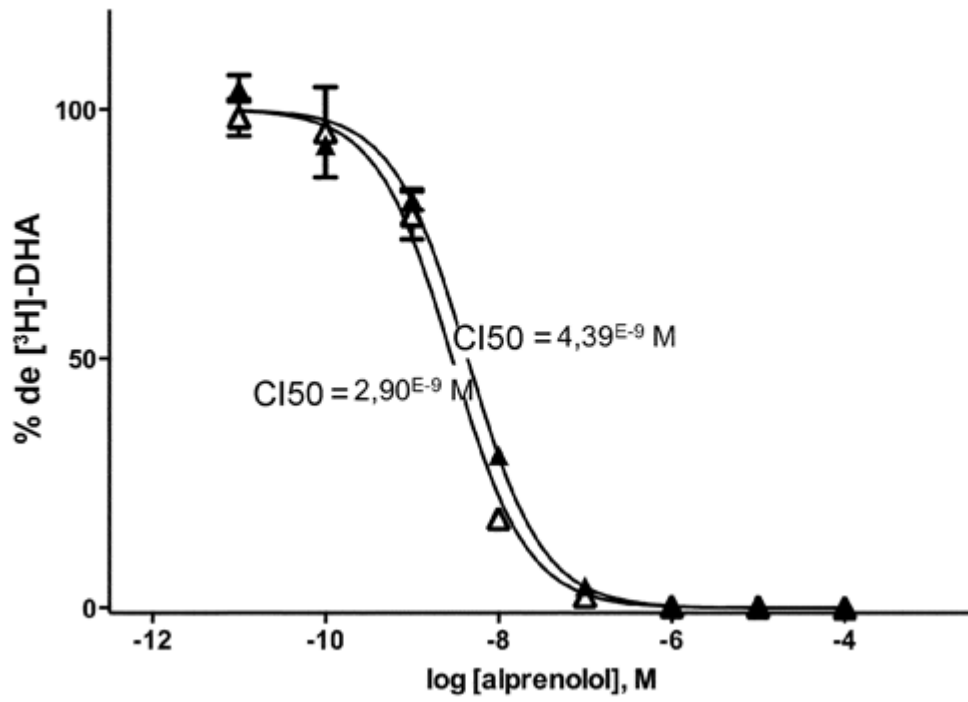


Figura 6D

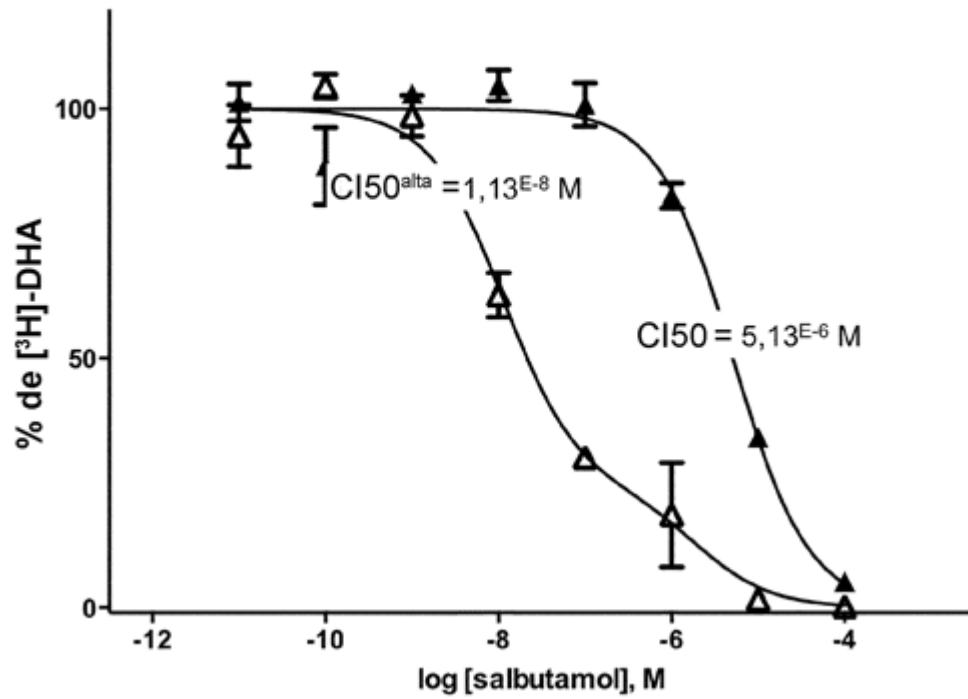


Figura 6E

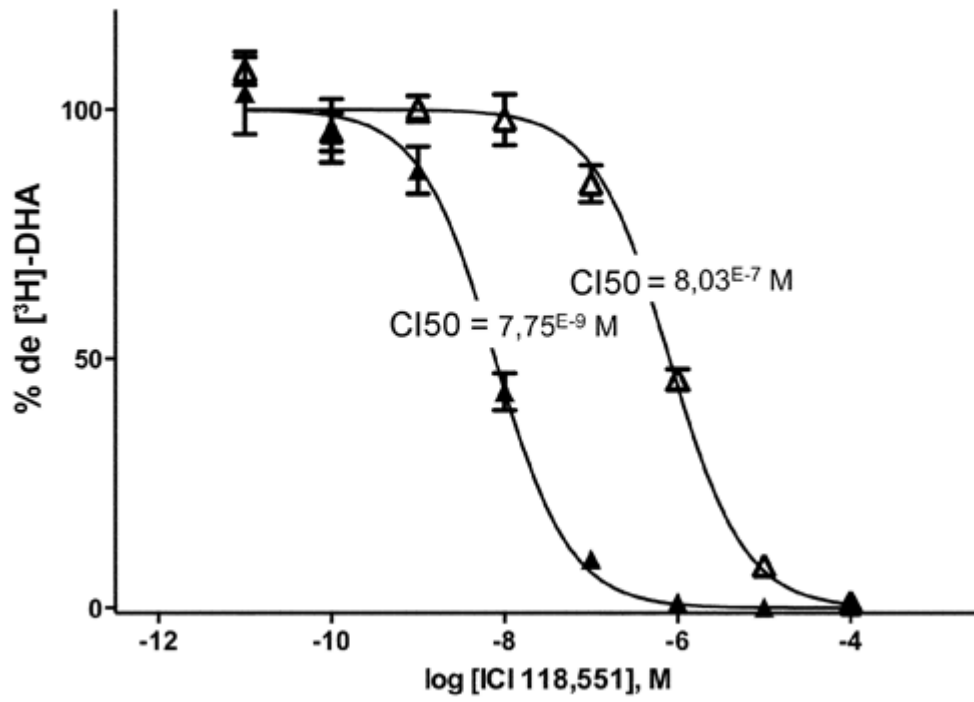


Figura 6F

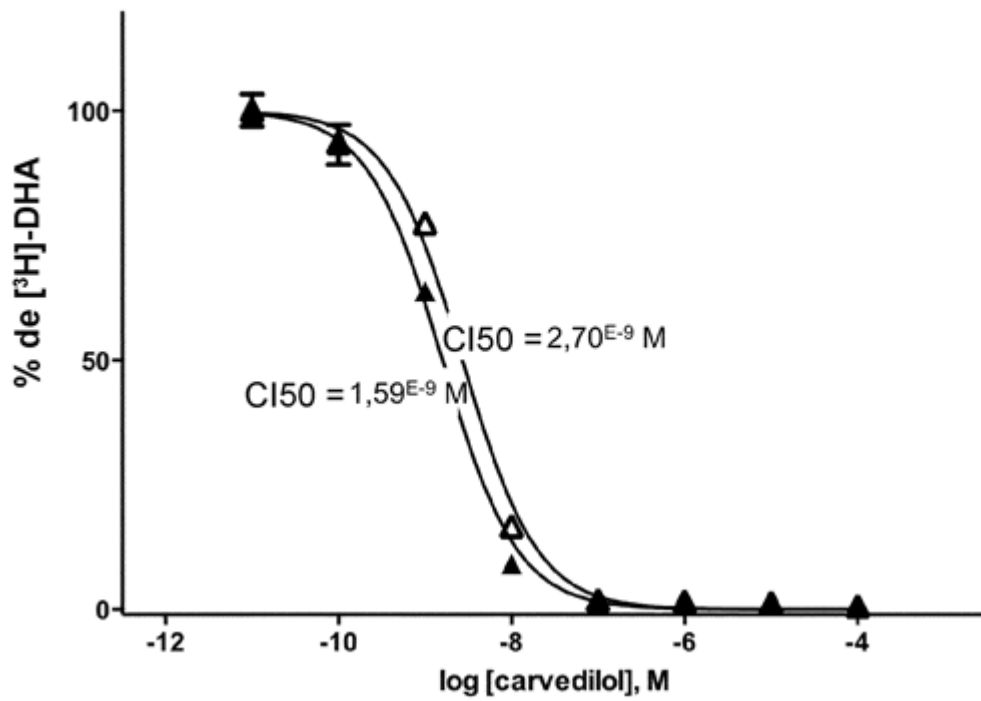


Figura 7

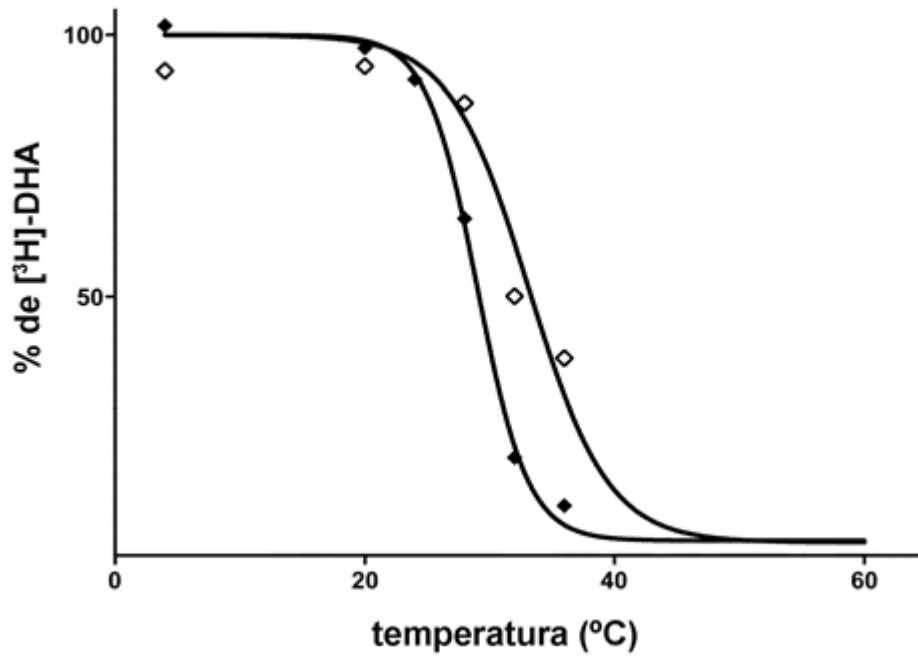


Figura 8

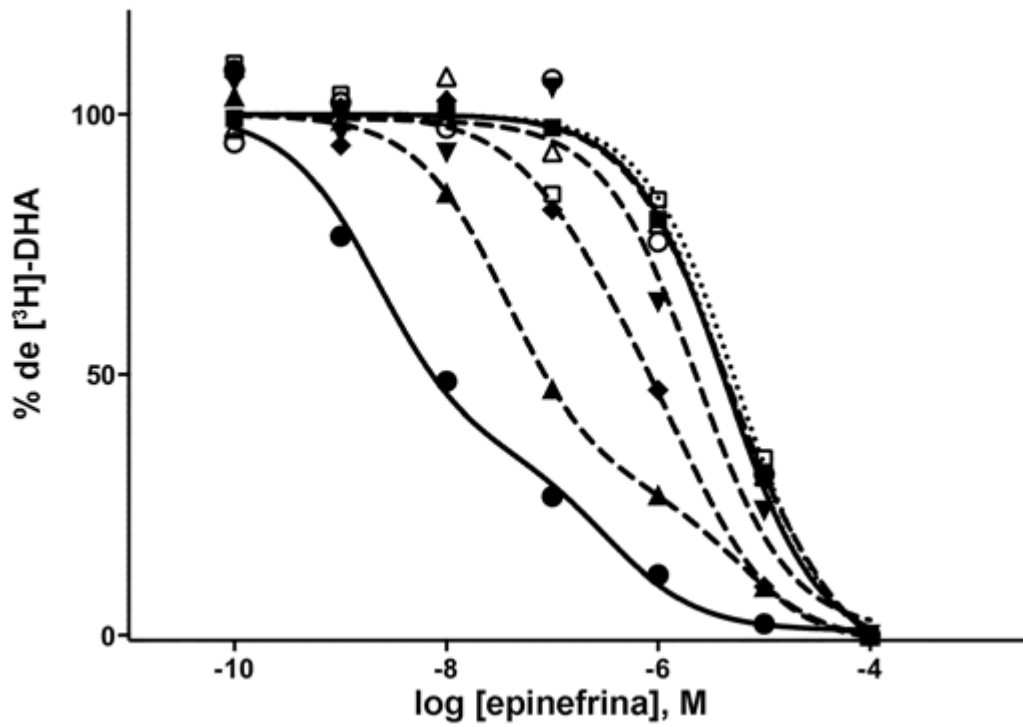


Figura 9A

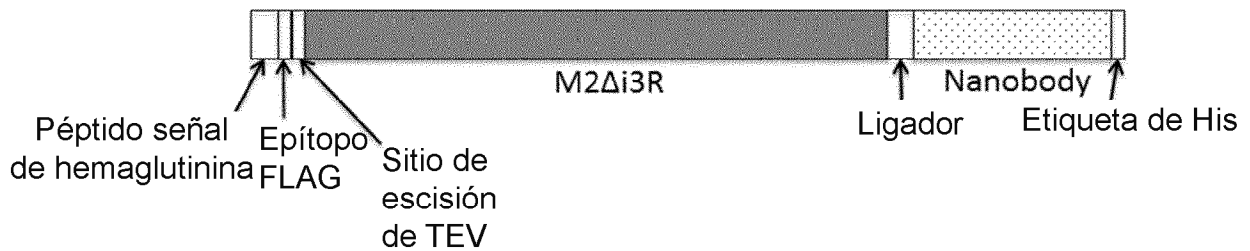


Figura 9B

M2Δi3R, SEQ ID NO: 5

MKTIIALSYIFCLVFAD**DYKDDDD**ENLYFQGMDSDTSSDNSLALTSFYKTFEVVFIIVLVAGSLSLVTIIGNI
 LVMVSIKVNRLQTVNNYFLFSLACADLIIGVFSMNLYTLYTVIGYWPLGPPVCDLWLALDYVVSNASVMNL
 LIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVLSFILWAPAILFWQFIVGVRTVEDGECYIQFFSNAAV
 TFGTAIAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKSRIKKDKKEPVANQDPVSTRKKPPPSREKKVTRTILAILLAFII
 TWAPYNVMVLINTFCAPCI PNTVWTIGYWLCYINSTINPACYALCNATEFKKTFKLLMCHYKNIGATR

Figura 9C

M2Δi3R-Nb9-1, SEQ ID NO: 6

MKTIIALSYIFCLVFAD**DYKDDDD**ENLYFQGMDSDTSSDNSLALTSFYKTFEVVFIIVLVAGSLSLVTIIGNI
 LVMVSIKVNRLQTVNNYFLFSLACADLIIGVFSMNLYTLYTVIGYWPLGPPVCDLWLALDYVVSNASVMNL
 LIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVLSFILWAPAILFWQFIVGVRTVEDGECYIQFFSNAAV
 TFGTAIAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKSRIKKDKKEPVANQDPVSTRKKPPPSREKKVTRTILAILLAFII
 TWAPYNVMVLINTFCAPCI PNTVWTIGYWLCYINSTINPACYALCNATEFKKTFKLLMCHYKNIGATF**GGGS**
GGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGHTFSSARMYWVRQAPGKEREFVAAI SR
 SGFTYSADSVKGRFTISRDIANNTVYLQMNLSLQPEDTAIYTCYAAYLDEFYNDYTHYWGLGTQVTVSSHHHH
HH

Figura 10A

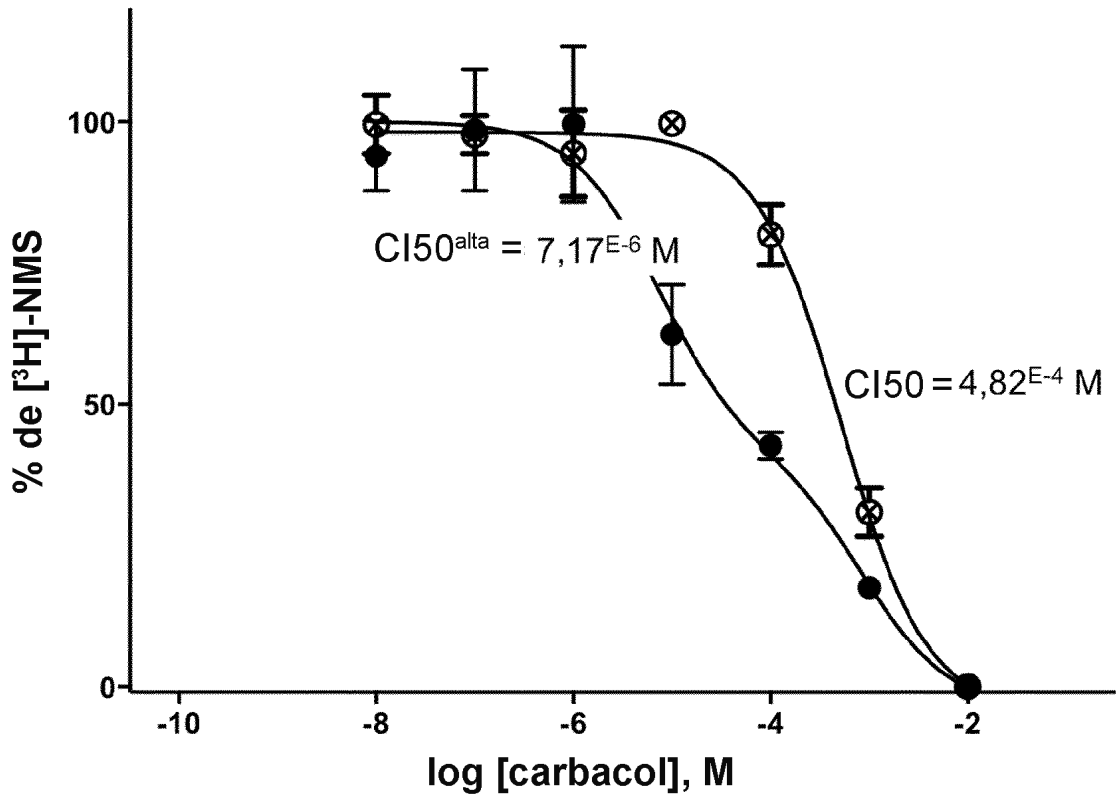


Figura 10B

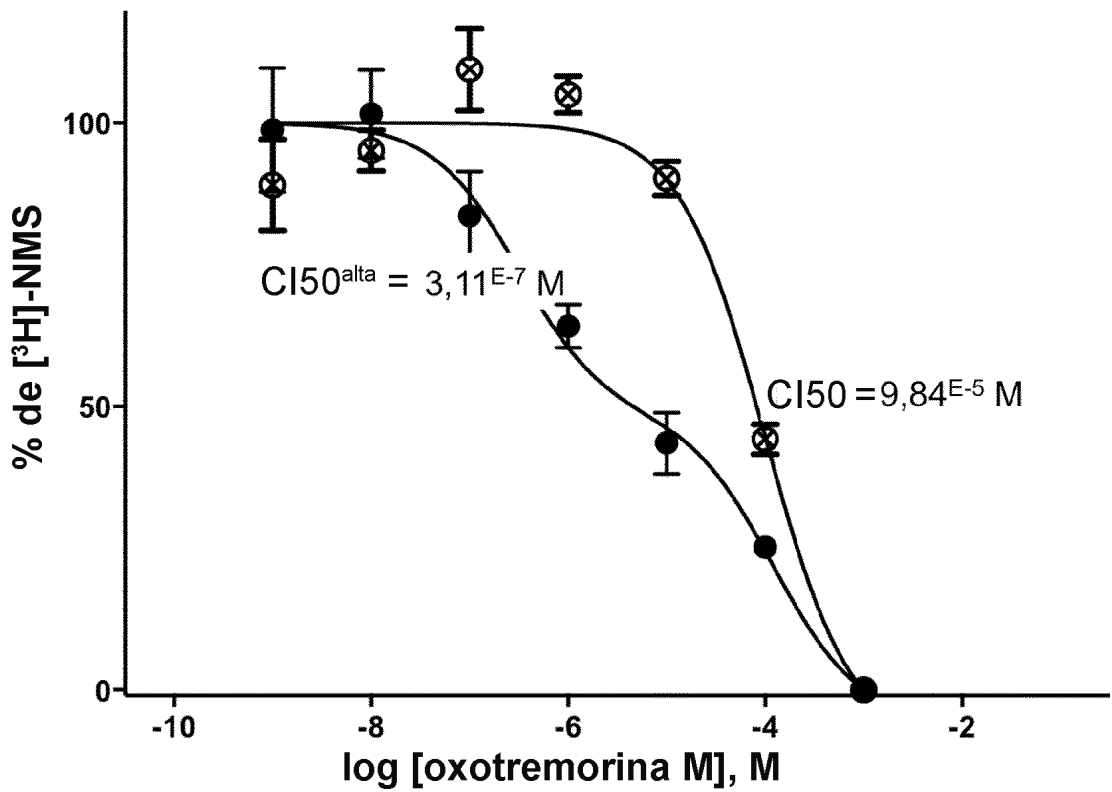


Figura 11A

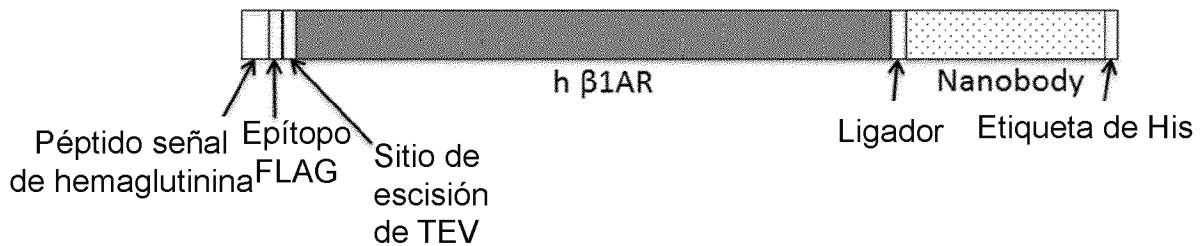


Figura 11B

hβ1AR-Nb80, SEQ ID NO: 7

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAENLYFQGPEPLSQQWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAIAKTPRLQTLTNLFIMSL
 ASADLVMGLLVVPGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIELCVIALDRYLAI TSPFRYQSLLTRARARGLVCTV
 WAISALVSFLPILMHWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIMAFVYLRFREAQKQVKKIDRAG
 KRRPSRLVALKEQKALKTLGIIMGVFTLCWLPPFLANVVKAFHRELVPDRLFVFFNWLG YANS AFNPIICRSPDFRKAFQR
 LLSARRAARRRGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGSIFSINTMGWYRQA
 PGKQRELVAAIHSGGSTNYANSVKGRFTISRDNAA NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVKDYGAVLYEYDYGQGTQVTV
 SSHHHHHH

Figura 11C

hβ1AR-Nb69, SEQ ID NO: 8

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAENLYFQGPEPLSQQWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAIAKTPRLQTLTNLFIMSL
 ASADLVMGLLVVPGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIELCVIALDRYLAI TSPFRYQSLLTRARARGLVCTV
 WAISALVSFLPILMHWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIMAFVYLRFREAQKQVKKIDRAG
 KRRPSRLVALKEQKALKTLGIIMGVFTLCWLPPFLANVVKAFHRELVPDRLFVFFNWLG YANS AFNPIICRSPDFRKAFQR
 LLSARRAARRRGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CTASGLTLSNYAMGWRQA
 PGKERE FVAADTWNGNTYHQDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNYLKPEDTAVYYCAARGSRRSAYSSSDYTYRGQGT
 QTVSSHHHHHH

Figura 12A

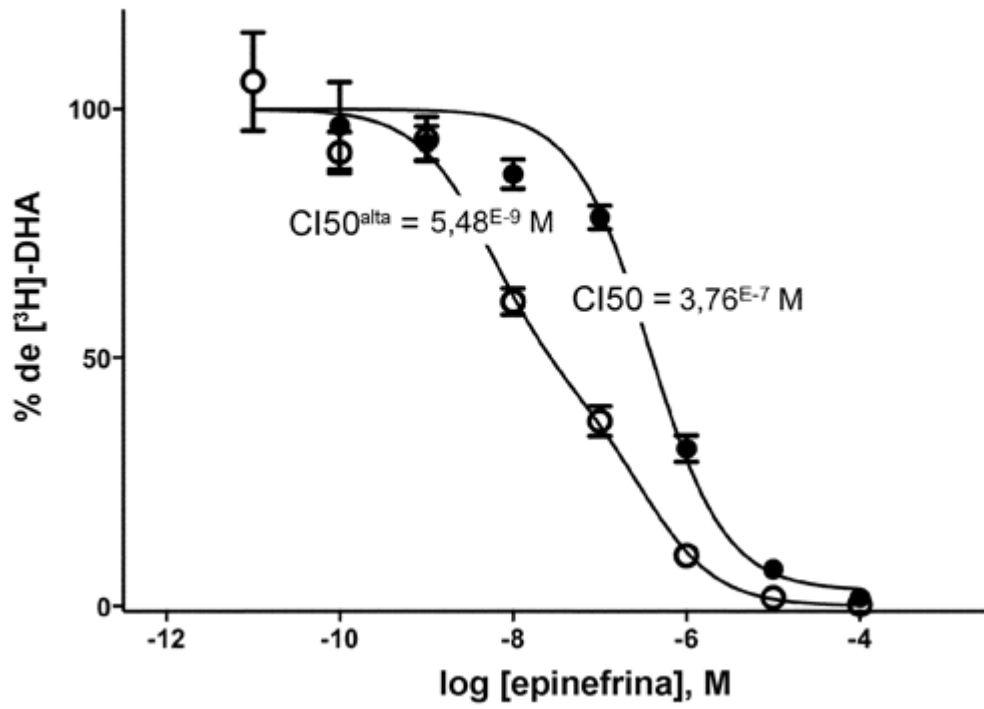


Figura 12B

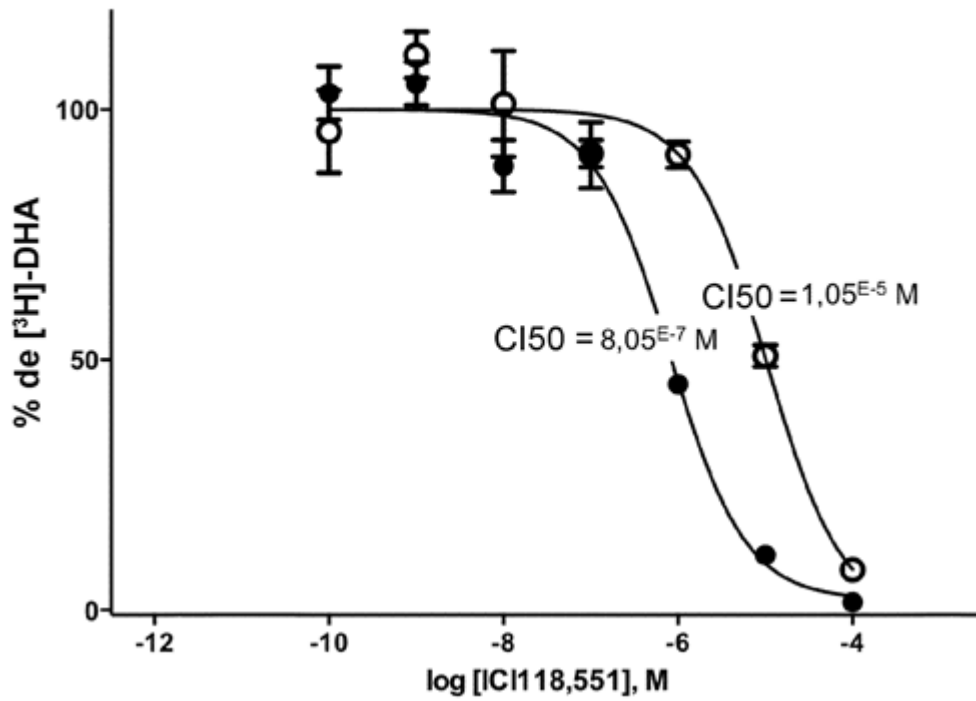


Figura 12C

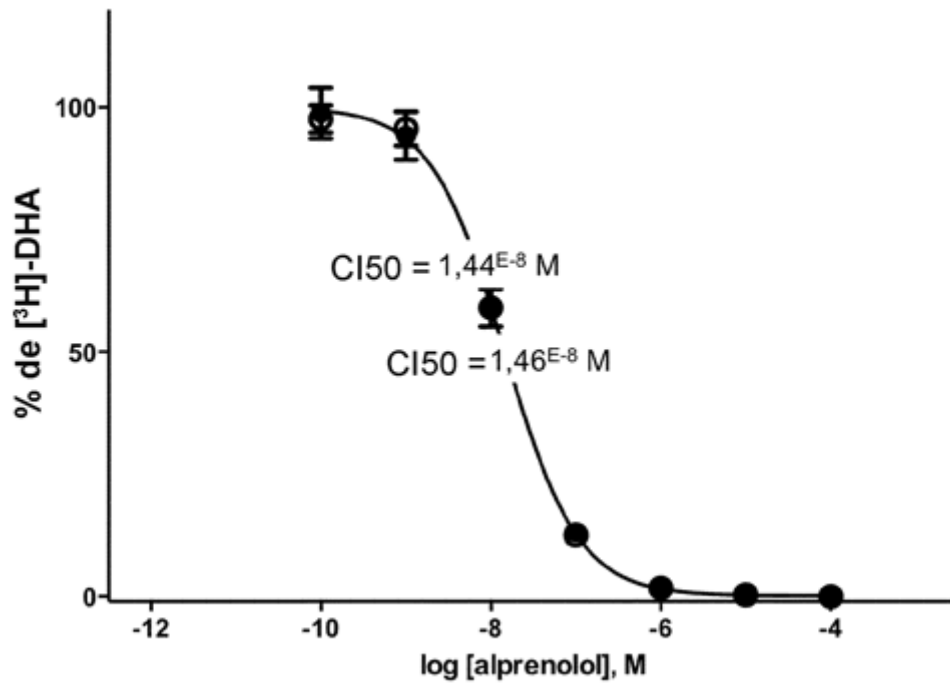


Figura 13A

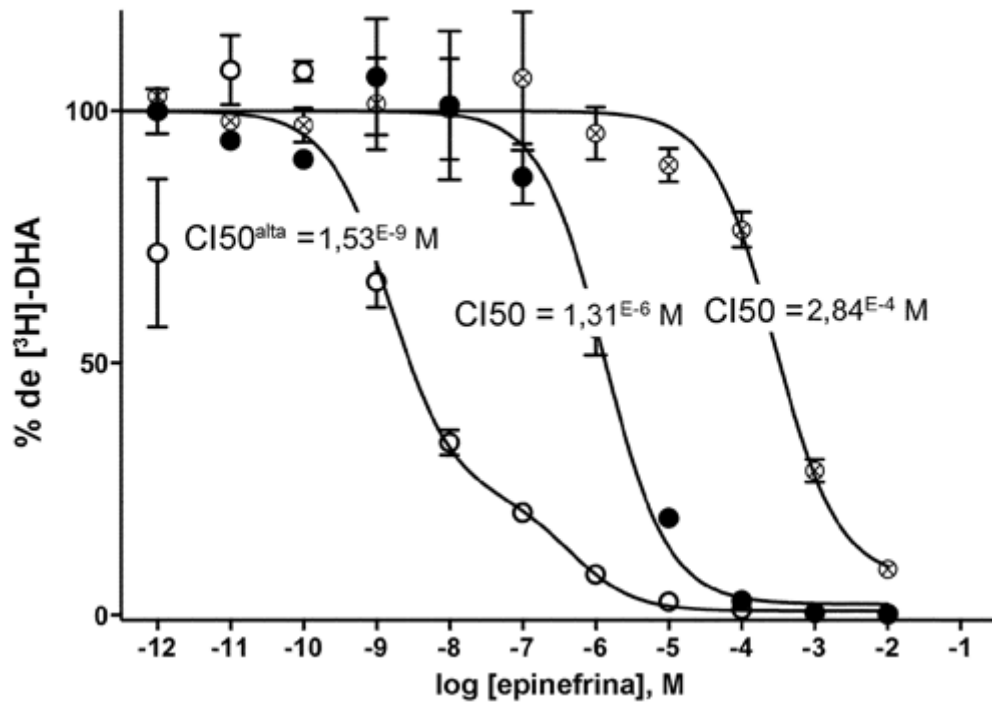


Figura 13B

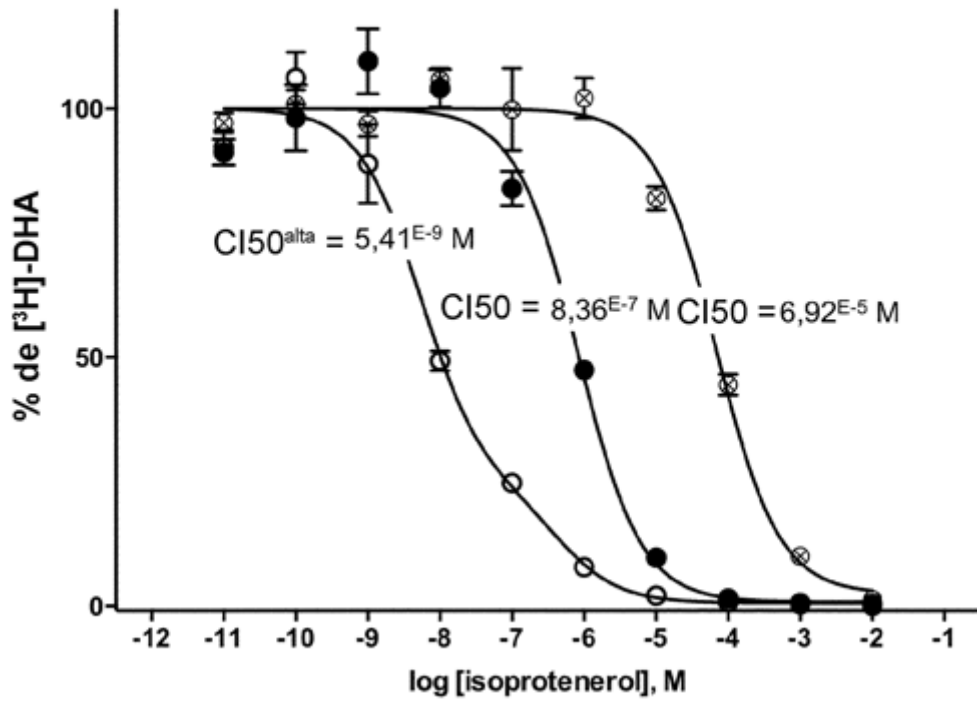


Figura 13C

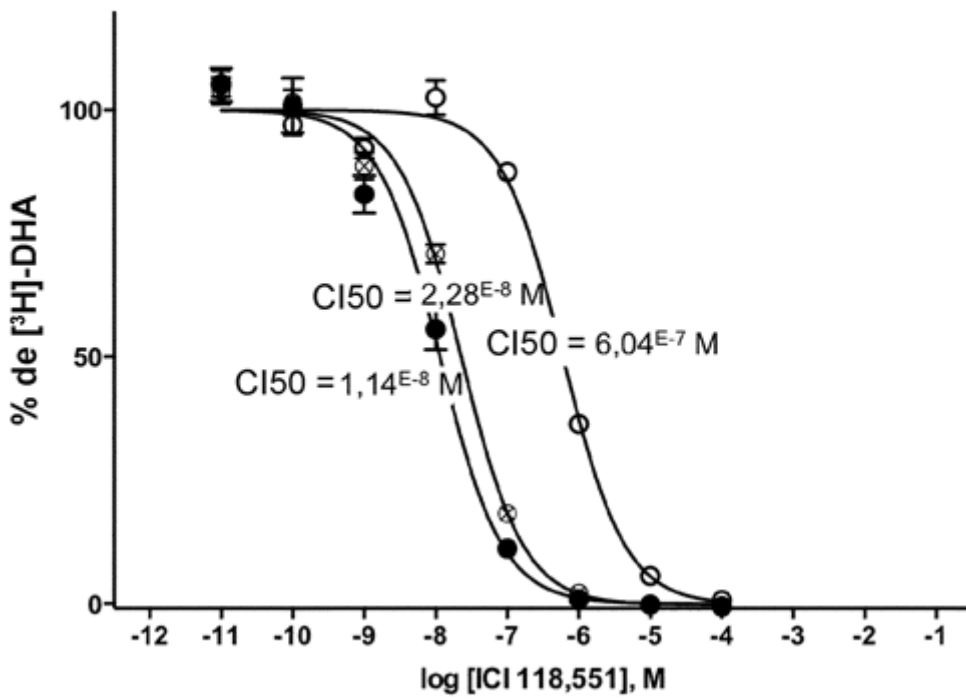


Figura 14

```

P42866| RATÓN MSSAAGPGNISDCSDPLAPASCSP--APGSWLNLSHVDGNQSDPCGPNRTGIGGSHSLCP 58
P35372|HUMANO MSSAAAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNLSHLDGNLSDPCGPNRTDLGGRDSLCP 60
*****.* * :*: * * :***** :*****:*****:***** ***** * * * .*****

                                ICL1
P42866| RATÓN QIGSPSMVTAITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALAT 118
P35372|HUMANO PTGSPSMTAITITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALAT 120
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

                                ICL2
P42866| RATÓN STLFPQSVNYLMGTWPFGNILCKIVISIDYNNMFTSIFLCTMSVDRYLAVCHPVKALDF 178
P35372|HUMANO STLFPQSVNYLMGTWPFGNILCKIVISIDYNNMFTSIFLCTMSVDRYLAVCHPVKALDF 180
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

P42866| RATÓN RTPRNAKIINVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSHPWYWENLLKICVFI 238
P35372|HUMANO RTPRNAKIINVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSHPWYWENLLKICVFI 240
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

                                ICL3
P42866| RATÓN FAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRIRITRMVLVVAVFIVCWTPPIHI 298
P35372|HUMANO FAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRIRITRMVLVVAVFIVCWTPPIHI 300
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

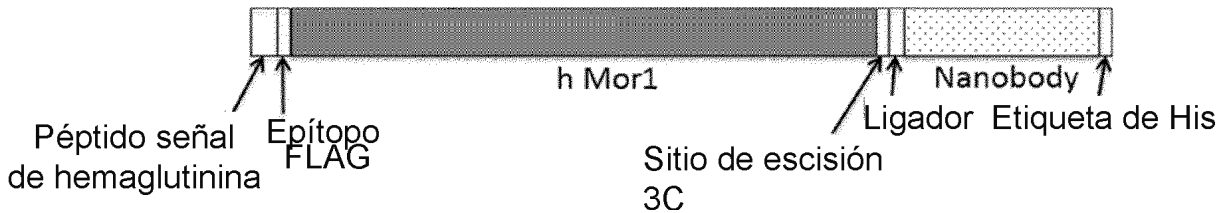
                                Extremo C-term.
P42866| RATÓN YVLIKALITIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCRFREFCIPSSNI 358
P35372|HUMANO YVLIKALVTIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCRFREFCIPSSNI 360
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

P42866| RATÓN RCNCRIRONCRHPCSTANTVDRENHOLENLEAETAPLD 398
P35372|HUMANO RCNCRIRONCRHPCSTANTVDRENHOLENLEAETAPLD 400
*****.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****

```

Figura 15

A



B

hMor1-34GS-Nb33, SEQ ID NO: 9

```

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAMAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNLSHLDGN
LSDPCGPNRTDLGGRDSLCPPTGSPSMITAITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKM
KTATNIYIFNLALADALATSTLFPQSVNYLMGTWPFGTILCKIVISIDYNNMFTSIFTLCTMS
VDRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIINVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSH
PTWYWENLLKICVFI FAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRIRITRMVLV
VVAVFIVCWTPPIHIYVLIKALVTIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCF
REFCIPSSNILEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
ESGGGLVRPGSRRLSCVDSERTSYPMGWFRRAPGKEREFVASITWSGIDPTYADSVADR
FTISRDVANNLTYLQMNLSKHEDTAVVYCAARAPVGQSSSPYDYDYWGQGTQVTVSSH
HHHHH*

```

C

hMor1-34GS-Nb10, SEQ ID NO: 10

```

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAMAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNLSHLDGN
LSDPCGPNRTDLGGRDSLCPPTGSPSMITAITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKM
KTATNIYIFNLALADALATSTLFPQSVNYLMGTWPFGTILCKIVISIDYNNMFTSIFTLCTMS
VDRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIINVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSH

```

PTWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITRMVLV
VVAVFIVCWTPIIHYVIIKALVTIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCF
REFCIPTSSNILEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFRSIVSMAWYRQAPGKQRELVASSNSGGSTNYADSVK
GRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYWCNVQNRLPGFDAFSGRSIAETYWGQGTQV
TVSSHHHHH*

D

mMor1-34GS-Nb33, SEQ ID NO: 11

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAMGPGNISDCSDPLAPASCSPAPGSWLNLSHVDGNQS
DPCGPNRTGLGGSHSLCPQTGSPSMVTAITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMK
TATNIYIFNLALADALATSTLFPQSVNYLMGTWPFGNILCKIVISIDYYNMFTSIFTLCTMS
VDRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIVNVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSH
PTWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITRMVLV
VVAVFIVCWTPIIHYVIIKALITIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCF
REFCIPTSSNILEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ
ESGGGLVRPGGSRRLSCVDSERTSYPMGWFRRAPGKEREFVASITWSGIDPTYADSVADR
FTISRDVANNTLYLQMNSLKHEDTAVYYCAARAPVGQSSSPYDYDYWGQGTQVTVSSH
HHHHH*

E

mMor1-34GS-Nb10, SEQ ID NO: 12

MKTIIALSYIFCLVFADYKDDDDAMGPGNISDCSDPLAPASCSPAPGSWLNLSHVDGNQS
DPCGPNRTGLGGSHSLCPQTGSPSMVTAITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMK
TATNIYIFNLALADALATSTLFPQSVNYLMGTWPFGNILCKIVISIDYYNMFTSIFTLCTMS
VDRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIVNVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSH
PTWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITRMVLV
VVAVFIVCWTPIIHYVIIKALITIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCF
REFCIPTSSNILEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFRSIVSMAWYRQAPGKQRELVASSNSGGSTNYADSVK
GRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYWCNVQNRLPGFDAFSGRSIAETYWGQGTQV
TVSSHHHHH*

Figura 16

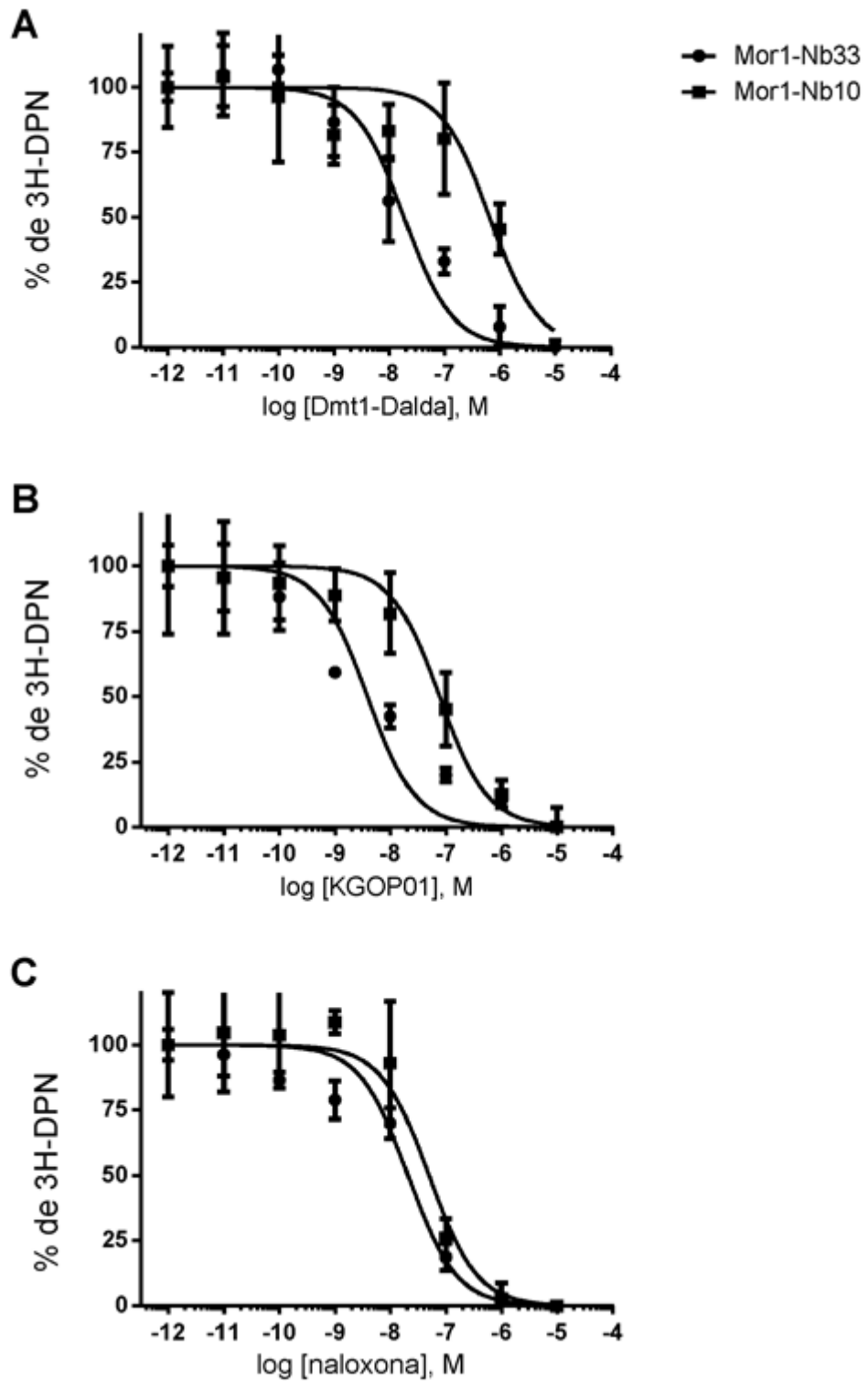


Figura 17

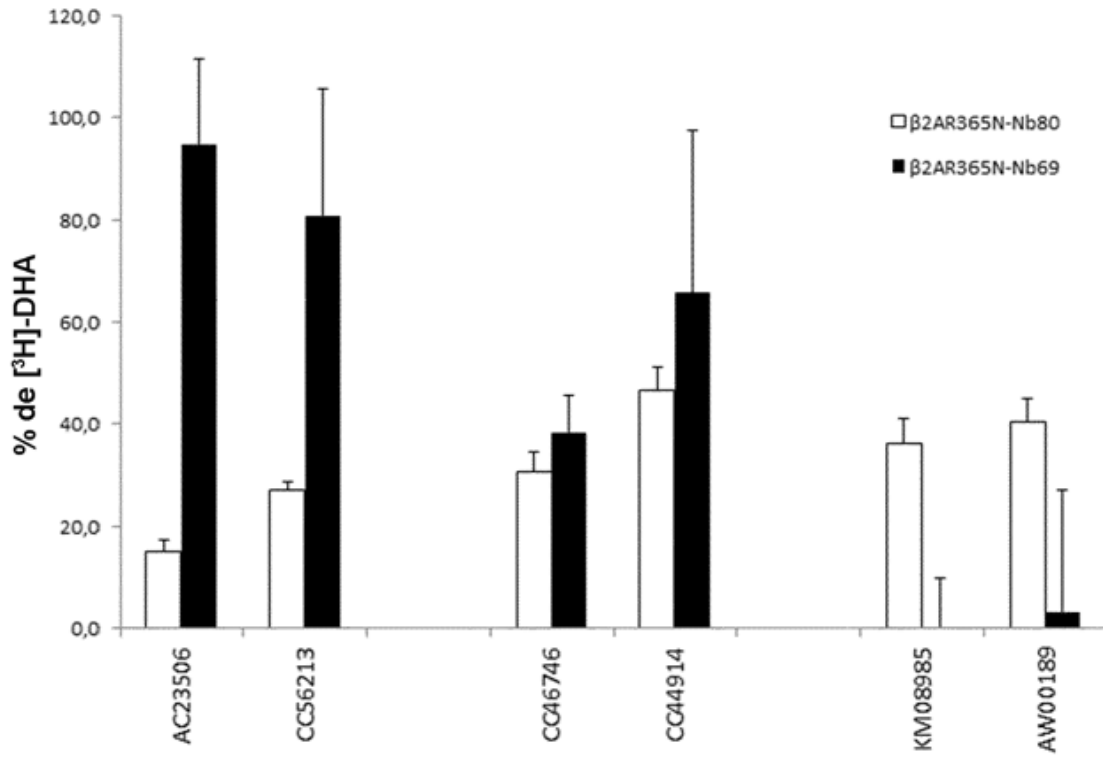


Figura 18A

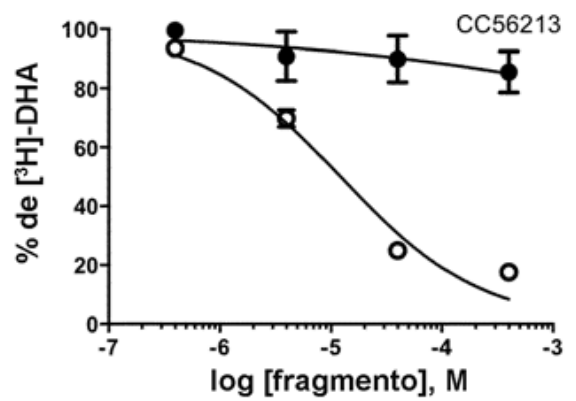
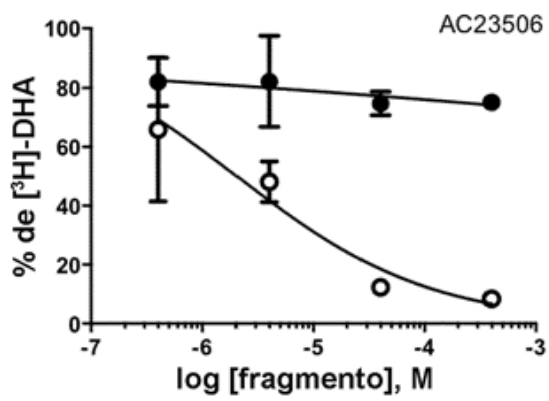


Figura 18B

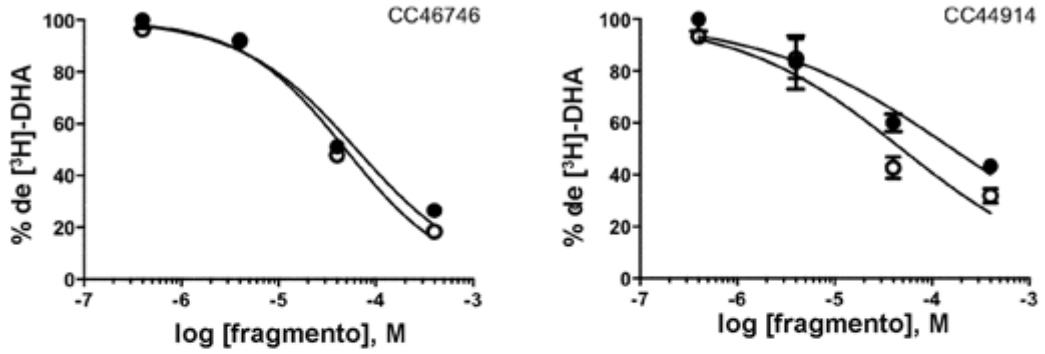


Figura 18C

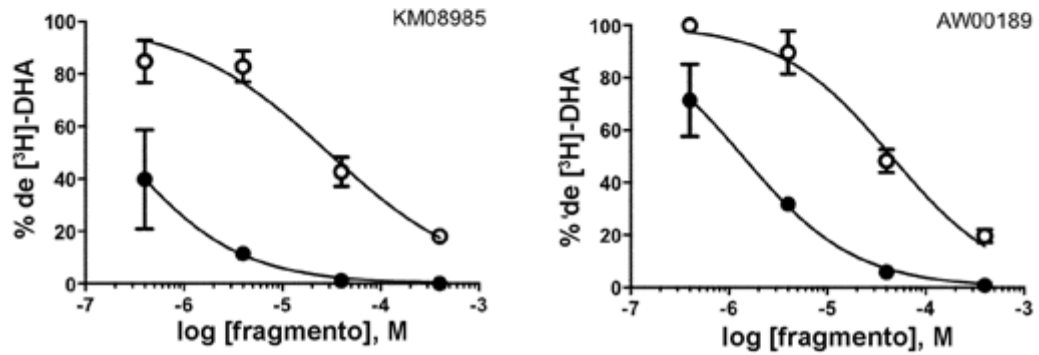


Figura 19

