

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 372**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2012** **PCT/EP2012/062036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012** **WO12175643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012** **E 12730478 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2723764**

54 Título: **Dominios de unión dirigidos contra complejos GPCR:proteína G y usos derivados de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2011 US 201161571159 P

15.09.2011 EP 11181357

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

06.04.2018

73 Titular/es:

VIB VZW (25.0%)

Rijvisschestraat 120

9052 Gent, BE;

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (25.0%);

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND

STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (25.0%) y

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF

MICHIGAN (25.0%)

72 Inventor/es:

STEYAERT, JAN;

PARDON, ELS;

LAEREMANS, TOON;

KOBILKA, BRIAN;

RASMUSSEN, SØREN;

GRANIER, SÉBASTIEN y

SUNAHARA, ROGER, K.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 662 372 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dominios de unión dirigidos contra complejos GPCR:proteína G y usos derivados de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología estructural y la señalización del receptor acoplado a proteínas G (GPCR). En particular, la presente invención se refiere a Nanobodies dirigidos contra y/o que se unen específicamente a complejos GPCR:proteína G, en particular Nanobodies que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma. También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican para tales Nanobodies y células que expresan o pueden expresar tales Nanobodies. Los Nanobodies de la presente invención pueden usarse como herramientas universales para la caracterización estructural y funcional de receptores acoplados a proteínas G en complejo con proteínas G posteriores y unidos a diversos ligandos naturales o sintéticos, para investigar las características dinámicas de la activación de proteínas G, así como para el examen y los esfuerzos realizados en el descubrimiento de fármacos que hacen uso de complejos GPCR:proteína G.

Antecedentes

Los receptores de siete dominios transmembrana (7TMR), también denominados receptores acoplados a proteínas G (GPCR), son la clase más grande de receptores en el genoma humano y son la clase de proteínas seleccionada como diana con más frecuencia por agentes terapéuticos farmacéuticos. Se ha realizado un avance sustancial a lo largo de las tres últimas décadas en la comprensión de diversos GPCR, desde la farmacología hasta la caracterización funcional *in vivo*. Recientes estudios estructurales de alta resolución han proporcionado conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la activación y la actividad constitutiva de los GPCR (por ejemplo Rasmussen *et al.* 2011). Sin embargo, todavía no se poseen los detalles moleculares de cómo los GPCR interactúan con y regulan la actividad de sus dianas posteriores. Las estructuras de los GPCR en complejo con sus proteínas posteriores son de gran interés, no sólo porque estas interacciones son farmacológicamente relevantes, sino también porque la comprensión atómica de las interacciones intermoleculares es clave para descubrir los secretos de la selectividad funcional, la capacidad de los diferentes agonistas para forzar distintos efectos posteriores a partir de un solo tipo de receptor. Recientes datos estructurales apoyan la idea de que los GPCR, pese a su pequeño tamaño, son máquinas alostéricas sofisticadas con múltiples salidas de señalización.

Los GPCR, una vez activados, transmiten sus señales de una manera dependiente de GTP a través de un complejo de tres proteínas conocido como proteínas G heterotriméricas, o $G_{\alpha\beta\gamma}$. La unión de ligandos extracelulares a GPCR modula su capacidad para catalizar el intercambio de GDP-GTP en $G_{\alpha\beta\gamma}$, regulando de ese modo el nivel intracelular de los mensajeros secundarios. El heterotrímero $G_{\alpha\beta\gamma}$ inactivo está compuesto por dos elementos principales, $G_{\alpha}\cdot\text{GDP}$ y el heterodímero $G_{\beta\gamma}$. $G_{\beta\gamma}$ secuestra el elemento *switch II* (interruptor II) en G_{α} de manera que no puede interactuar con sistemas de segundos mensajeros, tales como los que implican AMPc, diacilglicerol y calcio. Los GPCR activados catalizan la liberación de GDP de G_{α} , permitiendo que el GTP se una a y libere la subunidad $G_{\alpha}\cdot\text{GTP}$ activada. En este estado, *switch II* forma una hélice estabilizada por el fosfato γ del GTP permitiendo que interactúe con efectores tales como adenilil ciclase. Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo las subunidades G_{α} interactúan con y regulan la actividad de sus dianas posteriores, no está claro cómo los GPCR activados inician este proceso catalizando el intercambio de nucleótidos en $G_{\alpha\beta\gamma}$.

Los esfuerzos realizados en el descubrimiento de fármacos generalmente se centran en ligandos de molécula pequeña que se unen competitivamente a un sitio catalítico o activo particular, usando modelos estáticos de la diana como punto de partida. Este método ha identificado y validado una multitud de agentes terapéuticos de sitio activo viables en uso actualmente. Sin embargo, tal como refleja la alta tasa de fracaso de nuevos compuestos farmacológicos (sólo un 8% estimado de los agentes terapéuticos clínicos de fase I obtienen finalmente la aprobación de la Food and Drug Administration, con un coste según un cálculo conservador de 800 millones de dólares por fármaco), muchos esfuerzos son infructuosos y a menudo las dianas se abandonan una vez que se considera que no son farmacoconvertibles (Lee & Craik, 2009). Una parte considerable de estos fracasos se debe al hecho de que la mayor parte de la conformación prominente de la diana en cuestión no corresponde a la conformación que puede unirse a la que debe unirse un fármaco para ser eficaz para la indicación terapéutica. Por ejemplo, los esfuerzos para obtener una estructura de GPCR en estado activo unido a agonista han resultado ser difíciles debido a la inestabilidad inherente de este estado en ausencia de una proteína G. Recientemente pudieron obtenerse estructuras de un estado activo de un GPCR, haciendo uso de Nanobodies o Xaperones® de estabilización conformacionalmente selectiva que imitan a las proteínas G y aumentan la afinidad por agonistas en el sitio ortostérico (Rasmussen *et al.* 2011). Esto demuestra el poder de Xaperones® para bloquear la estructura de las dianas farmacológicas que más dificultades presentan en una conformación terapéuticamente relevante (Steyaert & Kobilka, 2011) y su utilidad para el descubrimiento de fármacos dirigido permitiendo seleccionar específicamente posibles fármacos con sensibilidad y selectividad superiores hacia una diana particular (documento WO2012007593). Una limitación de este enfoque tecnológico es que para cada diana de GPCR es necesario identificar un Nanobody de estabilización específico, lo que no sólo lleva mucho tiempo y coste, sino que también implica la disponibilidad de diferentes herramientas, como material biológico para fines de inmunización y selección, entre otros.

El documento US20070077597 describe péptidos derivados de proteínas G que se unen específicamente al sitio de interacción de la proteína G de un GPCR. El documento WO2004035614 da a conocer péptidos D, que son diferentes de las inmunoglobulinas, que se unen específicamente al complejo $G\alpha/GDP$ de un complejo GPCR:proteína G. El documento WO2010043650 se refiere a Nanobodies que se unen específicamente a GPCR.

- 5 Por tanto es necesario el desarrollo de nuevas herramientas directas para el análisis estructural y farmacológico de dianas farmacológicas de GPCR.

Sumario de la invención

10 La revelación de las características estructurales y funcionales de los GPCR en complejo con sus proteínas G heterotriméricas posteriores y unidos a diversos ligandos naturales y sintéticos es valiosa tanto para comprender los mecanismos de la transducción de señales de GPCR así como para los esfuerzos realizados en el descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, la obtención de la estructura del complejo ternario en estado activo compuesto por el agonista, el GPCR y la proteína G había sido hasta ahora infructuosa pero altamente deseada en la biología estructural de la transducción de señales debido a su biología escasamente entendida. La cristalogénesis de este complejo resultó ser extremadamente difícil porque un componente (el receptor) necesita detergentes para solubilizarse mientras que la proteína G es inestable en detergentes. Además, los nucleótidos que se requieren para la formación del complejo también disocian el complejo en un procedimiento transitorio.

15 Por tanto, y de manera muy inesperada, los inventores identificaron herramientas que estabilizan complejos de GPCR y proteínas G, que les permitieron capturar y purificar tales complejos, y finalmente cristalizar tales complejos. Esto facilitará la identificación de ligandos o compuestos farmacológicos, por ejemplo, mediante examen o diseño virtual basado en la estructura, examen de alto rendimiento o descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (véase por ejemplo el ejemplo 10). Más específicamente, los inventores han identificado dominios de unión, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, adecuados para el análisis estructural y funcional de un complejo en estado activo compuesto por un agonista, GPCR y proteína G (véase por ejemplo los ejemplos 4-7). De manera interesante, se demostró que algunos de los dominios de unión selectivos del complejo GPCR:proteína G se dirigen específicamente contra la proteína G, y no contra el GPCR. Por ejemplo, se identificaron dominios de unión que se unen a G_s en la superficie de contacto de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, sin entrar en contacto con el receptor adrenérgico beta (véase por ejemplo el ejemplo 3), y que por tanto serán útiles para capturar y estabilizar otros receptores acoplados a G_s , tal como se demostró para el receptor de arginina-vasopresina 2 (V2R) (véase por ejemplo el ejemplo 9). Por tanto, es una ventaja particular que los dominios de unión se dirijan contra la proteína G de un complejo GPCR:proteína G, puesto que un dominio de unión de este tipo puede usarse como herramienta genérica para estabilizar y capturar complejos en estado activo de la variedad de GPCR que interaccionan con esa proteína G particular.

20 Por tanto, según un primer aspecto, la invención se refiere a un Nanobody que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 4 regiones de marco (de FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3) según la fórmula siguiente (1):

35 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1) y que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G. Más específicamente, el Nanobody tal como se describe en el presente documento se une con mayor afinidad al complejo GPCR:proteína G en comparación con la unión a la proteína G sola. Además, el Nanobody tal como se describe en el presente documento potencia la afinidad de una proteína G por un GPCR. Por tanto, los Nanobodies de la invención se dirigen contra y/o se unen específicamente a un epítipo conformacional de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y estabilizan o bloquean el complejo en un estado conformacional activo.

40 El Nanobody de la invención se une específicamente a la proteína G comprendida en el complejo, y no al GPCR.

45 Normalmente, en la naturaleza, las proteínas G están en una forma unida a nucleótido. Más específicamente, las proteínas G (o al menos la subunidad α) están unidas o bien a GTP o bien a GDP dependiendo del estado de activación de un GPCR particular, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. La unión de agonista a un GPCR promueve interacciones con el heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ unido a GDP lo que conduce a intercambio de GDP por GTP en $G\alpha$, y a la disociación funcional de la proteína G en las subunidades $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, que es necesaria para la señalización intracelular adicional. En una realización específica, el Nanobody de la invención se une específicamente a un complejo GPCR:proteína G en ausencia de nucleótidos, más específicamente los Nanobodies se unen a un complejo GPCR:proteína G en el que la proteína G está en una forma libre de nucleótido. En una realización particular, el Nanobody de la invención se unirá específicamente a un epítipo conformacional en la superficie de contacto entre la subunidad alfa y beta-gamma de dicha proteína G, y como tal bloquea el sitio de unión a GDP/GTP e interfiere con la unión a GDP/GTP. Como tal, y sorprendentemente, el Nanobody de la invención impide o inhibe la disociación del complejo GPCR:proteína G en presencia de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina o análogos de los mismos, tal como $GTP\gamma S$. Además, el Nanobody de la invención impide o inhibe la unión de nucleótidos a la proteína G. El Nanobody de la invención puede desplazar adicionalmente los

nucleótidos de la proteína G. En realizaciones, los nucleótidos son nucleótidos de guanina, tales como GDP o GTP, o análogos de los mismos, tal como GTP γ S.

- 5 Preferiblemente, el Nanobody de la invención se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR, una proteína G, y uno o más ligandos de receptor. Normalmente, el ligando de receptor será un agonista o un modulador alostérico positivo, o una combinación de los mismos, preferiblemente un agonista.

Según otra realización preferida, el Nanobody de la invención se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un receptor acoplado a proteínas Gs y una proteína Gs. El GPCR y/o la proteína G comprendidos en el complejo pueden proceder de especies iguales o diferentes, en particular de una especie de mamífero. Preferiblemente, el GPCR es una proteína humana.

- 10 Además, los Nanobodies de la invención también pueden estar comprendidos en un polipéptido. Además, los Nanobodies pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.

Otro aspecto de la invención prevé un complejo que comprende un Nanobody de la invención. En particular, el complejo comprende un GPCR, una proteína G, y opcionalmente un ligando de receptor. En determinadas aplicaciones, el complejo es cristalino.

- 15 Además, la invención también proporciona secuencias de ácido nucleico, en particular una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de un Nanobody de la invención, así como vectores recombinantes que comprenden cualquiera de las secuencias de ácido nucleico. Aspectos particularmente preferidos de la invención son células que comprenden cualquiera de los vectores o ácidos nucleicos según la invención, y como tal, que pueden expresar o son capaces de expresar un GPCR y/o una proteína G. Los cultivos
20 celulares de células según la invención, así como preparaciones de membrana derivadas de las mismas también están dentro del alcance de la presente invención.

- Los Nanobodies, complejos y células pueden ser útiles en una variedad de contextos y aplicaciones. Así, por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere al uso de un Nanobody según la invención para estabilizar *in vitro* un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y opcionalmente un ligando de receptor, en un estado
25 conformacional activo. En una realización específica, los Nanobodies pueden usarse para impedir la disociación del complejo en presencia de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina o análogos de los mismos, tal como GTP γ S. Los Nanobodies según la invención, como herramientas para estabilizar complejos GPCR:proteína G y bloquear el GPCR en un estado conformacional activo, son por tanto muy útiles para una variedad de aplicaciones, tal como se explica resumidamente más adelante en el presente documento.

- 30 Un objeto de la invención es el uso de un Nanobody según la invención para cristalizar y/o para resolver la estructura de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y opcionalmente un ligando de receptor.

También se prevé dentro del alcance de la presente invención usar un Nanobody según la invención o una célula o una preparación de membrana derivada de la misma, para examinar compuestos que modulan la actividad de señalización del GPCR.

- 35 Además, los Nanobodies según la invención pueden usarse para capturar una o más proteínas de interacción, en particular proteínas que interaccionan con la proteína G y/o con el GPCR.

Según realizaciones específicas, la presente invención proporciona un método *in vitro* de captura y/o purificación de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un Nanobody según la invención, y
40 b) permitir que el Nanobody se una a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G y opcionalmente un ligando de receptor, y
c) opcionalmente, aislar el complejo formado en la etapa b).

Otros objetos de la invención quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 45 Figura 1: Ciclo de proteína G para el complejo β_2 AR:Gs. a, La unión de un agonista extracelular a β_2 AR conduce a reordenamientos conformacionales de los extremos citoplasmáticos de los segmentos transmembrana que permiten que el heterotrímero de Gs (α , β y γ) se una al receptor (R, R*). GDP se libera de la subunidad α tras la formación del complejo R:G. El GTP se une a la subunidad α libre de nucleótido dando como resultado la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ del receptor. Las subunidades regulan sus respectivos canales de proteínas efectoras adenilil
50 ciclasa (AC) y Ca²⁺. El heterotrímero de Gs vuelve a montarse a partir de las subunidades α y $\beta\gamma$ tras la hidrólisis de GTP para dar GDP en la subunidad α . b, El complejo β_2 AR:proteína Gs libre de nucleótido purificado se mantiene en micelas de detergente. La subunidad Gs α consiste en dos dominios, el dominio Ras (α Ras) y el dominio de hélice α

(α AH). Ambos están implicados en la unión a nucleótidos. En el estado libre de nucleótido, el dominio α AH tiene una posición variable en relación con el dominio α Ras.

Figura 2: Formación de un complejo β_2 AR:Gs estable. Se logró un complejo β_2 AR:Gs estable mediante los efectos combinados de: 1) unión de un agonista de alta afinidad al receptor con una velocidad de disociación extremadamente lenta (tal como se describe en Rasmussen *et al.*, 2011); 2) formación de un complejo libre de nucleótido en presencia de apirasa que hidroliza el GDP liberado impidiendo que vuelva a unirse y produciendo una interacción R:G menos estable; y 3) intercambio con detergente de DDM para MNG-3 que estabiliza el complejo.

Figura 3: Efecto de análogos de nucleótidos, pH y Nanobodies sobre la estabilidad del complejo β_2 AR:Gs. a) Filtración en gel analítica que muestra que los nucleótidos GDP y GTP γ S (0,1 mM) produce la disociación del complejo β_2 AR-365:Gs. b) Los fosfatos pirofosfato y forcarinet (usados a 5 mM) que se asemejan a los grupos nucleótido fosfato no produjeron la alteración del complejo. Sirvieron como aditivos ya que mejoraron el crecimiento de cristales tanto del complejo T4L- β_2 AR:Gs (sin Nanobodies), como de T4L- β_2 AR:Gs:Nb37 y T4L- β_2 AR:Gs:Nb35. c) Se determinó el límite de pH para guiar la preparación de exámenes de cristalización. Para el mismo fin, se determinó el efecto de la fuerza iónica (datos no mostrados) usando NaCl a diversas concentraciones. El complejo es estable en 20, 100 y 500 mM, pero se disocia a NaCl 2,5 M. d) El Nanobody 35 (Nb35, línea discontinua roja) se une al complejo ternario T4L- β_2 AR:Gs:BI167107 (línea continua azul) para formar el complejo R:G:Nb35 (línea continua roja) que es insensible al tratamiento con GTP γ S (línea continua verde) a diferencia del complejo R:G tratado (línea discontinua verde). Nb35 y Nb37 se unen a epítomos separados en el heterotrímero de Gs para formar un complejo R:G:Nb35:Nb37 (línea continua morada). e) El Nanobody 36 (Nb36, línea discontinua roja) se une al complejo R:G (línea continua negra) para formar el complejo R:G:Nb36 (línea continua roja) que es menos sensible al tratamiento con GTP γ S (línea continua verde). Nb36 y Nb37 se unen a epítomos separados en el heterotrímero de Gs para formar un complejo R:G:Nb36:Nb37 (línea continua morada). f) El Nanobody 37 (Nb37, línea verde) se une al complejo R:G (línea continua negra) para formar el complejo R:G:Nb37 (línea continua roja). g) El complejo R:G:Nb37 es insensible al tratamiento con GTP γ S (línea continua azul) a diferencia del complejo R:G tratado (línea discontinua azul).

Figura 4: Efecto de estabilización de MNG-3 en el complejo R:G. a) Filtración en gel analítica de complejos β_2 AR-365:Gs purificados en DDM (en negro), MNG-3 (en azul) o dos análogos de MNG-3 (en rojo y verde) tras la incubación durante 48 h a 4°C. A diferencia de DDM, los complejos R:G son estables en los detergentes MNG. b) Efecto de diluir β_2 AR purificado no ligado en DDM o MNG-3 por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) del detergente tal como se somete a ensayo mediante la unión por saturación de 3H-dihidro-alprenolol (3H-DHA). La dilución de β_2 AR mantenido en DDM 1000 veces por debajo de la CMC produce pérdida en la unión de 3H-DHA (puntos de datos en negro) tras 20 s. En contraposición, β_2 AR en MNG-3 diluido 1000 veces por debajo de la CMC mantuvo toda su capacidad para unirse al radioligando tras 24 h.

Figura 5: Pureza y homogeneidad del complejo R:G. a) Tinción analítica con SDS-PAGE/azul de Coomassie de muestras obtenidas en diversas fases de la purificación de T4L- β_2 AR:Gs. Se usa el receptor desglucosilado, desfosforilado y unido al agonista BI167107 en cantidad en exceso de heterotrímero de Gs para determinar la eficacia de acoplamiento óptima con la fracción funcional de la proteína G. La purificación funcional de Gs se logra a través de su interacción con el receptor inmovilizado en la resina M1 mientras que Gs no funcional/sin unión se elimina por lavado. b) Un perfil de elución representativo de una de cuatro filtraciones en gel preparativas consecutivas con el fraccionamiento indicado en rojo. Las fracciones que contenían el complejo R:G se combinaron dentro de las líneas discontinuas indicadas, se concentraron por centrifugación y se analizaron para determinar su pureza y homogeneidad mediante SDSPAGE/azul de Coomassie (a, segunda banda final a la derecha), filtración en gel en c), y mediante cromatografía de intercambio aniónico en d). El panel superior muestra el perfil de elución a partir de IEC analítica del complejo β_2 AR-365:Gs que se trató con λ PPasa antes de la formación del complejo en comparación con complejo que no se desfosforiló dando como resultado una preparación heterogénea (panel inferior). El material menos homogéneo en las fracciones fuera de las líneas discontinuas indicadas en b) se usaron para experimentos de filtración en gel analítica del complejo R:G en presencia de diversos compuestos químicos (ejemplos en la figura 1).

Figura 6: Diagrama de flujo de los procedimientos de purificación para preparar el complejo R:G con Nb35.

Figura 7: Purificación de Nb35 y determinación de la razón de mezclado de R:G:Nb. a) Cromatografía de intercambio iónico preparativa tras purificación por cromatografía de afinidad con níquel del Nanobody 35 (Nb35). El Nanobody eluyó en dos poblaciones (mostrado en rojo) como un pico minoritario y un pico homogéneo principal que se recogió, se concentró mediante centrifugación y se usó para cristalografía tras la determinación de la razón de mezclado apropiada con el complejo R:G tal como se muestra en (b). b) El complejo T4L- β_2 AR:Gs unido al agonista se mezcló con un ligero exceso de Nb35 (razón molar de 1 a 1,2 de complejo R:G con respecto a Nb35) basándose en sus concentraciones de proteína y se verificó mediante filtración en gel analítica.

Figura 8: Cristales del complejo T4L- β_2 AR:Gs:Nb35 en mesofase de tipo esponja.

Figura 9: Estructura global del complejo β_2 AR:Gs. a, El empaquetamiento reticular del complejo muestra capas

alternas de receptor y proteína G dentro del cristal. Se forman contactos abundantes entre proteínas dentro de las capas acuosas. b, La estructura global del contenido en unidades asimétricas muestra el $\beta_2\text{AR}$ (verde) unido a un agonista (esferas amarillas) e implicado en amplias interacciones con $\text{Gs}\alpha$ (naranja). $\text{Gs}\alpha$ junto con $\text{G}\beta$ (cián) y $\text{G}\gamma$ (morado) constituyen la proteína G heterotrimérica Gs. Un Nanobody de unión a Gs (Nb35, rojo) se une a la proteína G entre las subunidades α y β . El Nanobody (Nb35) facilita la cristalización, como lo hace la lisozima de T4 (magenta) unida al extremo amino-terminal del $\beta_2\text{AR}$. c, Los adyuvantes de cristalización que omiten el complejo biológico, que muestran su localización y orientación dentro de una membrana celular.

Figura 10: Interacciones de Nb35 con Gs dentro del complejo T4L- $\beta_2\text{AR}$:Gs:Nb35 unido a BI-167107. a, Dos vistas representativas sobre las interacciones de CDR1 (representación de espacio lleno) de Nb35 (rojo) con $\text{G}\beta$ (espacio lleno, cián). b, Dos vistas representativas sobre las interacciones de CDR3 (representación de espacio lleno) de Nb35 (rojo) con $\text{Gs}\alpha$ (espacio lleno, naranja) y $\text{G}\beta$ (espacio lleno, cián). Mediante la interacción con $\text{Gs}\alpha$ y $\text{G}\beta$, Nb35 puede reducir la flexibilidad conformacional del complejo. c, Dos vistas representativas sobre las interacciones de las regiones de marco de Nb35 (representación de espacio lleno, rojo) con $\text{Gs}\alpha$ (naranja).

Figura 11: Contactos cristalinos entre Nb35 y subunidades $\text{Gs}\alpha$ de complejos adyacentes. Contactos cristalinos que implican Nb35 (rojo, representación de espacio lleno) y $\text{Gs}\alpha$ (naranja) del complejo relacionado con simetría $-x, y-1/2, -z+1$ (a) y el complejo relacionado con simetría $x, y-1, z$ (b).

Figura 12: Comparación de estructuras de $\beta_2\text{AR}$ activas e inactivas. a, Vistas lateral y citoplasmática de la estructura de $\beta_2\text{AR}$:Gs (verde) en comparación con la estructura de $\beta_2\text{AR}$ unido a carazolol inactivo (azul; Rosenbaum *et al.*, 2007). Se observan cambios estructurales significativos para el dominio intracelular de TM5 y TM6. TM5 se extiende mediante dos giros helicoidales mientras que TM6 se mueve hacia afuera 14 Å tal como se mide en los carbonos α de Glu268 (flecha amarilla) en las dos estructuras. b, $\beta_2\text{AR}$:Gs en comparación con la estructura de $\beta_2\text{AR}$:Nb80 de estado activo estabilizada por Nanobody (naranja, Rasmussen *et al.*, 2011). c, Las posiciones de los residuos en los motivos E/DRY y NPxxY y otros residuos clave de las estructuras de $\beta_2\text{AR}$:Gs y $\beta_2\text{AR}$:Nb80 tal como se observa desde el lado citoplasmático. Todos los residuos ocupan posiciones muy similares excepto Arg131 que en la estructura de $\beta_2\text{AR}$:Nb80 interacciona con el Nanobody.

Figura 13: Vistas de densidad electrónica para residuos en la superficie de contacto de R:G. a) El motivo D/ERY en el extremo citoplasmático de TM3. b) Interacción de empaquetamiento entre Arg131 del motivo E/DRY y Tyr391 de $\text{Gs}\alpha$ C-terminal. c) El NPxxY en el extremo citoplasmático de TM7. d) Interacciones de Thr68 y Tyr141 con Asp130 del motivo E/DRY. Phe139 de IL2 está enterrado en una cavidad hidrófoba en $\text{Gs}\alpha$. e) El bucle $\beta_1\text{-}\alpha_1$ (bucle P) de $\text{Gs}\alpha$ implicado en la unión a nucleótidos. Los mapeos de densidad electrónica son mapas de 2Fo-Fc contorneados en 1 sigma.

Figura 14: Interacciones de receptor:proteína G. a, b La hélice α_5 de $\text{Gs}\alpha$ se acopla en una cavidad formada en el lado intracelular del receptor por la abertura de las hélices transmembrana 5 y 6. a. Dentro del núcleo transmembrana, las interacciones son principalmente no polares. Una excepción implica el empaquetamiento de Tyr391 de la hélice α_5 contra Arg131 de la secuencia DRY conservada en TM3 (véase también la figura 13). Arg131 también se empaqueta contra Tyr de la secuencia NPxxY conservada en TM7. b. Cuando la hélice α_5 sale, el receptor forma una red de interacciones polares con TM5 y TM3. c, Los residuos de receptor, Thr68 y Asp130, interaccionan con la hélice IL2 de $\beta_2\text{AR}$ a través Tyr141, colocando la hélice de modo que Phe139 del receptor se acopla en una cavidad hidrófoba en la superficie de la proteína G, asociando de ese modo estructuralmente las interacciones receptor - proteína G con el motivo DRY altamente conservado del $\beta_2\text{AR}$.

Figura 15: Cambios conformacionales en $\text{Gs}\alpha$. a, Una comparación de $\text{Gs}\alpha$ en el complejo $\beta_2\text{AR}$:Gs (naranja) con $\text{Gs}\alpha$ unida a $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (gris) (PDB ID: 1AZT; Sunahara *et al.*, 1997). $\text{GTP}\gamma\text{S}$ se muestra como esferas. El dominio helicoidal de $\text{Gs}\alpha$ ($\text{Gs}\alpha\text{H}$) presenta un desplazamiento espectacular en relación con su posición en el estado unido a $\text{GTP}\gamma\text{S}$. b, La hélice α_5 de $\text{Gs}\alpha$ está girada y desplazada hacia el $\beta_2\text{AR}$, alterando el bucle $\beta_6\text{-}\alpha_5$ que de otro modo forma parte de la cavidad de unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$. c, El bucle $\beta_1\text{-}\alpha_1$ (bucle P) y el bucle $\beta_6\text{-}\alpha_5$ de $\text{Gs}\alpha$ interaccionan con los fosfatos y el anillo de purina, respectivamente, de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ en la estructura de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ - $\text{Gs}\alpha$. d, Los bucles $\beta_1\text{-}\alpha_1$ y $\beta_6\text{-}\alpha_5$ se reordenan en la estructura de $\beta_2\text{AR}$:Gs libre de nucleótido.

Figura 16: Nb37 inhibe la unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a $\text{Gs}\alpha$. Se incubó Bodipy- $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (100 nM) con $\text{Gs}\alpha$ 1 μM purificado y se midió el aumento de fluorescencia en tiempo real en presencia de concentraciones crecientes de Nb37.

Figura 17: Nb35 no afecta a la unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a $\text{Gs}\alpha$. Se incubó Bodipy- $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (100 nM) con $\text{Gs}\alpha$ 1 μM purificado y se midió el aumento de fluorescencia en tiempo real en presencia de concentraciones crecientes de Nb35.

Figura 18: Nb35 inhibe la unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ al heterotrímero $\text{Gs}\alpha\beta\gamma$. Se incubó Bodipy- $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (100 nM) con el heterotrímero $\text{Gs}\alpha\beta\gamma$ 1 μM purificado y se midió el aumento de fluorescencia en tiempo real en presencia de concentraciones crecientes de Nb35.

Figura 19: Purificación de un complejo AVP:NT4LV2R:Gs estable. a, Representación esquemática de la purificación del complejo AVP:NT4LV2R:Gs usando Ni-NTA seguido por purificación por afinidad con etiqueta FLAG. b,

Cromatograma SEC de AVP:NT4LV2R:Gs purificado por afinidad. c, SDS-PAGE para monitorizar el esquema de purificación. Banda 1: flujo a través de la columna de afinidad con etiqueta FLAG; banda 2: mezcla de AVP, NT4LV2R y Gs, antes de la purificación; banda 3: marcador molecular; banda 4: complejo AVP:NT4LV2R:Gs eluido de SEC; banda 5: complejo AVP:NT4LV2R:Gs tras Ni-NTA seguido por purificación por afinidad con etiqueta FLAG.

- 5 Figura 20: Estabilidad del complejo AVP:NT4LV2R:Gs monitorizada mediante SEC. Línea discontinua: Cromatograma SEC del complejo AVP:NT4LV2R:Gs tras 24 h de incubación en hielo. Línea azul: Cromatograma SEC del complejo AVP:NT4LV2R:Gs tras 48 h de incubación en hielo. Línea roja, Cromatograma SEC de AVP:NT4LV2R:Gs tras la incubación del complejo con 10 μ M del antagonista SR121463.

Descripción detallada de la invención

10 DEFINICIONES

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos, pero la invención no está limitada a ellos sino sólo por las reivindicaciones. Ningún signo de referencia en las reivindicaciones se considerará como limitativo del alcance. Los dibujos descritos son sólo esquemáticos y no son limitativos. En los dibujos, el tamaño de alguno de los elementos puede estar exagerado y no dibujado a escala por fines ilustrativos. Cuando se usa el término “que comprende” en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Si se usa un artículo definido o indefinido cuando se hace referencia a un sustantivo singular por ejemplo “un” o “una”, “el/la”, esto incluye un plural de ese sustantivo, a menos que específicamente se establezca 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 circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en el presente documento.

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos y expresiones científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden normalmente los expertos habituales en la técnica. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de biología molecular y celular, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan normalmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención 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 a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Verdee Publishing Associates (1992, y suplementos hasta 2002).

El término “dominio de unión” o “dominio de unión a proteínas” se refiere generalmente a cualquier molécula que no se produce de manera natural, o parte de ella, que puede unirse a proteínas o péptidos usando interacciones intermoleculares específicas. Una variedad de moléculas puede funcionar como dominios de unión a proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas proteicas (proteína, péptido, molécula similar a proteína o molécula que contiene proteínas), moléculas de ácido nucleico (ácido nucleico, molécula similar a ácido nucleico, molécula que contiene ácido nucleico) y moléculas de hidratos de carbono (hidratos de carbono, molécula similar a hidratos de carbono, molécula que contiene hidratos de carbono). Puede encontrarse una descripción más detallada adicionalmente en la memoria descriptiva.

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 puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados o derivatizados química o bioquímicamente, y polipéptidos que tienen estructuras principales peptídicas modificadas.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo de proteínas”, o simplemente “complejo”, se refiere a un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Las proteínas en un complejo de proteínas se unen mediante interacciones proteína-proteína no covalentes. La “estructura cuaternaria” es la disposición estructural de las proteínas plegadas asociadas en el complejo de proteínas. Se entenderá que el complejo puede ser un complejo multimérico que comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o más polipéptidos. Además, el complejo puede comprender adicionalmente una molécula no proteica.

55 Tal como se usan en el presente documento, los términos “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “poli(ácido nucleico)”, “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 de gen, 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

línea o circular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ligando” o “ligando de receptor” significa una molécula que se une específicamente a un GPCR, de manera o bien intracelular o bien extracelular. Un ligando puede ser, sin el fin de ser limitativo, una proteína, un (poli)péptido, un líquido, una molécula pequeña, una estructura de soporte proteica, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico, un hidrato de carbono. Un ligando puede ser sintético o producirse de manera natural. El término “ligando” incluye un “ligando negativo” que es un ligando que es un ligando endógeno, natural, para un GPCR nativo. En la mayoría de los casos, un ligando es un “modulador” que aumenta o disminuye una respuesta intracelular cuando está en contacto con, por ejemplo se une a, un GPCR que se expresa en una célula. Los ejemplos de ligandos que son moduladores incluyen agonistas, agonistas parciales, agonistas inversos, y antagonistas, de los que puede encontrarse una descripción más detallada adicionalmente en la memoria descriptiva.

El término “conformación” o “estado conformacional” de una proteína se refiere generalmente a la variedad 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 proteínas (por ejemplo, hélice α , lámina β , entre otras), estructura terciaria (por ejemplo, el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica), y estructura cuaternaria (por ejemplo, interacciones de una cadena polipeptídica con otras subunidades proteicas). Las modificaciones postraduccionales y otras a una cadena polipeptídica tal como unión a ligando, fosforilación, sulfatación, glicosilación o uniones de grupos hidrófobos, entre otros, pueden influir en la conformación de una proteína. Además, factores del entorno, tales como el pH, la concentración de sal, la fuerza iónica y la osmolalidad de la disolución circundante, y la interacción con otras proteínas y cofactores, entre otros, pueden afectar a la conformación de la proteína. El estado conformacional de una proteína puede determinarse o bien por un ensayo funcional para determinar su actividad o bien por la unión a otra molécula o por medio de métodos físicos tales como cristalografía de rayos X, RMN, o marcaje con sondas de espín, entre otros métodos. Para una discusión general de la conformación de proteínas y los estados conformacionales, se hace referencia 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. Una “conformación específica” o “estado conformacional específico” es cualquier subconjunto de la variedad de conformaciones o estados conformacionales que puede adoptar una proteína.

Tal como se usa en el presente documento, una “conformación funcional” o un “estado conformacional funcional”, se refiere al hecho de que las proteínas poseen diferentes estados conformacionales que tienen un intervalo dinámico de actividad, en particular que oscila entre ausencia de actividad y actividad máxima. Los ejemplos de estados conformacionales funcionales incluyen conformaciones activas y conformaciones inactivas. Debe quedar claro que “un estado conformacional funcional” pretende cubrir cualquier estado conformacional de un GPCR, que tiene cualquier actividad, incluyendo ausencia de actividad; y no pretende cubrir los estados desnaturalizados de proteínas. Una clase particular de conformaciones funcionales que se contempla en el presente documento es una “conformación quimiomodulable” y se refiere generalmente a un estado conformacional terapéuticamente relevante único de una proteína diana. Como ilustración, la conformación activa del receptor adrenérgico $\beta 2$ corresponde a la conformación quimiomodulable de este receptor para el tratamiento del asma. Por tanto se entenderá que la quimiomodulabilidad está confinada a conformaciones particulares dependiendo de la indicación terapéutica.

Los términos “bloqueo” o “atrapamiento” o “fijación” o “inmovilización” con respecto a un estado conformacional funcional de un GPCR (tal como se define en el presente documento), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la retención o el mantenimiento de un GPCR en un subconjunto de las posibles conformaciones que de otro modo podrían adoptar, debido a los efectos de la interacción del complejo GPCR:proteína G con el dominio de unión descrito en el presente documento. Por consiguiente, una proteína que está “atrapada conformacionalmente” o “fijada conformacionalmente” o “bloqueada conformacionalmente” o “inmovilizada conformacionalmente”, tal como se usa en el presente documento, es una que se mantiene en un subconjunto de las posibles conformaciones que de otro modo podría adoptar, debido a los efectos de la interacción del complejo GPCR:proteína G con el dominio de unión descrito en el presente documento. Dentro de este contexto, un dominio de unión que se une específica o selectivamente a una conformación o estado conformacional específico de una proteína se refiere a un dominio de unión que se une con una mayor afinidad a una proteína en un subconjunto de conformaciones o estados conformacionales que a otras conformaciones o estados conformacionales que puede adoptar la proteína. Un experto en la técnica reconocerá que los dominios de unión que se unen específica o selectivamente a una conformación o estado conformacional específico de una proteína estabilizarán esta conformación o estado conformacional específico.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “región determinante de complementariedad” o “CDR” dentro del contexto de los anticuerpos se refieren a regiones variables de cadenas o bien H (pesadas) o bien L (ligeras) (también abreviadas V_H y V_L , 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 CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha encontrado que las ubicaciones posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticos centro de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas variables pesada y ligera de todos los anticuerpos canónicos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligera (L) y pesada (H) respectivas. En particular, los dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como Nanobodies (tal como se define adicionalmente en el presente documento), comprenden generalmente una sola cadena de aminoácidos que comprende 4 "secuencias o regiones de marco" o FR (denominadas FR1, FR2, FR3, FR4) y 3 "regiones determinantes de complementariedad" o CDR (denominadas CDR1, CDR2, CDR3), cada una no contigua con las otras. La delineación de las secuencias de CDR (y por tanto también de las secuencias de FR) se basa en el sistema de numeración único de IMGT para los dominios V y los dominios similares a V (Lefranc *et al.* 2003).

Un "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítipo podría comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial, que es única para el epítipo. Generalmente, un epítipo consiste en al menos 4, 5, 6, 7 de 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.

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

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, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un Nanobody, para unirse preferentemente a un antígeno, frente a un antígeno diferente, y no implica necesariamente alta afinidad (tal como se define adicionalmente en el presente documento). Se dice que un dominio de unión, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un Nanobody, que puede unirse específicamente a y/o que tiene afinidad por un antígeno o determinante antigénico específico (por ejemplo epítipo) es "contra" o "se dirige contra" dicho antígeno o determinante antigénico. Se dice que un dominio de unión tal como se describe en el presente documento es "reactivo de manera cruzada" para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes si es específico para estos dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes.

El término "afinidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere al grado en que se une un dominio de unión, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un Nanobody, a un antígeno para cambiar el equilibrio del antígeno y el dominio de unión hacia la presencia de un complejo formado por su unión. Por tanto, por ejemplo, cuando se combinan un antígeno y un anticuerpo (fragmento) en concentración relativamente igual, un anticuerpo (fragmento) de alta afinidad se unirá al antígeno disponible para cambiar el equilibrio hacia la alta concentración del complejo resultante. La constante de disociación (K_d) se usa frecuentemente para describir la afinidad entre el dominio de unión a proteínas y la diana antigénica. Normalmente, la constante de disociación 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.

Los términos "unir específicamente" y "unión específica", tal como se usan en el presente documento, se refieren generalmente a la capacidad de un dominio de unión, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como un 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 diferenciará entre antígenos deseables e indeseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 ó 10.000 veces).

Los términos "unir específicamente", "unir selectivamente", "unir preferentemente" y equivalentes gramaticales de los mismos, se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los términos "específico conformacional" o "selectivo conformacional" también se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Una "delección" se define en el presente documento como un cambio en cualquier secuencia de aminoácidos o 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 original. Dentro del contexto de una proteína o un fragmento de la misma, una delección puede implicar la delección de aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o un fragmento de la misma puede contener más de una delección. Dentro del contexto de un GPCR, una delección puede ser en particular una delección de bucle, o una delección de extremo N- y/o C-terminal.

Una "inserción" o "adición" es ese cambio en una secuencia de aminoácidos o 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 original. "Inserción" se refiere generalmente 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 en ambos extremos terminales. Dentro del contexto de una proteína o un fragmento de la misma, una inserción o adición es habitualmente de aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o fragmento de la misma puede contener más de una inserción.

Una "sustitución", tal como se usa en el presente documento, resulta de la sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de una proteína original o un fragmento de la misma. Se entiende que una proteína o un fragmento de la misma puede tener sustituciones de aminoácidos conservativas que sustancialmente no tienen efecto sobre la actividad de la proteína. Mediante sustituciones conservativas pretende hacerse referencia a 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 "identidad de secuencia" tal como se usa en el presente documento se refiere al grado en que las secuencias son idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido a lo largo de una ventana de comparación. Por tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparecen 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 dar 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 la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar 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.

"Cristal" o "estructura cristalina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material sólido, cuyos átomos, moléculas o iones constituyentes están dispuestos en un patrón de repetición ordenado que se extiende en las tres dimensiones espaciales. El procedimiento de formar una estructura cristalina a partir de un fluido o a partir de materiales disueltos en el fluido a menudo se denomina "cristalización" o "cristalogénesis". Los cristales de proteínas casi siempre crecen en disolución. En enfoque más común es disminuir la solubilidad de sus moléculas componentes gradualmente. El crecimiento de cristales en disolución se caracteriza por dos etapas: nucleación de una unidad cristalina microscópica (que tiene posiblemente sólo 100 moléculas), seguido por el crecimiento de esa unidad cristalina, de manera ideal para dar un cristal de calidad para difracción.

"Cristalografía de rayos X", tal como se usa en el presente documento, es un método de determinación de la disposición de átomos dentro de un cristal, en la que un haz de rayos X incide sobre un cristal y se difracta en muchas direcciones específicas. A partir de los ángulos e intensidades de estos haces difractados, un cristalógrafo puede producir una imagen tridimensional de la densidad de electrones dentro del cristal. A partir de esta densidad electrónica, pueden determinarse las posiciones medias de los átomos en el cristal, así como sus uniones químicas, su desorden y otra información diversa, tal como conocerán los expertos en la técnica.

El término "coordenadas atómicas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de coordenadas tridimensionales para átomos dentro de una estructura molecular. En una realización, las coordenadas atómicas se obtienen usando cristalografía de rayos X según métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica de la biofísica. Descrito brevemente, pueden obtenerse patrones de difracción de rayos X realizando la difracción de rayos X de un cristal. Los datos de difracción se usan para calcular un mapa de densidad electrónica de la celda unidad que comprende el cristal; dichos mapas se usan para establecer las posiciones de los átomos (es decir, las coordenadas atómicas) dentro de la celda unidad. Los expertos en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas de estructura determinadas mediante cristalografía de rayos X contiene errores convencionales. En otras realizaciones, pueden obtenerse coordenadas atómicas usando otros métodos biofísicos experimentales de determinación de la estructura que pueden incluir métodos de difracción de electrones (también conocida como cristalografía de electrones) y resonancia magnética nuclear (RMN). Aún en otras realizaciones, pueden obtenerse coordenadas atómicas usando herramientas de modelado molecular que pueden basarse en uno o más de algoritmos de plegamiento de proteínas desde el principio, minimización de energía y modelado basado en la homología. Estas técnicas también las conocen bien los expertos habituales en las técnicas de biofísica y

bioinformática.

“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 a menudo se realiza mediante un método biofísico, tal como cristalografía de rayos X.

5 El término “compuesto” o “compuesto de prueba” o “compuesto candidato” o “compuesto candidato a fármaco” tal como se usa en el presente documento describe cualquier molécula, ya se produzca de manera natural o sintética que se somete a prueba en un ensayo, tal como un ensayo de examen o ensayo de descubrimiento de fármaco. Como tal, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos e inorgánicos. Los compuestos incluyen análogos de hormonas, lípidos o polinucleótidos que se caracterizan por pesos moleculares bajos. Otros compuestos de prueba orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos o moléculas similares a péptidos (peptidomiméticos) pequeños 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 estructuras de soporte de proteínas. Para fines de alto rendimiento, pueden usarse bibliotecas de compuestos de prueba, tales como bibliotecas combinatorias o aleatorizadas que proporcionan un intervalo de diversidad suficiente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de compuestos naturales, bibliotecas de compuestos alostéricos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de compuestos sintéticos, bibliotecas basadas en fragmentos, bibliotecas de presentación en fagos, y similares. Puede encontrarse una descripción más detallada adicionalmente en la memoria descriptiva.

20 Tal como se usan 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.

El término “biológicamente activo”, con respecto a un GPCR, se refiere a un GPCR que tienen una función bioquímica (por ejemplo una función de unión, una función de transducción de señales, o una capacidad para cambiar la conformación como resultado de la unión a ligando) de un GPCR que se produce de manera natural.

25 Los términos “cantidad terapéuticamente eficaz”, “dosis terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz”, tal como se usan en el presente documento, significan la cantidad necesaria para lograr el resultado o resultados deseados.

El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, significa un material que no es indeseable ni biológicamente ni de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin producir ningún efecto o interacción biológica indeseable de manera perjudicial con cualquier otro de los componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

30

Descripción detallada

Pese a la gran diversidad de ligandos que puede activar a los GPCR, interaccionan con un número relativamente pequeño de proteínas intracelulares para inducir un cambio fisiológico profundo. Las proteínas G heterotriméricas, β -arrestinas y GPCR cinasas se conocen bien por su capacidad para reconocer específicamente GPCR en su estado activo, aunque se entienden escasamente tanto desde el punto de vista estructural así como del funcional. Por tanto, de manera sorprendente y ventajosa, se identificaron dominios de unión que se unen específicamente a complejos GPCR:proteína G y que pueden estabilizar o bloquear el complejo en un estado conformacional funcional, en particular un estado conformacional activo. Además, los dominios de unión son herramientas genéricas para la estabilización y la captura de un GPCR de elección en su estado unido a proteínas G, que se supone que representa generalmente un estado activo de un GPCR (tal como se define en el presente documento).

40

Por consiguiente, un primer aspecto de la memoria descriptiva se refiere a un dominio de unión que se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G.

El dominio de unión descrito en el presente documento puede ser cualquier molécula que no se produce de manera natural o parte de la misma (tal como se definió anteriormente en el presente documento) que puede unirse específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G. Los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden ser estructuras de soporte de proteínas. El término “estructura de soporte de proteínas” se refiere generalmente a unidades de plegamiento que forman estructuras, particularmente estructuras de proteínas o péptidos, que comprenden regiones de marco para la unión de otra molécula, por ejemplo una proteína (véase, por ejemplo, Skerra (2000), para una revisión). Un dominio de unión puede derivarse de una molécula que se produce de manera natural, por ejemplo de componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo, o puede diseñarse de manera completamente artificial. Un dominio de unión puede basarse en inmunoglobulinas o puede basarse en dominios presentes en proteínas, incluyendo pero sin limitarse a, proteínas microbianas, inhibidores de proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas de superhélice antiparalela de cadena individual o proteínas con motivo de repetición. Los ejemplos de dominios de unión que se conocen en la técnica incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos, anticuerpos de cadena pesada (HcAc), anticuerpos de dominio individual (sdAb), minicuerpos, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o Nanobodies), el dominio variable de los nuevos receptores antigénicos derivados anticuerpos de tiburón (VNAR), alfacuerpos, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin), repeticiones de tipo II

55

de fibronectina, anticalinas, knottinas, dominios CH2 obtenidos por ingeniería genética (nanoanticuerpos), péptidos y proteínas, lipopéptidos (por ejemplo pepducinas), ADN y ARN (véase, por ejemplo, Gebauer & Skerra, 2009; Skerra, 2000; Starovasnik *et al.*, 1997; Binz *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 1998; Dimitrov, 2009; Nygren *et al.* 2008; documento WO2010066740). Con frecuencia, cuando se genera un tipo particular de dominio de unión usando métodos de selección, se usan bibliotecas combinatorias que comprenden una secuencia consenso o secuencia de región de marco que contiene residuos de interacción potencial aleatorizados para examinar la unión a una molécula de interés, tal como una proteína.

El dominio de unión descrito en el presente documento puede dirigirse contra y/o unirse específicamente a cualquier complejo GPCR:proteína G de elección. Los complejos diana preferidos son complejos de un GPCR y una proteína G que se producen en la naturaleza o, alternativamente, por ejemplo en caso de variantes que no se producen de manera natural (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) de varios GPCR y proteína G, complejos en los que el GPCR y la proteína G se asociarán en las condiciones fisiológicas apropiadas. El experto en la técnica entenderá que la relación estructural entre GPCR y proteína G determina si puede formarse un complejo GPCR:proteína G particular, que se detallará adicionalmente a continuación para los miembros de la familia de proteínas G y miembros de la familia de GPCR.

Con “proteínas G” quiere decirse la familia de proteínas de unión a nucleótidos de guanina implicadas en la transmisión de señales químicas fuera de la célula, y la producción de cambios dentro de la célula. Las proteínas G son componentes moleculares clave en la transducción de señales intracelulares tras la unión del ligando al dominio extracelular de un GPCR. También se denominan “proteínas G heterotriméricas”, o “proteínas G grandes”. Las proteínas G consisten en tres subunidades: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) y su clasificación se basa en gran medida en la identidad de sus distintas subunidades α , y en la naturaleza del acontecimiento de transducción posterior. La clasificación adicional de las proteínas G procede del análisis de homología de la secuencia de ADNc. Las proteínas G se unen o bien a guanosina difosfato (GDP) o bien a guanosina trifosfato (GTP), y poseen dominios de unión a nucleótidos de guanina altamente homólogos y distintos dominios para interacciones con receptores y efectores. Diferentes subclases de proteínas $G\alpha$, tales como $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$, entre otras, señalizan a través de distintas rutas que implican moléculas de segundo mensajero tales como AMPc, inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol, Ca^{2+} intracelular y RhoA GTPasas. Para ilustrar esto adicionalmente, la subunidad α (39 - 46 kDa) contiene el sitio de unión a nucleótido de guanina y posee actividad GTPasa; las subunidades β (37 kDa) y γ (8 kDa) están estrechamente asociadas y funcionan como un heterodímero $\beta\gamma$. Hay 23 tipos (incluyendo algunas isoformas de corte y empalme) de subunidades α , 6 de β , y 11 de γ descritas actualmente. Las clases de proteínas G y subunidades se escriben como subíndice: por tanto, por ejemplo, la subunidad α de la proteína G_s (que activa la adenilato ciclasa) es $G_{\alpha s}$; otras proteínas G incluyen G_i , que difiere de G_s estructuralmente (diferente tipo de subunidad α) e inhibe la adenilato ciclasa. En la tabla 1 se facilitan ejemplos adicionales.

Normalmente, en la naturaleza, las proteínas G están en una forma unida a nucleótido. Más específicamente, las proteínas G (o al menos la subunidad α) están unidas o bien a GTP o bien a GDP dependiendo del estado de activación de un GPCR particular. La unión de un agonista a un GPCR promueve interacciones con el heterotrímero $G_{\alpha\beta\gamma}$ unido a GDP lo que conduce a intercambio de GDP por GTP en G_{α} , y a la disociación funcional de la proteína G en las subunidades G_{α} -GTP y $G_{\beta\gamma}$. Las subunidades G_{α} -GTP y $G_{\beta\gamma}$ separadas pueden modular, o bien independientemente o bien en paralelo, efectores celulares aguas abajo (canales, cinasas u otras enzimas, véase la tabla 1). La actividad GTPasa intrínseca de G_{γ} conduce a hidrólisis de GTP para dar GDP y la asociación de nuevo de las subunidades G_{α} -GDP y $G_{\beta\gamma}$, y la terminación de la señalización. Por tanto, las proteínas G sirven como interruptores moleculares regulados que pueden provocar señales de bifurcación a través de efectos en las subunidades α y $\beta\gamma$. El interruptor se activa por el receptor y se desactiva por sí mismo en el plazo de algunos segundos, un tiempo suficiente para la amplificación considerable de la transducción de señales.

Los “receptores acoplados a proteínas G”, o “GPCR”, tal como se usan en el presente documento, son 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 extensión se identifica por un número, es decir, transmembrana-1 (TM1), transmembrana-2 (TM2), etc. Las hélices transmembrana se unen mediante 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 mediante 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 “carboxilo” (“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 son fácilmente identificables mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos primaria de un GPCR.

La estructura y la clasificación del GPCR generalmente se conoce bien en la técnica y pueden encontrarse comentarios adicionales de 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-Funtion 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 en varias familias distintas. Aunque todos los GPCR tienen una arquitectura similar de siete hélices α que abarcan la membrana, las diferentes familias dentro de esta clase de receptores no muestran homología de secuencia entre sí, lo que sugiere por tanto que la similitud de su estructura de dominios transmembrana podría definir requisitos funcionales comunes. Una perspectiva global del repertorio de GPCR fue posible cuando estuvo disponible el primer borrador del genoma humano. Fredriksson y sus colegas dividieron 802 GPCR humanos en familias basándose en criterios filogenéticos. Esto mostró que la mayor parte de los GPCR humanos pueden encontrarse en cinco familias principales, denominadas rodopsina, adhesión, secretina, glutamato, frizzled/taste2 (Fredriksson *et al.*, 2003).

Los miembros de la familia de rodopsina (correspondiente a la clase A (Kolakowski, 1994) o la clase 1 (Foord *et al.* (2005) en los sistemas de clasificación antiguos) sólo tienen pequeños bucles extracelulares y la interacción de los ligandos se produce con residuos dentro de la hendidura transmembrana. Es con diferencia el grupo más grande (>90% de los GPCR) y contiene receptores para pequeñas moléculas de olor tales como catecolaminas y aminas, (neuro)péptidos y hormonas de glicoproteína. La rodopsina, un representante de esta familia, es el primer GPCR para el que se ha resuelto la estructura (Palczewski *et al.*, 2000). β 2-AR, el primer receptor que interacciona con un ligando difusible para el que se ha resuelto la estructura (Rosenbaum *et al.*, 2007) también pertenece a esta familia. Basándose en el análisis filogenético, los receptores de clase 2 o GPCR de clase B (Foord *et al.*, 2005) se han subdividido recientemente en dos familias: 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 al ligando. Se sabe poco sobre la orientación de los dominios transmembrana, pero probablemente es bastante diferente de la de rodopsina. Los ligandos para estos GPCR son hormonas, tales como glucagón, secretina, hormona liberadora de gonadotropina y hormona paratiroidea. Los receptores de la familia del glutamato (receptores de clase C o clase 3) también tienen un gran dominio extracelular, que funciona como la planta carnívora "Venus atrapamoscas" puesto que puede abrirse y cerrarse con el agonista unido dentro. Los miembros de la familia son receptores metabotrópicos de glutamato, de detección de Ca^{2+} y de ácido γ -aminobutírico (GABA)-B.

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

Por tanto, en el presente documento se proporcionan dominios de unión que se dirigen contra y/o se unen específicamente a complejos GPCR:proteína G, en los que la proteína G se selecciona del grupo que consiste en Gs, Gi, Go, Gt, Ggust, Gz, Golf, Gq, G12 y G13. Preferiblemente, la proteína G es Gs. En otro ejemplo preferido, la proteína G es Gi. Todavía en otro ejemplo preferido, la proteína G es Gt, más específicamente transducina. En correspondencia con ello, el GPCR comprendido dentro del complejo se selecciona del grupo que consiste en un receptor acoplado a Gs, un receptor acoplado a Gi, un receptor acoplado a Go, un receptor acoplado a Gt, un receptor acoplado a Ggust, un receptor acoplado a Golf, un receptor acoplado a Gq, un receptor acoplado a G12 y un receptor acoplado a G13. En un ejemplo preferido, el GPCR es un receptor acoplado a Gs. En otro ejemplo preferido, el GPCR es un receptor acoplado a Gi. Todavía en otro ejemplo preferido, el GPCR es un receptor acoplado a Gt, más específicamente rodopsina. En la tabla 1 se facilitan ejemplos no limitativos particulares.

Tabla 1. Ejemplos no limitativos de la relación de receptores acoplados a proteínas G y rutas de señalización.

Familia de proteínas G	Subunidad α	Efectores/rutas de señalización	Uso/receptores
Familia de Gi			
Gi Go	α_i α_o	Inhibición de adenilato ciclasa (AMPc $\downarrow$) Cierre de los canales de Ca^{2+} (Ca^{2+} $\downarrow$)	Receptores de acetilcolina M2 y M4 Receptores de adenosina A1 y A3 Receptores adrenérgicos α_2A , α_2B y α_2C Receptores de apelin Receptores de detección de calcio Receptor de quimiocina CXCR4 Dopamina D2, D3, D4 Receptor de GABAB Receptores de glutamato mGluR2, mGluR3,

			mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8 Receptores de histamina H2 y H3 y H4 Receptores de melatonina MT1, MT2 y MT3 Receptores muscarínicos M2 y M4 Receptores de opioides δ , κ , μ y noriceptina Receptores de prostaglandinas EP1, EP3, FP y TP Receptores de serotonina 5-HT1 y 5-HT5
Gt	αt (transducina)	Activación de fosfodiesterasa 6 (visión)	Rodopsina
Ggust	$\alpha gust$ (gustducina)	Activación de fosfodiesterasa 6 (visión)	Receptores de sabor
Gz	αz	Inhibición de adenilato ciclasa (AMPc ↓)	Desconocido
Familia de Gs			
Gs	αs	Activación de adenilato ciclasa (AMPc ↑)	Receptores de 5-HT tipos 5-HT4 y 5-HT7 Receptor de ACTH Receptor de adenosina tipos A2a y A2b Receptor de arginina-vasopresina 2 Receptores β -adrenérgicos tipos $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ Receptor de calcitonina Receptor de péptido relacionado con gen de calcitonina Receptor de hormona de liberación de corticotropina Familia similar a D1 de receptores de dopamina (D1 y D5) Receptor de FSH Receptor de polipéptido inhibidor gástrico Receptor de glucagón Receptor de histamina H2 Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina Receptor de menocortina Receptor de hormona paratiroidea 1 Receptor de prostaglandina tipos D2 e I2 Receptor de secretina Receptor de tirotrina
Golf	αolf	Activación de adenilato ciclasa (AMPc ↑)	Receptores olfativos
Familia Gq			
Gq	αq	Activación de fosfolipasa C (IP_3 ↑)	Receptores serotoninérgicos 5-HT2 Receptor alfa-1 adrenérgico Receptor de vasopresina tipo 1 Receptor de angiotensina tipo 1 Receptor de calcitonina Receptor de histamina H1 Receptor metabotrópico de glutamato, grupo I Receptores muscarínicos M1, M3 y M5
Familia G12/13			
G12	$\alpha 12$	Intercambio de Na^+/H^+ ↑	
	Subunidad $\beta\gamma$	Efectores/rutas de señalización	
	$\beta\gamma$	Apertura de canales de K^+ (K^+ ↑)	
	$\beta\gamma$	Adenilato ciclasa (AMPc) ↑ o ↓	
	$\beta\gamma$	Fosfolipasa C (IP_3)	

Generalmente, los dominios de unión tal como se describe en el presente documento se unirán al menos a aquellas formas de complejos GPCR:proteína G que sean más relevantes desde un punto de vista biológico y/o terapéutico, tal como estará claro para el experto en la técnica. Por tanto, se entenderá que, dependiendo del fin y de la

aplicación, el GPCR y la proteína G comprendidos en el complejo diana pueden producirse de manera natural o pueden producirse de manera no natural (es decir, pueden alterarse por el hombre). El término “que se produce de manera natural”, tal como se usa en el presente documento, significa un GPCR o una proteína G que se producen de manera natural. En particular, las isoformas y variantes polimórficas de tipo silvestre de GPCR y proteínas G, así como ortólogos a través de diferentes especies son ejemplos de proteínas que se producen de manera natural y se encuentran 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). Por tanto, tales GPCR o proteínas G se encuentran en la naturaleza. El término “que no se produce de manera natural”, tal como se usa en el presente documento, significa un GPCR o una proteína G que no se produce de manera natural. En determinadas circunstancias, puede ser ventajoso que el GPCR y/o la proteína G comprendidos en el complejo sean proteínas que no se producen de manera natural. Por ejemplo, y únicamente para fines de ilustración, podría desearse aumentar la probabilidad de obtener cristales de un complejo GPCR:proteína G estabilizados por los dominios de unión descritos en el presente documento, para realizar cierta modificación por ingeniería genética de proteínas sin afectar o afectando sólo mínimamente a la afinidad de unión al ligando. O, de manera alternativa o adicional, para aumentar los niveles de expresión celular de un GPCR y/o una proteína G, o para aumentar la estabilidad, también podría considerarse introducir determinadas mutaciones en el GPCR y/o la proteína G de interés. Los ejemplos no limitativos de GPCR que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, GPCR que se han hecho constitutivamente activos a través de mutación, GPCR con una delección de bucle, GPCR con una delección en el extremo N- y/o C-terminal, GPCR con una sustitución, una inserción o adición, o cualquier combinación de los mismos, en relación con su secuencia de aminoácidos o nucleótidos, u otras variantes de GPCR que se producen de manera natural. De manera similar, los ejemplos no limitativos de proteínas G que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, proteínas G con una delección en el extremo N- y/o C-terminal, proteínas G con una sustitución, una inserción o adición, o cualquier combinación de los mismos, en relación con su secuencia de aminoácidos o nucleótidos, u otras variantes de proteínas G que se producen de manera natural. También están comprendidos en el presente documento complejos GPCR:proteína G 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 comprenden un GPCR unido a un resto, tal como lisozima de T4 (véase también la sección de ejemplos).

Un GPCR o proteína G que no se produce de manera natural, comprendido en el complejo GPCR:proteína G, 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 o proteína G que se produce de manera natural. Para ilustrar esto adicionalmente, y tomando el receptor adrenérgico β_2 como ejemplo no limitativo particular de un GPCR, debe quedar claro a partir de lo anterior que además del receptor adrenérgico β_2 humano (por ejemplo, la secuencia descrita por el número de registro de GenBank NP_000015), también están englobados el receptor adrenérgico β_2 de ratón (por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NM 007420) u otro receptor adrenérgico β_2 de mamífero. También se prevén variantes polimórficas de tipo silvestre y otras determinadas variantes activas del receptor adrenérgico β_2 de una especie particular. Por ejemplo, “el receptor adrenérgico β_2 humano” tiene 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% al “adrenorreceptor β_2 humano” que se produce de manera natural del número de registro de GenBank NP_000015. De manera análoga, y tomando $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha t}$ como ejemplos no limitativos particulares de subunidades de proteínas G, debe quedar claro a partir de lo anterior que además de las $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$ o $G_{\alpha t}$ humanas, están englobadas las proteínas $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$ o $G_{\alpha t}$ de ratón u otras proteínas $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$ o $G_{\alpha t}$ de mamífero. También se prevén variantes polimórficas de tipo silvestre y otras determinadas variantes activas de $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$ o $G_{\alpha t}$ de una especie particular. Por ejemplo, una “ $G_{\alpha s}$ humana” o una “ $G_{\alpha i}$ humana” o una “ $G_{\alpha t}$ humana” tiene 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, idéntica en al menos el 99% a “ $G_{\alpha s}$ humana” o “ $G_{\alpha i}$ humana” o “ $G_{\alpha t}$ humana” que se produce de manera natural de número de registro de Genbank P63092, P63096 y P11488, respectivamente. Además, existen muchas isoformas de subunidades de proteínas G, incluyendo por ejemplo isoformas de proteínas G_s y G_i ($G_{\alpha s}$: GNAS; $G_{\alpha 0}$: GNAO1; $G_{\alpha i}$: GNAI1 o GNAI2 o GNAI3; G_{β} : GNB1 o GNB2 o GNB3 o GNB4 o GNB5 o GNB1L o GNB2L; G_{γ} : GNGT1 o GNGT2 o GNG2 o GNG3 o GNG4 o GNG5 o GNG7 o GNG8 o GNG10 o GNG11 o GNG12 o GNG13; según la nomenclatura normalizada de HGNC para genes humanos; los números de registro de diferentes isoformas de diferentes organismos están disponibles de www.uniprot.org). Algunos ejemplos particulares de isoformas de subunidades de proteínas G se facilitan en la tabla 5. El experto apreciará que las secuencias de aminoácidos de las diferentes subunidades de proteínas G están conservadas en casi el 100%, si no en el 100%, a través de las especies y los organismos. De manera notable, la alineación de secuencias de la secuencia de aminoácidos de la subunidad β humana, de ratón y bovina de la proteína G revela que las secuencias de aminoácidos entre estos organismos están conservadas en un 100%. De manera análoga, las secuencias de aminoácidos de la subunidad γ humana, de ratón y bovina de la proteína G son idénticas en el 100%. Las secuencias de aminoácidos de $G_{\alpha s}$ de rata y ratón también son idénticas en el 100%, mientras que $G_{\alpha s}$ humana y bovina sólo difieren en 1 ó 2 aminoácidos, respectivamente. Por tanto, se espera que los dominios de unión dirigidos contra y/o que se unen específicamente a un complejo GPCR:proteína G, y particularmente la unión a la proteína G comprendida en el complejo, sean reactivos de manera cruzada. También quedará claro que el GPCR y proteína G comprendidos en el complejo diana pueden proceder de especies iguales o diferentes. Preferiblemente, el GPCR y/o la proteína G son una proteína de mamífero, o una proteína de planta, o una proteína

microbiana, o una proteína vírica, o una proteína de insecto. Más preferiblemente, el GPCR es una proteína humana.

También se espera que los dominios de unión descritos en el presente documento puedan unirse generalmente a complejos GPCR:proteína G que comprenden todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes, fragmentos e isoformas que se producen de manera natural o sintéticos de un GPCR y/o proteína G particulares comprendidos en el complejo; o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes, fragmentos e isoformas de un GPCR y/o proteína G particulares comprendidos en el complejo que contienen uno o más determinantes antigénicos o epítomos que son esencialmente iguales que el/los determinante(s) antigénico(s) o epítomo(s) a los que se unen los dominios de unión descritos en el presente documento a un GPCR y/o proteína G particulares comprendidos en el complejo.

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 complejo GPCR:proteína G diana, incluyendo por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, presentación en fagos, y similares, que son práctica común en la técnica, por ejemplo, tal como 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 este fin, a menudo se usará una etiqueta o marcador único, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o una etiqueta de radiofrecuencia, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

El dominio de unión contra un complejo GPCR:proteína G puede unirse con mayor afinidad al complejo en comparación con la unión a la proteína G sola y/o al GPCR solo, respectivamente. En un ejemplo, el dominio de unión contra un complejo GPCR:proteína G se une específicamente al GPCR comprendido en el complejo, y no a la proteína G. Preferiblemente, en otro ejemplo, el dominio de unión contra un complejo GPCR:proteína G se une específicamente a la proteína G comprendida en el complejo, y no al GPCR. Más específicamente, el dominio de unión contra un complejo GPCR:proteína G se une específicamente a la proteína G que es una proteína Gs comprendida en un complejo de un receptor acoplado a Gs y una proteína Gs.

Se conoce bien que los GPCR son proteínas de membrana conformacionalmente complejas que presentan un espectro de comportamiento funcional en respuesta a ligandos naturales y sintéticos. En la naturaleza, un GPCR unido a ligando puede asociarse con una proteína G en un complejo que representará un estado conformacional funcional particular, más específicamente un estado conformacional activo, dando como resultado una actividad biológica particular. La presente memoria descriptiva ofrece la ventaja particular de que los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden estabilizar diversas de estas conformaciones activas de los GPCR en complejo con una proteína G y unirse a diversos ligandos naturales o sintéticos. Un experto en la técnica reconocerá que los dominios de unión que se unen específicamente a un complejo ligando:GPCR:proteína G estabilizarán la conformación específica del GPCR comprendido en el complejo. Preferiblemente, el dominio de unión puede estabilizar, o aumentar de otro modo la estabilidad de un estado conformacional funcional particular de un complejo GPCR:proteína G, preferiblemente en el que el GPCR está en un estado conformacional activo. Generalmente, un estado conformación funcional de dicho GPCR puede ser un estado conformacional basal, o un estado conformacional activo o un estado conformacional inactivo. Preferiblemente, el dominio de unión descrito en el presente documento puede estabilizar un GPCR en su estado conformacional activo y/o puede bloquear el GPCR en un estado conformacional activo tras la unión al complejo GPCR:proteína G, esté o no en presencia de un ligando de receptor.

Se prevé que el dominio de unión se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor (tal como se define en el presente documento). Más preferiblemente, el dominio de unión se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que consiste en un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor. Un ligando de receptor puede ser un compuesto pequeño, un péptido, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, y similar, que desencadena una respuesta tras la unión. Los ligandos de receptor, o simplemente ligandos, tal como se usa en el presente documento pueden ser ligandos ortostéricos (tanto naturales como sintéticos) que se unen al sitio activo del receptor y se clasifican según su eficacia o en otras palabras según el efecto que tienen sobre la señalización del receptor 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 al receptor, aumenta la actividad de señalización del receptor. Los agonistas completos pueden realizar una estimulación de receptor máxima; los agonistas parciales no pueden provocar una 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" 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, para bloquear la actividad inducida por el agonista. Además, un "agonista inverso" se refiere a un antagonista que, además de bloquear los efectos del agonista, reduce la actividad basal o constitutiva de los receptores por debajo de la del receptor no ligado. Preferiblemente, el dominio de unión tal como se describe en el presente documento se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor, en el que el ligando de receptor es un agonista. Más específicamente, el agonista se une al receptor en el sitio ortostérico.

Las actividades de señalización de los GPCR (y por tanto, su comportamiento conformacional) también pueden resultar afectadas por la unión de otro tipo de ligandos conocidos como reguladores alostéricos. Los “reguladores alostéricos” o de otro modo “moduladores alostéricos” o “moléculas efectoras” se unen en un sitio alostérico de un GPCR (es decir, un sitio regulador físicamente distinto del sitio activo de la proteína). A diferencia de los ligandos ortostéricos, los moduladores alostéricos no son competitivos porque se unen a receptores en un sitio diferente y modifican la función del receptor aunque el ligando endógeno también esté uniéndose. Debido a esto, los moduladores alostéricos no se limitan a simplemente activar o desactivar un receptor, el modo en que actúan la mayoría de los fármacos. En cambio, actúan más como un interruptor de atenuación, ofreciendo control sobre la intensidad de activación o desactivación, a la vez que permiten que el cuerpo mantenga su control natural sobre el inicio de la activación del receptor, alterando la afinidad del receptor por su ligando (endógeno). Los reguladores alostéricos que potencian la actividad de la proteína se denominan en el presente documento “activadores alostéricos” o “moduladores alostéricos positivos”, mientras que los que disminuyen la actividad de la proteína se denominan en el presente documento “inhibidores alostéricos” o de otro modo “moduladores alostéricos negativos”. Por tanto, por ejemplo, el dominio de unión descrito en el presente documento puede dirigirse contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor, en el que el ligando de receptor es un modulador alostérico, preferiblemente un modulador alostérico positivo. Más específicamente, el modulador alostérico positivo se une al receptor en un sitio alostérico.

Tal como se explica, la vista canónica de cómo los GPCR regulan la fisiología celular es que la unión de ligandos (tales como hormonas, neurotransmisores o estímulos sensoriales) estabiliza un estado conformacional activo del receptor, permitiendo de ese modo interacciones con proteínas G heterotriméricas. Además de interactuar con las proteínas G, los GPCR unidos a agonistas se asocian con GPCR cinasas (GRK), conduciendo a la fosforilación del receptor. Un resultado común de la fosforilación del GPCR por las GRK es una disminución en las interacciones del GPCR con las proteínas G y un aumento en las interacciones del GPCR con arrestinas, que impiden estéricamente la señalización adicional de las proteínas G, dando como resultado la desensibilización del receptor. Puesto que las β -arrestinas desactivan las señales de las proteínas G, pueden iniciar simultáneamente un segundo conjunto paralelo de cascadas de señales, tales como la ruta de MAPK. Los GPCR también se asocian con diversas proteínas fuera de las familias de las proteínas generales que interactúan con GPCR (proteínas G, GRK, arrestinas y otros receptores). Estos componentes selectivos del GPCR pueden mediar la señalización del GPCR, organizar la señalización del GPCR a través de las proteínas G, dirigir el tráfico de GPCR, anclar los GPCR en áreas subcelulares particulares y/o influir en la farmacología del GPCR (Ritter y Hall 2009). Con respecto a esto, los ligandos tal como se usan en el presente documento también pueden ser “ligandos sesgados” con capacidad para estimular selectivamente un subconjunto de actividades de señalización de un receptor, por ejemplo la activación selectiva de la función de las proteínas 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 de ligando de múltiples actividades de receptor con diferentes eficacias relativas para diferentes señales (selectividad no absoluta) o puede ser un sesgo perfecto caracterizado por una estimulación de ligando de una actividad de receptor sin ninguna estimulación de otra actividad de receptor conocida. Por tanto, por ejemplo, el dominio de unión descrito en el presente documento puede dirigirse contra y/o unirse específicamente a un complejo que comprende un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor, en el que el ligando de receptor es un ligando sesgado.

Además, se prevé particularmente que el dominio de unión descrito en el presente documento dirigido contra y/o que se une específicamente a un complejo GPCR:proteína G, tal como se describió anteriormente en el presente documento, se deriva de un sistema inmunitario innato o adaptativo. Preferiblemente, dicho dominio de unión se deriva de una inmunoglobulina. Preferiblemente, el dominio de unión descrito en el presente documento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El término “anticuerpo” (Ab) se refiere generalmente a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, que se une y reconoce específicamente por un antígeno, y que conoce el experto en la técnica. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) convencional comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadena polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a esas cadenas ligera y pesada, respectivamente. El término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos de cadena sencilla, y fragmentos de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno pueden incluir, pero no se limitan a, Fab, Fab’ y F(ab’)2, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por puentes disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o que consisten en cualquiera de un dominio VL o VH, y cualquier combinación de estos o cualquier otra parte funcional de un péptido de inmunoglobulina que puede unirse al antígeno diana. El término “anticuerpos” también pretende incluir anticuerpos de cadena pesada, o fragmentos funcionales de los mismos, tales como anticuerpos de dominio individual, más específicamente, dominios variables individuales de inmunoglobulina tales como VHH o Nanobodies, tal como se define adicionalmente en el presente documento.

Preferiblemente, el dominio de unión descrito en el presente documento es un dominio variable individual de inmunoglobulina. Más preferiblemente, dicho dominio de unión es un dominio variable individual de inmunoglobulina

que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de marco (de FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3), preferiblemente según la fórmula siguiente (1):

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1),

5 o cualquier fragmento adecuado del mismo (que entonces contendrá habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad).

El experto en la técnica conoce dominios de unión que comprenden 4 FR y 3 CDR y se han descrito, como ejemplo no limitativo, en Wesolowski *et al.* (2009, Med. Microbiol. Immunol. 198:157). Ejemplos típicos, pero no limitativos, de dominios variables individuales de inmunoglobulina incluyen secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de dominio V_L), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de dominio V_H) que se derivan habitualmente de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas. Preferiblemente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina se derivan de anticuerpos de camélido, preferiblemente de anticuerpos de camélido de cadena pesada, desprovistos de cadenas ligeras, y se conocen como secuencias de dominio de V_HH o Nanobodies (tal como se describe adicionalmente en el presente documento).

15 El término "Nanobody" (Nb), tal como se usa en el presente documento, se refiere al fragmento de unión a antígeno más pequeño o dominio variable individual (V_HH) derivado de un anticuerpo de cadena pesada que se produce de manera natural y que conoce el experto en la técnica. Se derivan de anticuerpos sólo de cadena pesada, observados en camélidos (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Desmyter *et al.* 1996). En la familia de "camélidos" se encuentran inmunoglobulinas desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras. Los "camélidos" comprenden camélidos del Viejo Mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y camélidos del Nuevo Mundo (por ejemplo *Lama paccos*, *Lama glama*, *Lama guanicoe* y *Lama vicugna*). Dicho anticuerpo de cadena pesada de dominio variable individual está diseñado en el presente documento como un Nanobody o un anticuerpo V_HH. Nanobody™ y Nanobodies™ son marcas comerciales de Ablynx NV (Bélgica). El pequeño tamaño y las propiedades biofísicas únicas de los Nb superan a las de los fragmentos de anticuerpo convencionales para el reconocimiento de epítopos poco frecuentes u ocultos y para su unión en cavidades o sitios activos de dianas proteicas. Además, los Nb pueden diseñarse como anticuerpos multiespecíficos y/o multivalentes o unidos a moléculas indicadoras (Conrath *et al.* 2001). Los Nb son proteínas de dominio individual rígido y estable que pueden fabricarse fácilmente y sobrevivir en el sistema gastrointestinal. Por tanto, los Nb pueden usarse en muchas aplicaciones incluyendo el descubrimiento de fármacos y la terapia (Saerens *et al.* 2008) pero también como una herramienta versátil y valiosa para la purificación, el estudio funcional y la cristalización de proteínas (Conrath *et al.* 2009). Una clase particular de Nanobodies que actúan como chaperonas de cristalización que se unen a epítopos conformacionales de dianas nativas se denominan Xaperones y se prevén particularmente en el presente documento. Xaperones son herramientas únicas en la biología estructural. Xaperone™ es una marca comercial de VIB y VUB (Bélgica). Las principales ventajas del uso de fragmentos de anticuerpos de camélidos como ayuda en la cristalización son que las Xaperones (1) se unen a epítopos crípticos y bloquean a las proteínas en conformaciones nativas únicas, (2) aumentan la estabilidad de proteínas solubles y proteínas de membrana solubilizadas, (3) reducen la complejidad conformacional de las 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 la proteína activa.

40 Por tanto, los dominios variables individuales de inmunoglobulina descritos en el presente documento, en particular los Nanobodies de la invención, comprenden generalmente una cadena de aminoácido individual que normalmente comprende 4 "secuencias de región de marco" o FR y 3 "regiones determinantes de complementariedad" o CDR según la fórmula (1)

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1).

45 El término "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a regiones variables en dominios variables individuales de inmunoglobulina y contiene las secuencias de aminoácidos que pueden unirse específicamente a dianas antigénicas. Estas regiones CDR representan la especificidad básica del Nanobody para una estructura de determinante antigénico particular. Tales regiones también se denominan "regiones hipervariables". Los dominios variables individuales de inmunoglobulina tienen 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas CDR1, CDR2, CDR3). Debe quedar claro que las regiones de marco de dominios variables individuales de inmunoglobulina también pueden contribuir a la unión de sus antígenos (Desmyter *et al.* 2002; Korotkov *et al.* 2009). Los ejemplos no limitativos de tales dominios variables individuales de inmunoglobulina tal como se describe en el presente documento así como combinaciones particulares de FR y CDR son tal como se describe en el presente documento (véanse las tablas 2-3). La delineación de las secuencias de CDR (y por tanto también de las secuencias de FR) se basa en el sistema de numeración único 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 tal como se aplica a los dominios V_HH de Camélidos en el artículo de Riechmann y Muirdermans (2000). Tal como conocerá el experto en la técnica, los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, pueden caracterizarse 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, incorporada en el presente documento como referencia).

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina están dotados en el presente documento de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de marco (de FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que las secuencias de CDR de dichas secuencias de aminoácidos tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, preferiblemente una identidad de aminoácidos de al menos el 80%, más preferiblemente una identidad de aminoácidos de al menos el 90%, tal como una identidad de aminoácidos de al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 100% con las secuencias de CDR (véase la tabla 3) de al menos uno de los dominios variables individuales de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1-6, preferiblemente SEQ ID NO: 1 y/o 4. 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 individuales de inmunoglobulina, se desestiman los residuos de aminoácido que forman las regiones de marco. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de dominios variables individuales de inmunoglobulina se facilitan en las SEQ ID NO: 1 a 6, preferiblemente SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4 (véase la tabla 2).

Debe indicarse que los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular 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, los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, pueden obtenerse generalmente: (1) mediante el aislamiento del dominio $V_{H/H}$ de un anticuerpo de cadena pesada que se produce de manera natural; (2) mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio $V_{H/H}$ que se produce de manera natural; (3) mediante la "humanización" de un dominio $V_{H/H}$ que se produce de manera natural o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para un dominio $V_{H/H}$ humanizado de este tipo; (4) mediante la "camelización" de un dominio VH que se produce de manera natural a partir de cualquier especie animal, y en particular de una especie de mamífero, tal como a partir de un ser humano, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para un dominio VH camelizado de este tipo; (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 un dominio VH camelizado de este tipo; (6) mediante el uso de técnicas sintéticas o semisintéticas 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 ácido nucleico 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 clase preferida de dominios variables individuales de inmunoglobulina corresponde a los dominios $V_{H/H}$ de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural dirigidos contra un complejo diana de un GPCR y una proteína G. Aunque las bibliotecas no inmunitarias o sintéticas de dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden contener agentes de unión conformacionales contra el complejo diana, un ejemplo preferido incluye la inmunización de un *Camelidae* con un complejo diana para exponer el sistema inmunitario del animal con los epítopos conformacionales que son únicos para el complejo. Pueden inmunizarse animales con mezclas de monómeros de interacción. Opcionalmente, el complejo puede estabilizarse mediante reticulación química o mediante la adición de ligandos/metabolitos cooperativos/alostéricos que estabilizan el complejo (agonistas ortostéricos, activadores alostéricos, Ca^{++} , ATP, ...). El complejo también puede estabilizarse mediante la modificación covalente (fosforilación, ...) de (uno de) los miembros del complejo. Alternativamente, también podrían inmunizarse *Camelidae* con el GPCR y/o la proteína G sola, por tanto no en complejo entre sí. Opcionalmente, el GPCR y/o la proteína G también pueden estabilizarse, por ejemplo, mediante la adición de ligandos/metabolitos cooperativos/alostéricos que estabilizan el GPCR y/o la proteína G (agonistas ortostéricos, activadores alostéricos, Ca^{++} , ATP, entre otros).

Por tanto, tales secuencias de $V_{H/H}$ pueden generarse u obtenerse generalmente mediante la inmunización adecuada de una especie de camélido con un complejo diana (que comprende un GPCR y una proteína G, o con una cualquiera o ambas de sus proteínas miembro constituyentes, (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra un complejo diana), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho camélido (tal como una muestra de sangre, o cualquier muestra de células B), y generando secuencias de $V_{H/H}$ dirigidas contra un complejo diana, partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*. Tales técnicas estarán claras para el experto. Alternativamente, tales dominios $V_{H/H}$ que se producen de manera natural pueden obtenerse de bibliotecas no inmunitarias de secuencias de $V_{H/H}$ de camélido, por ejemplo examinando una biblioteca de este tipo usando un complejo diana o al menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítopo del mismo usando una o más técnicas de examen conocidas *per se*. Tales bibliotecas y técnicas se describen por ejemplo en los documentos WO9937681, WO0190190, WO03025020 y WO03035694. Alternativamente, pueden usarse bibliotecas sintéticas o semisintéticas mejoradas derivadas de bibliotecas de $V_{H/H}$ no inmunitarias, tales como bibliotecas de $V_{H/H}$ obtenidas de bibliotecas de $V_{H/H}$ no inmunitarias mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o transposiciones de CDR, tal como se describe por ejemplo en el documento WO0043507. Aún otra técnica para obtener secuencias de $V_{H/H}$ dirigidas contra una diana implica inmunizar de manera adecuada un mamífero transgénico que puede expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra una diana), obtener una

muestra biológica adecuada a partir de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre, o cualquier muestra de células B), y entonces generar secuencias de V_HH dirigidas contra una diana partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*. Por ejemplo, para este fin, pueden usarse ratones que expresan el anticuerpo de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en los documentos WO02085945 y en WO04049794.

Una clase particularmente preferida de dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular Nanobodies, comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_HH que se produce de manera natural, pero que se ha "humanizado", es decir mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de V_HH que se produce de manera natural (y en particular en las secuencias de región de marco) por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que estará clara para el experto, por ejemplo basándose en la descripción adicional en el presente documento y en la técnica anterior sobre humanización a la que se hace referencia en el presente documento. De nuevo, debe indicarse que tales dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida *per se* (es decir, tal como se indicó en los puntos (1) - (8) anteriormente) y por tanto no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_HH que se produce de manera natural como material de partida. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados, en particular los Nanobodies, pueden tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, en comparación con los dominios V_HH correspondientes que se producen de manera natural. Tal humanización generalmente implica reemplazar uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de un V_HH que se produce de manera natural por los residuos de aminoácido que aparecen en la misma posición en un dominio VH humano, tal como un dominio VH3 humano. Las sustituciones de humanización deben elegirse de manera que los dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados resultantes todavía conserven las propiedades favorables de los dominios variables individuales de inmunoglobulina tal como se define en el presente documento. El experto podrá seleccionar sustituciones de humanización o combinaciones adecuadas de sustituciones de humanización que optimizan o logran un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización por una parte y las propiedades favorables de los dominios V_HH que se producen de manera natural por otra parte.

Otra clase particularmente preferida de dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular Nanobodies, comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH que se produce de manera natural, pero que se ha "camelizado", es decir mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH que se produce de manera natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio V_HH de un anticuerpo de cadena pesada. Tales sustituciones de "camelización" se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácido que forman y/o están presentes en la superficie de contacto de VH-VL, y/o en los denominados residuos distintivos de *Camelidae*, tal como se define en el presente documento (véase por ejemplo el documento WO9404678). Preferiblemente, la secuencia de VH que se usa como material de partida o como punto de partida para generar o diseñar el Nanobody camelizado es preferiblemente una secuencia de VH de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de VH de un ser humano, tal como una secuencia de VH3. Sin embargo, debe indicarse que tales dominios variables individuales de inmunoglobulina camelizados pueden obtenerse de cualquier modo adecuado conocido *per se* (es decir, tal como se indicó en los puntos (1) - (8) anteriormente) y por tanto no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VH que se produce de manera natural como material de partida.

Por ejemplo, tanto la "humanización" como la "camelización" pueden realizarse proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio V_HH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, y cambiando entonces, de una manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifica para dominios variables individuales de inmunoglobulina "humanizados" o "camelizados", respectivamente. Este ácido nucleico puede expresarse entonces de una manera conocida *per se*, para proporcionar los dominios variables individuales de inmunoglobulina deseados. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_HH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, puede diseñarse la secuencia de aminoácidos de los dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados descritos en el presente documento, respectivamente, y sintetizarse luego *de novo* usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de dominio V_HH o dominio VH que se produce de manera natural, respectivamente, puede diseñarse una secuencia de nucleótidos que codifica para los dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados descritos en el presente documento, respectivamente, y sintetizarse luego *de novo* usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, tras lo cual el ácido nucleico así obtenido puede expresarse de una manera conocida *per se*, para proporcionar los dominios variables individuales de inmunoglobulina deseados. Otros métodos y técnicas adecuados para obtener los dominios variables individuales de inmunoglobulina descritos en el presente

documento y/o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, partiendo de secuencias de VH que se producen de manera natural o preferiblemente secuencias de V_HH, 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 (tal como una o más secuencias de FR y/o secuencias de CDR), una o más partes de una o más secuencias de V_HH que se producen de manera natural (tal como una o más secuencias de FR o secuencias de CDR), y/o una o más secuencias sintéticas o semisintéticas, de manera adecuada, para proporcionar un Nanobody o una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica para el mismo.

En el presente documento también se prevén análogos, mutantes, variantes, alelos, partes o fragmentos (en el presente documento denominados colectivamente “variantes”), naturales o sintéticos, de los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, tal como se define en el presente documento, y en particular variantes de los dominios variables individuales de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1-6 (véanse las tablas 2-3). Por tanto, el término “dominio variable individual de inmunoglobulina” o “Nanobody”, 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 individuales de inmunoglobulina 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 CDR de los dominios variables individuales de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1-6 (véanse las tablas 2-3). Variantes, tal como se usa en el presente documento, son secuencias en las que cada una o cualquier región de marco y cada una o cualquier región determinante de 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 (50, 51). El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<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 individuales de inmunoglobulina, se desestiman los residuos de aminoácido que forman las regiones de marco. 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 individuales de inmunoglobulina descritos en el presente documento, se desestiman los residuos de aminoácido que forman las regiones de complementariedad. Tales variantes de dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser particularmente ventajosas puesto que pueden tener potencia/afinidad mejoradas.

Por medio de ejemplos no limitativos, una sustitución puede ser por ejemplo una sustitución conservativa (tal como se describe en el presente documento) y/o un residuo de aminoácido puede reemplazarse por otro residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la misma posición en otro dominio V_HH. Por tanto, en el presente documento se incluyen una cualquiera o más sustituciones, deleciones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades de los dominios variables individuales de inmunoglobulina o que o bien al menos no restan demasiado valor a las propiedades deseadas o al equilibrio o la combinación de las propiedades deseadas del Nanobody de la invención (es decir, hasta el punto de que los dominios variables individuales de inmunoglobulina ya no sean adecuados para su uso previsto). Un experto generalmente podrá determinar y seleccionar 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 individuales de inmunoglobulina así obtenidos.

Las variantes particularmente preferidas de los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, descritas en el presente documento pueden tener una sustitución, deleción o inserción, de 1, 2 ó 3 aminoácidos en una cualquiera, dos o tres de las CDR, más específicamente una sustitución, deleción o inserción de 1, 2 ó 3 aminoácidos (i) en CDR1 o CDR2 o CDR3; (ii) en CDR1 y CDR2, o, en CDR1 y CDR3, o, en CDR2 y CDR3; (iii) en CDR1 y CDR2 y CDR3, de las que las secuencias de aminoácidos de las CDR se enumeran en la tabla 3. Más preferiblemente, las variantes de los dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular los Nanobodies, descritas en el presente documento pueden tener una sustitución conservativa (tal como se define en el presente documento) de 1, 2 ó 3 aminoácidos en una, dos o tres de las CDR, más específicamente (i) en CDR1 o CDR2 o CDR3; (ii) en CDR1 y CDR2, o, en CDR1 y CDR3, o, en CDR2 y CDR3; (iii) en CDR1 y CDR2 y CDR3, tal como se enumera en la tabla 3.

En el presente documento se proporciona un dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de marco (de FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3), según la fórmula siguiente (1):

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1);

y en la que CDR1 se elige del grupo que consiste en:

- a) las SEQ ID NO: 13-18,
 - b) polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con las SEQ ID NO: 13-18,
 - c) polipéptidos que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con las SEQ ID NO: 13-18,
- y en la que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

- 5 a) las SEQ ID NO: 25-30,
 - b) polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con las SEQ ID NO: 25-30,
 - c) polipéptidos que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con las SEQ ID NO: 25-30,
- y en la que CDR3 se elige del grupo que consiste en:
- a) las SEQ ID NO: 37-42,
 - 10 b) polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con las SEQ ID NO: 37-42,
 - c) polipéptidos que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con las SEQ ID NO: 37-42.

Un ejemplo particularmente preferido se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de marco (de FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3), según la fórmula siguiente (1):

- 15 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1);

en la que CDR1 es SEQ ID NO: 13; en la que CDR2 es SEQ ID NO: 25; y en la que CDR3 es SEQ ID NO: 37.

- Además, y dependiendo del organismo huésped usado para expresar el dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento, pueden diseñarse delecciones y/o sustituciones de tal manera que se retire uno o más sitios para modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glicosilación), lo que estará dentro de la capacidad del experto en la técnica. Alternativamente, pueden diseñarse sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe en el presente documento), por ejemplo para permitir pegilación específica de sitio.
- 20

- Ejemplos de modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácido dentro del dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina tal como se describe en el presente documento que pueden modificarse (es decir, o bien en la estructura principal de la proteína pero preferiblemente en una cadena lateral), los métodos y las técnicas que pueden usarse para introducir tales modificaciones y los usos y las posibles ventajas de tales modificaciones, estarán claros 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 dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas al dominio de unión previsto en el presente documento. Ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos estarán claros para el experto, y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y técnicas mencionados en la técnica así como los grupos funcionales y 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 dominio individual), para los que se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales pueden unirse por ejemplo directamente (por ejemplo, covalentemente) al dominio de unión, en particular al dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento, u opcionalmente a través de un grupo de unión o espaciador adecuado, tal como de nuevo estará claro para el experto. Una de las técnicas usadas más ampliamente para aumentar la semivida y/o reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo (tales como metoxipolietilenglicol o mPEG). Generalmente, puede usarse cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de dominio (individual) y ScFv); se hace referencia por ejemplo a Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en el documento WO04060965. También se dispone comercialmente de diversos reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo de Nektar Therapeutics, EE.UU. Preferiblemente, se usa pegilación dirigida al sitio, en particular a través de un residuo de cisteína (véase por ejemplo Yang *et al.*, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este fin, puede unirse PEG a un residuo de cisteína que se produce de manera natural en un dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento, un dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento puede modificarse para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG puede fusionarse al extremo N- y/o C-terminal de un Nanobody de la invención, en todos los
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

casos usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas *per se* por el experto. Preferiblemente, para el dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo en el intervalo de 20.000-80.000. Otra modificación, habitualmente menos preferida, comprende glicosilación con unión en N o unión en O, habitualmente como parte de la modificación co-traducional y/o postraducional, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento. Otra técnica para aumentar la semivida de un dominio de unión puede comprender la modificación por ingeniería genética para dar dominios de unión funcionales (por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulina contra el complejo GPCR:proteína G diana y uno contra una proteína sérica tal como albúmina) o para dar fusiones de dominios de unión, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, con péptidos (por ejemplo, un péptido contra una proteína sérica tal como albúmina).

Aun 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 dominio de unión marcado. Los marcadores y técnicas adecuadas para unirlos, usarlos y detectarlos estarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina y metales fluorescentes tales como Eu u otros metales de la serie de los lantánidos), marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes o marcadores bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos, metales, quelatos de metales o cationes metálicos u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para su uso en diagnóstico 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 levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinavidina 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 ESR o RMN. Tales dominios de unión 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 fines de diagnóstico y de obtención de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección del marcador específico. Tal como estará 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 hizo referencia anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen por ejemplo, sin limitación, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una 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 dominio de unión 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 dominio variable individual de inmunoglobulina 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, un dominio variable individual de inmunoglobulina conjugado puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico donde un agente de producción de señales detectables se conjuga con avidina o estreptavidina. Tales pares de unión también pueden usarse por ejemplo para unir el dominio variable individual de inmunoglobulina descrito en el presente documento a un portador, incluyendo portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones de liposomas 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 dominio de unión tal como se describe en el presente documento.

También se engloban en el presente documento dominios de unión, en particular los dominios variables individuales de inmunoglobulina descritos en el presente documento que están en una forma “multivalente” y se forman uniendo entre sí, químicamente o mediante técnicas de ADN recombinante, dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina monovalentes. Los ejemplos no limitativos de constructos multivalentes incluyen constructos “bivalentes”, constructos “trivalentes”, constructos “tetraivalentes”, etc. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprendidos dentro de un constructo multivalente pueden ser idénticos o diferentes. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina descritos en el presente documento también pueden estar en una forma “multiespecífica” y se forman uniendo entre sí dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, de los que al menos uno tiene una especificidad diferente. Los ejemplos no limitativos de constructos multiespecíficos incluyen constructos “bienespecíficos”, constructos “triespecíficos”, constructos “tetraespecíficos”, etc. Para ilustrar esto adicionalmente, puede dirigirse de manera adecuada cualquier dominio variable individual de inmunoglobulina multivalente o multiespecífico (tal como se define en el presente documento) descrito en el presente documento contra dos o más epítopos diferentes en el mismo antígeno, por ejemplo contra dos o más partes diferentes de la proteína G comprendida en el complejo GPCR:proteína G; o puede dirigirse contra dos o más antígenos diferentes, por ejemplo contra un epítipo del GPCR y un epítipo de la proteína G. En particular, un dominio variable individual de inmunoglobulina monovalente descrito en el presente documento es tal que se unirá al complejo GPCR:proteína G diana (tal como se describe en el presente documento) con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente de menos de 200 nM, más preferiblemente de menos de 10 nM, tal como de menos de 500 pM. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina multivalentes o multiespecíficos también pueden tener (o pueden modificarse por

ingeniería genética y/o seleccionarse para tener) avidez aumentada y/o selectividad mejorada para el complejo GPCR:proteína G deseado, y/o para cualquier otra propiedad deseada o combinación de propiedades deseadas que pueden obtenerse mediante el uso de tales dominios variables individuales de inmunoglobulina multivalentes o multispecíficos.

Además, el dominio de unión descrito en el presente documento, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina, puede dirigirse generalmente contra o unirse específicamente a cualquier epítipo conformacional que está representado por o al que puede acceder un complejo o parte de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G. Un dominio de unión que se une específicamente a un epítipo "tridimensional" o epítipo "conformacional" es un dominio de unión que se une específicamente a una estructura terciaria o cuaternaria de una proteína plegada o complejo de proteínas. Un dominio de unión de este tipo se une con una afinidad muy reducida (es decir, en un factor de al menos 2, 5, 10, 50 ó 100) a la cadena polipeptídica lineal (es decir, no plegada, desnaturalizada). La estructura a la que un dominio de unión de este tipo se une habitualmente contiene aminoácidos que son discontinuos en la secuencia lineal de la proteína (complejo). En otras palabras, la unión de un dominio de unión de este tipo a un polipéptido depende del polipéptido que está plegándose en una conformación tridimensional particular. Debe quedar claro que los epítopos conformacionales reconocidos selectivamente por los dominios de unión descritos en el presente documento pueden ser epítopos específicos de GPCR, o epítopos específicos de proteínas G, o de otro modo epítopos específicos de complejo GPCR:proteína G, que sólo se forman tras la asociación de las proteínas constituyentes, y por tanto combinando residuos de aminoácido de dicho GPCR y dicha proteína G. El dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina, puede unirse específicamente a cualquier epítipo conformacional de cualquier proteína G deseada o partes de la misma. Dicho epítipo conformacional puede ser parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o un dominio o estructura de bucle de cualquier GPCR deseado. Está claro que algunos de estos epítopos conformacionales serán accesibles en el GPCR y/o la proteína G en la forma no asociada, mientras que otros sólo serán accesibles una vez que se forma el complejo. El dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina, puede unirse específicamente a un epítipo conformacional en la superficie de contacto entre la subunidad α y la β de una proteína G, tal como se especifica como ejemplo no limitativo adicionalmente en el presente documento (véase la sección de ejemplos).

El dominio de unión puede unirse a un complejo GPCR:proteína G en el que la proteína G está en su forma libre de nucleótido. Además, el dominio de unión, en particular el dominio variable individual de inmunoglobulina, puede inhibir o impedir la disociación del complejo GPCR:proteína G en presencia de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina, tales como GDP o GTP, o análogos de los mismos, tal como análogos de GTP no hidrolizables, tales como GTP γ S, o GDP en combinación con especies de fluoruro de berilio o aluminio, o análogos mínimos de nucleótidos tales como pirofosfato o forcanet. En ausencia de los dominios de unión descritos en el presente documento, la disociación del complejo GPCR:proteína G normalmente se produce en presencia de estos nucleótidos.

También se proporciona en el presente documento un dominio de unión que se dirige contra o se une específicamente a una proteína G (es decir una proteína G sola, por tanto no en complejo con un GPCR). El dominio de unión tal como se describe en el presente documento puede dirigirse contra y/o unirse específicamente a una proteína Gs. El dominio de unión puede impedir o inhibir la unión de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina o análogos (tal como se describió anteriormente en el presente documento), a la proteína G. O también, el dominio de unión puede desplazar un nucleótido de guanina o análogo de la proteína G. Ejemplos no limitativos de ensayos para determinar el grado de inhibición de la unión o el desplazamiento de nucleótidos de guanina a una proteína se facilitan en la sección de ejemplos, por ejemplo en los ejemplos 3 y 8. Además, se apreciará que los dominios de unión, tal como se describió anteriormente en el presente documento, también se aplican para este aspecto particular.

La versatilidad funcional de los GPCR está acoplada de manera inherente a la flexibilidad de estas proteínas dando como resultado un espectro de conformaciones. El entorno energético conformacional está acoplado intrínsecamente a factores tales como la presencia de ligandos unidos (moléculas efectoras, agonistas, antagonistas, agonistas inversos, ...), el entorno lipídico o la unión de proteínas de interacción. Por tanto, los dominios de unión descritos en el presente documento, en particular los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden aumentar la estabilidad del complejo que comprende un GPCR y una proteína G tras la unión de dicho dominio de unión. La unión del dominio de unión descrito en el presente documento a cualquier epítipo conformacional que está representado por o al que puede acceder un complejo o parte de un complejo que comprende un complejo GPCR:proteína G, puede inducir la formación de un estado conformacional funcional de un GPCR, en particular un estado conformacional activo de dicho GPCR. Más específicamente, el dominio de unión descrito en el presente documento puede estabilizar el estado activo del GPCR comprendido en el complejo GPCR:proteína G, aumentando la afinidad de la proteína G por el receptor. Asimismo, el dominio de unión descrito en el presente documento puede estabilizar un complejo GPCR:proteína G unido a agonista y/o potenciar la afinidad de un agonista por un complejo GPCR:proteína G. Preferiblemente, el dominio de unión puede aumentar la afinidad de la proteína G por el GPCR y/o la afinidad del agonista por el complejo GPCR:proteína G al menos dos veces, al menos cinco veces, y más preferiblemente al menos diez veces, tal como se mide por una disminución en la K_d . Alternativamente, el dominio de unión puede inducir un cambio en CE_{50} o CI_{50} de al menos dos veces, al menos

cinco veces, y más preferiblemente al menos diez veces en cualquier configuración de ensayo en comparación con la fuerza de interacción del receptor y la proteína G en presencia del dominio de unión de estabilización de complejo frente a un estado en el que este dominio de unión está ausente o cualquier otra medida de afinidad o potencia conocida por un experto en la técnica.

El término “un estado conformacional funcional”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que las proteínas, en particular proteínas de membrana tales como GPCR, poseen muchos estados conformacionales diferentes que tienen un intervalo de actividad dinámico, en particular que oscila entre ausencia de actividad y actividad máxima (revisado en Kobilka y Deupi, 2007). Debe quedar claro que “un estado conformacional funcional” no pretende cubrir los estados desnaturalizados de proteínas. Por ejemplo, un estado conformacional basal puede definirse como un estado de baja energía del receptor en ausencia de un ligando. La probabilidad de que una proteína experimente una transición a otro estado conformacional es una función de la diferencia de energía entre los dos estados y la altura de la barrera de energía entre los dos estados. En el caso de una proteína receptora, tal como un GPCR, la energía de unión del ligando puede usarse o bien para alterar la barrera de energía entre los dos estados, o bien para cambiar los niveles de energía relativos entre los dos estados, o ambos. Cambiar la barrera de energía tendría un efecto sobre la velocidad de transición entre los dos estados, mientras que cambiar los niveles de energía tendría un efecto sobre la distribución en equilibrio de receptores en dos estados. La unión de un agonista o agonista parcial disminuirá la barrera de energía y/o reducirá la energía del estado conformacional más activo en relación con el estado conformacional inactivo. Un agonista inverso aumentará la barrera de energía y/o reducirá la energía de la conformación de estado inactivo en relación con la conformación activa. El acoplamiento del receptor a su proteína G podría alterar adicionalmente el entorno energético. Las interacciones cooperativas de $\beta 2AR$ y Gs observadas en ensayos de unión a ligando formaron la base del modelo de complejo ternario de la activación de GPCR (Delean *et al*, 1980). En el complejo ternario que consiste en agonista, receptor y proteína G, se potencia la afinidad del receptor por el agonista y la especificidad de la proteína G por nucleótidos de guanina cambia en favor de GTP con respecto a GDP.

Debe indicarse que las actividades de las proteínas integrales de membrana, incluyendo los GPCR también resultan afectadas por las estructuras de las moléculas lipídicas que las rodean en la membrana. Las proteínas de membrana son entidades no rígidas y se deforman para garantizar una buena correspondencia hidrófoba con la bicapa lipídica circundante. Un parámetro importante es el grosor hidrófobo de la bicapa lipídica, definido por las longitudes de las cadenas lipídicas de acilos grasos. Además, es probable que la estructura de la región del grupo de cabeza lipídico sea importante para definir las estructuras de aquellas partes de una proteína de membrana que están ubicadas en la región del grupo de cabeza lipídico. Entre otros lípidos, la palmitoilación y la unión de colesterol a los GPCR también pueden desempeñar un papel estructural dentro de los receptores monoméricos y contribuir a la formación/estabilización de oligómeros del receptor (Lee 2004; Chini y Parenti 2009).

Un aspecto adicional de la presente memoria descriptiva se refiere a un complejo que comprende un dominio de unión tal como se describe en el presente documento. Más específicamente, se proporciona un complejo que comprende un dominio de unión descrito en el presente documento, un GPCR, una proteína G, y opcionalmente un ligando de receptor. Como ejemplo no limitativo, un complejo estable puede purificarse mediante filtración en gel, tal como se realizó por ejemplo para el complejo cuaternario que contenía un Nanobody, un GPCR, una proteína G y un ligando de receptor (véase la sección de ejemplos). El complejo puede ser cristalino. Por consiguiente, también se proporciona un cristal del complejo, así como métodos de obtención de dicho cristal, que se describen en más detalle adicionalmente en el presente documento.

También se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos en el presente documento, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, y los ejemplos no limitativos se proporcionan en la tabla 4. En el presente documento se proporcionan secuencias de ácido nucleico de dominios de unión descritos en el presente documento, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, en las que las secuencias tienen una identidad de secuencia de más del 80%, preferiblemente de más del 90%, más preferiblemente de más del 95%, tal como del 99% o más (tal como se define en el presente documento) con las secuencias de al menos una de las secuencias de ácido nucleico de los dominios de unión de SEQ ID NO: 49-54 (véase la tabla 4). Para el cálculo del porcentaje de identidad de secuencia, deben desestimarse las secuencias de ácido nucleico de marcadores (por ejemplo, etiqueta de His o etiqueta de EPEA). Además, las secuencias de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento pueden estar comprendidas en una secuencia de ácido nucleico.

En el presente documento se prevén adicionalmente vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los dominios de unión descritos en el presente documento, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, 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 de virus, tales como baculovirus, virus del bosque Semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insecto o mamífero. La clonación, expresión y/o purificación de los dominios de unión descritos en el presente documento, en particular los dominios variables individuales de inmunoglobulina, pueden realizarse según técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Por tanto, en el presente documento se engloba una célula o un cultivo de células que expresan un dominio de unión

descrito en el presente documento, en particular un dominio variable individual de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G. Las células pueden ser de organismos procariotas o eucariotas. Preferiblemente, las células son células eucariotas, por ejemplo células de levadura, o células de insecto, o líneas celulares cultivadas, por ejemplo líneas celulares de mamífero, preferiblemente líneas celulares humanas, que expresan de manera endógena o recombinante un GPCR y/o proteína G de interés. La naturaleza de las células usadas normalmente dependerá de la facilidad y el coste de producción de la(s) proteína(s) nativa(s), de las propiedades de glicosilación deseadas, del origen de la proteína diana, de la aplicación deseada, o de cualquier combinación de los mismos. Las células o líneas celulares eucariotas para la producción de proteínas se conocen bien en la técnica, incluyendo líneas celulares con rutas de glicosilación modificadas, y se proporcionarán ejemplos no limitativos más adelante en el presente documento.

Las células huésped de animales o mamíferos adecuadas para albergar, expresar y producir proteínas para el aislamiento y/o purificación posteriores incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), tal como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin *et al.*, 1986, Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556; y Kolkekar *et al.*, 1997, Biochemistry, 36:10901-10909), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, RU), CHO clon 13 (GEIMG, Génova, IT), CHO clon B (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, RU), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, RU), células CHO negativas para dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216) y células dp12.CHO (patente estadounidense n.º 5.721.121); células CV1 de riñón de ratón transformadas mediante SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células de riñón embrionario humanas (por ejemplo, células 293, o células 293T, o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, 1977, J. Gen. Virol., 36:59, o células GnTI KO HEK293S, Reeves *et al.* 2002, PNAS, 99: 13419); 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); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23:243-251); células de cáncer de cuello uterino humanas (HELA, ATCC CCL-2); células de riñón de perro (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmón humanas (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humanas (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, Annals NYAcad. Sci., 383:44-68); células MCR 5; células FS4. Las células pueden ser células de mamífero seleccionadas de células Hek293 o células COS.

Las líneas celulares que no son de mamífero a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, células Sf9, sistemas de baculovirus-célula de insecto (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*. En particular, las células eucariotas pueden ser 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*). Las células eucariotas pueden ser células de *Pichia*, y lo más particularmente células de *Pichia pastoris*.

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

Por consiguiente, otro aspecto de la memoria descriptiva se refiere a un método para producir un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, comprendiendo el método al menos las etapas de:

a) expresar en un sistema de expresión celular adecuado (tal como se define anteriormente en el presente documento) un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente

b) aislar y/o purificar dicho dominio de unión.

Los dominios de unión, complejos, células o líneas celulares descritos en el presente documento pueden usarse en una variedad de contextos y aplicaciones, por ejemplo, y sin limitación, para capturar y/o purificar complejos GPCR:proteína G, y en estudios de cristalización y el análisis estructural de alta resolución de complejos GPCR:proteína G. Por tanto uno de los objetivos de la memoria descriptiva es usar el dominio de unión tal como se describe en el presente documento, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como Nanobodies, como herramientas para estabilizar complejos GPCR:proteína G y adicionalmente usar estos dominios de unión como adyuvantes de co-cristalización para GPCR en complejo con una proteína G, o en otras palabras para facilitar la cristalogénesis de complejos GPCR:proteína G. De manera adicional y/o alternativa, los dominios de unión y preferiblemente los sistemas celulares que expresan los dominios de unión, tal como se describe en el

presente documento, pueden ser útiles para otras aplicaciones tales como examen de ligandos, descubrimiento de fármacos, inmunización, todos los cuales se describirán en detalle adicional a continuación.

Estabilización de un complejo GPCR:proteína G y bloqueo del GPCR en el estado unido a proteína G

Por tanto, según un aspecto, la memoria descriptiva se refiere al uso de un dominio de unión tal como se describió anteriormente en el presente documento para estabilizar un complejo que comprende un GPCR y una proteína G. El complejo que se estabiliza puede comprender además un ligando de receptor, más específicamente un agonista. El término “estabilizar”, “estabilización” o “aumentar la estabilidad”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a aumentar la estabilidad de un complejo GPCR:proteína G con respecto a la estructura (estado conformacional) y/o actividad biológica particular (actividad de señalización intracelular) de una o ambas de las proteínas constituyentes del complejo, en particular el GPCR y/o la proteína G. El dominio de unión descrito en el presente documento puede usarse para estabilizar el complejo GPCR:proteína G de modo que el GPCR se bloquea o se fija en un estado activo o unido a proteína G. Un GPCR que adopta un estado activo o unido a proteína G de ese tipo ejercerá su actividad biológica en la naturaleza. Anteriormente en el presente documento se han descrito modos de determinar la estabilidad (aumentada) de un complejo GPCR:proteína G y se ilustran adicionalmente en la sección de ejemplos.

Se apreciará que tener una estabilidad aumentada con respecto a la estructura y/o una actividad biológica particular de un GPCR incluye la estabilidad frente a otros agentes desnaturizantes o condiciones desnaturizantes incluyendo calor, un detergente, un agente caotrópico y un pH extremo. Por consiguiente, el dominio de unión descrito en el presente documento puede aumentar la estabilidad de un complejo GPCR:proteína G en condiciones no fisiológicas mediante dilución, concentración, composición de tampón, calentamiento, enfriamiento, congelación, detergente, agente caotrópico, pH, entre otros. Por consiguiente, el término “termoestabilizar”, “termoestabilización”, “aumentar la termoestabilidad de”, se refieren a las propiedades funcionales más que a las propiedades termodinámicas de un complejo GPCR:proteína G y a la resistencia de la proteína constituyente a la desnaturización irreversible inducida por enfoques térmicos y/o químicos incluyendo, pero sin limitarse a, calentamiento, enfriamiento, congelación, agentes desnaturizantes químicos, pH, detergentes, sales, aditivos, proteasas o temperatura. La desnaturización irreversible conduce al desplegamiento irreversible de las conformaciones funcionales de la proteína, a la pérdida de actividad biológica y a la agregación de la proteína desnaturizada. El término “(termo)estabilizar”, “(termo)estabilización”, “aumentar la (termo)estabilidad de”, tal como se usa en el presente documento, se aplica a complejos GPCR:proteína G incluidos en partículas lipídicas o capas lipídicas (por ejemplo, monocapas lipídicas, bicapas lipídicas, y similares) y a complejos GPCR:proteína G que se han solubilizado en detergente.

En relación con la estabilidad aumentada al calor, esto puede determinarse fácilmente midiendo la unión del ligando o usando métodos espectroscópicos tales como fluorescencia, CD o dispersión de luz que son sensibles al desplegamiento a temperaturas crecientes. Se prefiere que el dominio de unión pueda aumentar la estabilidad tal como se mide mediante un aumento en la estabilidad térmica de un complejo GPCR:proteína G 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. El dominio de unión puede aumentar la estabilidad térmica de un complejo GPCR:proteína G con un ligando de receptor, más específicamente un agonista o modulador alostérico positivo de la ruta de señalización dependiente de GPCR. El dominio de unión descrito en el presente documento puede aumentar la estabilidad de un complejo GPCR:proteína G en presencia de un detergente o un caotrópico. Preferiblemente, el dominio de unión puede aumentar la estabilidad de un complejo GPCR:proteína G frente a la desnaturización inducida por enfoques térmicos o químicos. En relación con una estabilidad aumentada al calor, a un detergente o a un caotrópico, normalmente el complejo GPCR:proteína G se incuba durante un tiempo definido en presencia de un detergente de prueba o un agente caotrópico de prueba y la estabilidad se determina usando, por ejemplo, unión a ligando o un método espectroscópico, opcionalmente a temperaturas crecientes tal como se comentó anteriormente. El dominio de unión descrito en el presente documento puede aumentar la estabilidad a pH extremo de un estado conformacional funcional de un GPCR. Preferiblemente, el dominio de unión puede aumentar la estabilidad de un complejo GPCR:proteína G a pH extremo. En relación con un pH extremo, un pH de prueba típico se elegirá por ejemplo en el intervalo de 6 a 8, el intervalo de 5,5 a 8,5, el intervalo de 5 a 9, el intervalo de 4,5 a 9,5, más específicamente en el intervalo de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el intervalo de 8,5 a 9,5 (pH alto).

El dominio de unión tal como se describe en el presente documento puede usarse para impedir la disociación del complejo en presencia de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina o análogos de los mismos. Más específicamente, los nucleótidos de guanina incluyen GDP y GTP, y los análogos de nucleótidos de guanina incluyen, sin ser limitativos, GTP γ S o GDP en combinación con especies de fluoruro de aluminio o berilio o fragmentos de nucleótidos tales como pirofosfato o foscarnet.

Captura y/o purificación de un complejo GPCR:proteína G

Por tanto, se entenderá que la capacidad de formación de un complejo GPCR:proteína G estable es particularmente útil para capturar y/o purificar un complejo GPCR:proteína G, lo que permitirá la cristalización posterior, la caracterización de ligandos y el examen de compuestos, inmunizaciones, entre otros. Además, resulta particularmente ventajoso que los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden ser

herramientas genéricas que pueden ser aplicables para una variedad de complejos GPCR:proteína G.

Por consiguiente, en el presente documento también se prevé un método, tal como un método *in vitro*, de captura y/o purificación de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, y
- 5 b) permitir que el dominio de unión se una a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y
- c) opcionalmente, aislar el complejo formado en la etapa b).

En el presente documento se proporciona un método, tal como un método *in vitro*, de captura de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G que comprende las etapas de:

- 10 a) aplicar una disolución que contiene una pluralidad de GPCR y proteínas G a un soporte sólido que posee un dominio de unión inmovilizado tal como se describe en el presente documento, y
- b) formar un complejo del dominio de unión, el GPCR y la proteína G, y
- c) retirar las moléculas unidas débilmente o no unidas.

En el presente documento también se prevé un método, tal como un método *in vitro*, de purificación de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

- 15 a) poner en contacto una disolución que contiene un GPCR y una proteína G con un dominio de unión descrito en el presente documento, y
- b) formar un complejo que comprende el dominio de unión, el GPCR y la proteína G, y
- c) aislar el complejo de la etapa b)

en el que se purifica esencialmente un complejo de un GPCR y una proteína G.

- 20 El dominio de unión tal como se describe en el presente documento también puede usarse para capturar un complejo GPCR:proteína G diana que comprende adicionalmente un ligando de receptor y/o una o más de otras proteínas de interacción.

- 25 Los métodos anteriores para capturar/purificar complejos GPCR:proteína G diana incluyen, sin limitación, métodos basados en la afinidad tales como cromatografía de afinidad, purificación por afinidad, inmunoprecipitación, detección de proteínas, inmuoquímica, presentación en superficie, entre otros, y se conocen bien en la técnica.

Cristalización y resolución de la estructura de un complejo GPCR:proteína G

- 30 La cristalización de las proteínas de membrana incluyendo GPCR sigue constituyendo un reto formidable. Aunque están apareciendo métodos de expresión y purificación que permiten la generación de cantidades de miligramo, lograr estabilidad con estas moléculas es quizás el obstáculo más difícil de superar. En primer lugar, los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden aumentar la estabilidad de los complejos GPCR:proteína G solubilizados con detergente, protegiéndolos de la degradación proteolítica y/o la agregación y facilitando la purificación y la concentración de muestras homogéneas de proteínas plegadas correctamente. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que tales muestras constituyen el punto de partida preferido para la generación de cristales de difracción.

- 35 La cristalización es otro cuello de botella principal en el procedimiento de la determinación de la estructura macromolecular mediante cristalografía de rayos X. La cristalización satisfactoria requiere la formación de núcleos y su crecimiento posterior para dar lugar a cristales de tamaño adecuado. El crecimiento de cristales generalmente se produce de manera espontánea en una disolución supersaturada como resultado de una nucleación homogénea. Las proteínas pueden cristalizar en un experimento típico de examen en matriz dispersa, en el que se toma como
- 40 muestra de manera amplia la concentración de precipitantes, aditivos y proteínas, y pueden identificarse las condiciones de supersaturación adecuadas para la nucleación y el crecimiento de cristales para una proteína particular. Relacionada con el enfoque de examen en matriz dispersa es la generación de variación estructural en la propia proteína, por ejemplo añadiendo ligandos que se unen a la proteína, u obteniendo mutaciones diferentes, preferentemente en residuos de superficie de la proteína diana o intentando cristalizar ortólogos de especies
- 45 diferentes de la proteína diana (Chang 1998). Un hallazgo no esperado es la utilidad de los dominios de unión tal como se describe en el presente documento que se unen específicamente a un complejo GPCR:proteína G para introducir un grado de variación estructural tras la unión a la vez que se conserva el plegamiento global del complejo.

- 50 Puesto que la cristalización implica una pérdida desfavorable de entropía conformacional en la molécula que va a ensamblarse en la estructura reticular cristalina, los métodos que reducen la entropía conformacional de la diana mientras está todavía en disolución deben potenciar la posibilidad de cristalización disminuyendo la penalización

entrópica neta de la formación de la estructura reticular. El enfoque de “reducción de la entropía de superficie” ha demostrado ser altamente eficaz (Derewenda 2004). Asimismo, parejas de unión tales como iones, ligandos de molécula pequeña y péptidos pueden reducir la heterogeneidad conformacional uniéndose a y estabilizando 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. Por tanto, se encontró sorprendentemente que los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden usarse como herramientas para aumentar la probabilidad de obtener cristales bien ordenados minimizando la heterogeneidad conformacional en el complejo GPCR:proteína G diana mediante la unión a una conformación específica de la proteína G.

La cristalización de GPCR para estudios estructurales de alta resolución es particularmente difícil debido a la superficie anfipática de estas proteínas de membrana. Incluidos en la bicapa de membrana, los sitios de contacto de la proteína con las cadenas de acilo de los fosfolípidos son hidrófobos, mientras que las superficies polares están expuestas a los grupos de cabeza polar de los lípidos y a las fases acuosas. Para obtener cristales tridimensionales bien ordenados (un requisito previo al análisis estructural de rayos X a alta resolución) se solubilizan los GPCR con la ayuda de detergentes y se purifican como complejos proteína-detergente. La micela de detergente cubre la superficie hidrófoba de la proteína de membrana de una manera similar a un cinturón (Hunte y Michel 2002; Ostermeier *et al.* 1995). Los complejos GPCR-detergente forman cristales tridimensionales en los que los contactos entre moléculas de proteína adyacentes se efectúan mediante las superficies polares de la proteína que sobresalen de la micela de detergente (Día *et al.* 2007). Obviamente, la micela de detergente requiere espacio en la estructura reticular cristalina. Aunque interacciones atractivas entre las micelas podrían estabilizar el empaquetamiento cristalino (Rasmussen *et al.* 2007; Dunn *et al.* 1997), estas interacciones no conducen a contactos cristalinos rígidos. Puesto que muchas proteínas de membrana, incluyendo los GPCR contienen dominios hidrófilos relativamente pequeños o altamente flexibles, una estrategia para aumentar la probabilidad de obtener cristales bien 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. Desgraciadamente, las interacciones de GPCR con proteínas G o arrestinas son altamente dependientes de lípidos, y ha sido difícil formar complejos de estabilidad suficiente para cristalografía. Por tanto, los dominios de unión descritos en el presente documento pueden usarse para ampliar las superficies polares de los GPCR a través de la unión de una proteína G, complementando la cantidad de superficie de proteína que puede facilitar contactos primarios entre moléculas en la estructura reticular cristalina con las superficies polares de la proteína G y el Nanobody. Los dominios de unión descritos en el presente documento también pueden reducir la flexibilidad de sus regiones extracelulares para hacer crecer cristales bien ordenados. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina, incluyendo los Nanobodies, son especialmente adecuados para este fin porque se unen a epítopos conformacionales y están compuestos por un solo dominio globular rígido, desprovisto de regiones de unión flexibles, a diferencia de los anticuerpos convencionales o fragmentos derivados tales como Fab.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan dominios de unión útiles como herramientas para cristalizar un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y en última instancia para resolver la estructura. Más preferiblemente, el complejo que se cristaliza haciendo uso de un dominio de unión descrito en el presente documento comprende además un ligando de receptor, más específicamente un agonista. Se prefiere particularmente que el GPCR comprendido en el complejo esté en una conformación o estado activo.

Por tanto, el dominio de unión en complejo con el complejo GPCR:proteína G y opcionalmente el ligando de receptor pueden 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 en bicelas, se aprovechan de las propiedades de autoensamblaje espontáneas de lípidos y detergente como vesículas (método de fusión de vesículas), micelas discoidales (método de bicelas) y cristales líquidos o mesofases (en el método de mesofase o fase cúbica). Los métodos de cristalización en fases cúbicas lipídicas se describen en, por ejemplo: Landau *et al.* 1996; Gouaux 1998; Rummel *et al.* 1998; Nollert *et al.* 2004; Rasmussen *et al.* 2011, publicaciones que se incorporan como referencia para la divulgación de estos métodos. Los métodos de cristalización en bicelas se describen en, por ejemplo: Faham *et al.* 2005; Faham *et al.* 2002, publicaciones que se incorporan como referencia para la divulgación de estos métodos.

La memoria descriptiva también se refiere al uso de un dominio de unión tal como se describe en el presente documento para resolver una estructura de un complejo diana que comprende un GPCR y una proteína G, 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 a menudo se realiza mediante un método biofísico, tal como cristalografía de rayos X.

En cristalografía de rayos X, los datos de difracción, cuando se recopilan apropiadamente, dan la amplitud de la amplitud de la transformada de Fourier 3D de la densidad electrónica de la molécula en la célula unitaria. Si se conocen las fases, la densidad electrónica puede obtenerse simplemente mediante síntesis de Fourier. Para un

complejo de proteínas, el éxito de obtener la información de fases a partir de la sustitución molecular (MR) solo es cuestionable cuando la fracción de proteínas con una estructura conocida (los modelos de búsqueda) es baja (menos del 50% del contenido en aminoácidos) y/o cuando los cristales muestran una calidad de difracción limitada. Aunque se demostró que la combinación de sustitución isomórfica múltiple (MIR) y el ajuste de fase de MR era satisfactoria para complejos de proteínas (por ejemplo Ostermeier *et al.* 1995; Li *et al.* 1997; Hunte *et al.* 2000), el requisito de producir un buen derivado de átomo pesado casi siempre es problemática. A lo largo de la década pasada, los enfoques de MIR clásicos se han reemplazado generalmente por el uso de datos de dispersión anómalos usando principalmente la incorporación de selenometionina (SeMet) (MAD o SAD) (Hendrickson 1991). De hecho, los datos experimentales anómalos que usan energías de límite de Se generalmente proporcionan información de fase superior y menos sesgada en comparación con o bien MIR o bien los datos de ajuste de fase de MR basados en modelo. Por consiguiente, en el presente documento se proporciona el uso de un dominio de unión descrito en el presente documento para el ajuste de fase de complejos GPCR:G mediante MR o MAD. En particular, los dominios variables individuales de inmunoglobulina, incluyendo los Nanobodies, generalmente se expresan de manera robusta y son adecuados para la incorporación de SeMet. Para ilustrar esto adicionalmente, y sin ser limitativo, el ajuste de fase de un complejo que comprende un GPCR, una proteína G y un Nanobody introduciendo todos los sitios de SeMet en el Nanobody solo evita la necesidad de incorporar sitios SeMet en el GPCR o la proteína G.

En muchos casos, obtener un cristal de calidad para difracción es la principal barrera para resolver su estructura de resolución atómica. Por tanto, los dominios de unión descritos en el presente documento pueden usarse para mejorar la calidad de difracción de los cristales de modo que puede resolverse la estructura cristalina del complejo diana.

Además, se desea altamente obtener información estructural de las dianas de GPCR, por ejemplo para ayudar a guiar en el descubrimiento de fármacos de GPCR. Aparte de la cristalización de más GPCR, se necesitan especialmente métodos para adquirir estructuras de receptores unidos a diferentes clases de ligandos incluyendo agonistas, antagonistas, reguladores alostéricos y/o proteínas G. La presente memoria descriptiva proporciona particularmente herramientas generales para obtener cristales de complejos GPCR:proteína G. En particular, los cristales de complejo GPCR:proteína unido a agonista pueden proporcionar representaciones tridimensionales de los estados activos de los GPCR. Estas estructuras ayudarán a aclarar los cambios conformacionales que conectan la unión a ligando y los sitios de interacción con proteínas G, y conducirán a hipótesis mecánicas más precisas y en última instancia a nuevos agentes terapéuticos. Dada la flexibilidad conformacional inherente a los GPCR activados por ligando y la mayor heterogeneidad mostrada por receptores unidos a agonista, no es fácil estabilizar un estado de este tipo. Por tanto, tales esfuerzos pueden beneficiarse de la estabilización de un complejo de una conformación de receptor unido a agonista unido a su proteína G heterotrimérica mediante la adición de dominios de unión que son específicos para un complejo de este tipo. Son especialmente adecuados los dominios de unión que se unen a la proteína G que forma parte de un complejo de este tipo, puesto que estos dominios de unión pueden usarse como herramientas generales para estabilizar todos los GPCR que señalizan a través de la misma proteína G (por ejemplo, receptores acoplados a Gs, receptores acoplados a Gi, etc.).

La presente memoria descriptiva también engloba un método de determinación de la estructura cristalina de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, y
- b) permitir que el dominio de unión se una a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y
- c) cristalizar el complejo formado en la etapa b)

En el método anterior de determinación de la estructura cristalina, el complejo diana que comprende un GPCR y una proteína G puede comprender además un ligando de receptor, más específicamente un agonista, 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).

Identificación de compuestos que seleccionan como diana un complejo GPCR:proteína G

En el procedimiento de examen de compuestos, descubrimiento de fármacos y optimización de prototipos, existe el requisito de ensayos de examen rápidos, más eficaces, menos caros y especialmente con mucha información que proporcionen información simultánea sobre diversas características de compuestos y sus efectos sobre diversas rutas celulares (es decir eficacia, especificidad, toxicidad y metabolismo de fármacos). Por tanto, existe la necesidad de examinar de manera rápida y económica grandes números de compuestos con el fin de identificar nuevos ligandos específicos de un GPCR de interés, preferiblemente ligandos específicos de conformación, que pueden ser nuevos candidatos a fármacos posibles. La presente memoria descriptiva resuelve este problema proporcionando dominios de unión que estabilizan un complejo GPCR:proteína G en un estado conformacional funcional, que entonces puede usarse como inmunógeno o reactivo de selección para examinar en una variedad de contextos. Una ventaja principal de los dominios de unión tal como se describe en el presente documento es que el GPCR

comprendido en el complejo GPCR:proteína G puede mantenerse en una conformación funcional estabilizada, particularmente en una conformación en estado activo. Por ejemplo, los compuestos de la biblioteca que se unen selectivamente a esta conformación activa del receptor tienen una mayor propensión a comportarse como agonistas porque la estabilización ortostérica o alostérica de la conformación activa del GPCR provoca respuestas biológicas.

Otra ventaja es que el dominio de unión aumenta la termoestabilidad de la conformación activa del GPCR comprendido en el complejo, protegiendo así el GPCR contra la desnaturalización irreversible o térmica inducida por las condiciones no nativas usadas en el examen de compuestos y el descubrimiento de fármacos, sin necesidad de basarse en GPCR mutantes con estabilidad aumentada. Otra ventaja principal de los dominios de unión selectivos de conformación tal como se describe en el presente documento es que permiten examinar y diferenciar de manera rápida y fiable entre agonistas de receptor, agonistas inversos, antagonistas y/o moduladores así como inhibidores de GPCR y rutas dependientes de GPCR, aumentando así la probabilidad de identificar un ligando con las propiedades farmacológicas deseadas.

Para ilustrar esto adicionalmente, un concepto bien establecido es que la mayoría de los GPCR presentan afinidad de unión a agonista superior cuando se complejan con proteínas G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por el agonista y la proteína G. Los dominios de unión tal como se describe en el presente documento que inhiben la disociación de un complejo de un GPCR y una proteína G estabilizarán así un estado conformacional activo del complejo R:proteína G, aumentando así la afinidad del GPCR por agonistas y disminuyendo la afinidad por agonistas inversos. Se deduce que los dominios de unión que reconocen la conformación funcional activa del complejo R:G pueden usarse por ejemplo en ensayos de examen de alto rendimiento para examinar agonistas porque aumentan la afinidad del receptor por los agonistas, en relación con los agonistas inversos. Los dominios de unión que reconocen la conformación funcional activa del complejo G:R también pueden usarse en ensayos de examen de alto rendimiento para examinar agonistas sesgados con la capacidad para estimular selectivamente un subconjunto de actividades de señalización de un receptor, por ejemplo la activación selectiva de la función de las proteínas G, en relación con la de la β -arrestina. Un dominio de unión que se une específicamente a la proteína G en complejo con un GPCR (por ejemplo, la tabla 2-3) puede usarse como herramienta universal para examinar programas que seleccionan como diana una pluralidad de GPCR, puesto que una proteína G particular (por ejemplo, Gs) formará un complejo con una pluralidad de GPCR (por ejemplo, receptores acoplados a Gs, incluyendo receptores 5-HT tipos 5-HT₄ y 5-HT₇, receptor de ACTH, receptor de adenosina tipos A_{2a} y A_{2b}, receptor de arginina-vasopresina 2, receptores β -adrenérgicos tipos β_1 , β_2 y β_3 , receptor de calcitonina, receptor peptídico relacionado con el gen de calcitonina, receptor de la hormona liberadora de corticotropina, familia de receptores de dopamina similares a D₁ (D₁ y D₅), receptor de FSH, receptor del polipéptido inhibidor gástrico, receptor de glucagón, receptor de histamina H₂, receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina, receptor de melanocortina, receptor 1 de hormona paratiroidea, receptor de prostaglandina tipos D₂ y I₂, receptor de secretina, receptor de tiotropina, ...; véase también la tabla 1).

Por tanto, otro aspecto engloba el uso de un dominio de unión, o el uso de un complejo, una célula, una preparación de membrana que comprende un dominio de unión, todos tal como se describió anteriormente en el presente documento, en programas de examen y/o identificación para parejas de unión específicas de conformación de un complejo GPCR:proteína G, que podría conducir en última instancia a nuevos candidatos a fármacos posibles.

En el presente documento se prevé un método de identificación de compuestos que pueden unirse selectivamente a un complejo GPCR:proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

- (i) proporcionar un complejo que comprende un GPCR y una proteína G
- (ii) poner en contacto el complejo con un dominio de unión que se dirige contra y/o se une específicamente al complejo y permitir que el dominio de unión se una al complejo, y
- (iii) proporcionar un compuesto de prueba, y
- (iv) evaluar si el compuesto de prueba se une al complejo, y
- (v) seleccionar un compuesto que se une selectivamente al complejo.

Quedará claro que el dominio de unión tal como se usa en cualquiera de los métodos anteriores puede estabilizar el estado conformacional funcional del complejo GPCR:proteína G e impide la disociación del complejo. Preferiblemente, el complejo GPCR:proteína G está en un estado conformacional activo (tal como se definió anteriormente en el presente documento). En métodos de examen particularmente preferidos, el complejo GPCR:proteína G comprende además un ligando de receptor.

Debe indicarse que los dominios de unión particularmente preferidos son tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Por tanto, los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden ser útiles en ensayos de examen. Los ensayos de examen para el descubrimiento de fármacos pueden ser ensayos en fase sólida o en fase de disolución, por ejemplo un ensayo de unión, tal como ensayos de unión a radioligando. Se apreciará que en algunos casos se prefiere el examen de alto rendimiento de los compuestos de prueba y que los métodos tal como

se describió anteriormente pueden usarse como método de “examen de bibliotecas”, un término bien conocido por los expertos en la técnica. Por tanto, 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 memoria descriptiva. Para los fines de alto rendimiento, pueden usarse bibliotecas de compuestos 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 fagos y similares. Se conocen en la técnica metodologías para preparar y examinar tales bibliotecas. En una realización preferida, los métodos de examen de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria de péptidos o productos químicos 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 (especies químicas particulares o subclases) que presentan una actividad característica deseada. Una “biblioteca de compuestos” es una colección de productos químicos almacenados habitualmente en última instancia en un 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 tales como reactivos. Los expertos en la técnica conocen bien la preparación y el examen de bibliotecas combinatorias. Los compuestos así identificados pueden servir como “compuestos prototipo” convencionales o pueden usarse por sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales. Por tanto, los métodos de examen tal como se describió anteriormente en el presente documento pueden comprender adicionalmente modificar un compuesto de prueba que se ha demostrado que se une a un complejo GPCR:proteína G conformacionalmente activo, y determinar si el compuesto de prueba modificado se une al GPCR cuando reside en la conformación particular.

En los casos en que se prefiere el examen de alto rendimiento de complejos GPCR:proteína G diana para parejas de unión específicas de conformación, esto se facilitará por la inmovilización del dominio de unión tal como se describe en el presente documento, o el complejo GPCR:proteína G estabilizado por el dominio de unión, sobre una superficie o soporte sólido adecuado que puede disponerse o multiplexarse de otro modo. Los ejemplos no limitativos de soportes sólidos adecuados incluyen perlas, columnas, portaobjetos, chips o placas. Más específicamente, los soportes sólidos pueden ser particulados (por ejemplo perlas o gránulos, usados generalmente en columnas de extracción) o estar en forma de lámina (por ejemplo membranas o filtros, portaobjetos de vidrio o plástico, placas de ensayo de microtitulación, tira reactiva, dispositivos de llenado por capilaridad o similares) que pueden ser fibras o tubos planos, plegados o huecos. Las siguientes matrices se facilitan como ejemplos y no son exhaustivos, pudiendo incluir tales ejemplos sílice (sílice amorfa porosa), es decir la serie de cartuchos FLASH que contienen sílice irregular de 60A (32-63 μm o 35-70 μm) suministrados por Biotage (una división de Dyax Corp.), soportes de agarosa o poliacrilamida, por ejemplo la variedad de productos Sepharose suministrados por Amersham Pharmacia Biotech, o los soportes Affi-Gel suministrados por Bio-Rad. Además, hay polímeros macroporosos, tales como los soportes Affi-Prep estables a la presión también suministrados por Bio-Rad. Otros soportes que podrían utilizarse incluyen; dextrano, colágeno, poliestireno, metacrilato, alginato de calcio, vidrio de poro controlado, aluminio, titanio y cerámica porosa. Alternativamente, la superficie sólida puede comprender parte de un sensor dependiente de masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón superficial. Ejemplos adicionales de soportes disponibles comercialmente se comentan en, por ejemplo, Protein Immobilization, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1991).

La inmovilización puede ser o bien no covalente o bien covalente. En particular, la adsorción o inmovilización no covalente sobre una superficie sólida del dominio de unión, o el complejo GPCR:proteína G estabilizado por el dominio de unión, tal como se describe en el presente documento puede producirse a través de un recubrimiento de superficie con cualquiera de un anticuerpo, o estreptavidina o avidina, o un ión metálico, que reconoce una etiqueta molecular unida al dominio de unión o al GPCR, según técnicas convencionales conocidas por el experto (por ejemplo, etiqueta de biotina, etiqueta de histidina, etc.). Alternativamente, el dominio de unión, o el complejo GPCR:proteína G estabilizado por el dominio de unión, tal como se describe en el presente documento, puede unirse a una superficie sólida mediante reticulación covalente usando químicas de acoplamiento convencionales. Una superficie sólida puede comprender de manera natural residuos que pueden reticularse adecuados para la unión covalente o puede recubrirse o derivatizarse para introducir grupos que pueden reticularse adecuados según métodos bien conocidos en la técnica. La funcionalidad suficiente de la proteína inmovilizada puede conservarse tras el acoplamiento covalente directo a la matriz deseada a través de un resto reactivo que no contiene un brazo de separación químico. Ejemplos adicionales e información más detallada sobre métodos de inmovilización de anticuerpos (fragmentos) sobre soportes sólidos se comentan en Jung *et al.* (2008); de manera similar, métodos de inmovilización de receptores de membrana se revisan en Cooper (2004); incorporados ambos en el presente documento como referencia. En particular, la mutación de un aminoácido particular (en una proteína con infraestructura conocida o deducida) para dar una lisina o cisteína (u otro aminoácido deseado) puede proporcionar un sitio específico para acoplamiento covalente, por ejemplo. También es posible volver a modificar mediante ingeniería genética una proteína específica para alterar la distribución de los aminoácidos disponibles en 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 dominios de unión tal como se describe en el presente documento, así como a los complejos estabilizados conformacionalmente GPCR:proteína G, proporcionando así medios de inmovilización orientada sin la adición de otras colas peptídicas o dominios que contienen cualquier

aminoácido natural o no natural. En caso de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un Nanobody, se prefiere la introducción de mutaciones en la región de marco, minimizando la alteración en la actividad de unión al antígeno del anticuerpo (fragmento).

De manera conveniente, las proteínas inmovilizadas pueden usarse en procedimientos de inmunoabsorción tales como inmunoensayos, por ejemplo ELISA, o procedimientos de purificación por inmutafinidad poniendo en contacto las proteínas inmovilizadas con una muestra de prueba (es decir que comprende el compuesto de prueba, entre otros) según métodos normales convencionales en la técnica. Alternativamente, y en particular para fines de alto rendimiento, las proteínas inmovilizadas pueden disponerse o multiplexarse de otro modo. Preferiblemente, las proteínas inmovilizadas se usan para el examen y la selección de compuestos que se unen específicamente a un complejo GPCR:proteína G estabilizado conformacionalmente, en el que en particular el GPCR está en un estado conformacional activo.

Se apreciará que puede inmovilizarse o bien el dominio de unión, o bien el complejo GPCR:proteína G (estabilizado conformacionalmente), o bien sus proteínas constituyentes, dependiendo del tipo de aplicación o el tipo de examen que necesite realizarse. Además, la elección del dominio de unión que estabiliza al GPCR:proteína G (que selecciona como diana un epítipo conformacional particular del complejo GPCR:proteína G), determinará la orientación de las proteínas y por consiguiente, el resultado deseado de la identificación de compuestos, por ejemplo compuestos que se unen específicamente a partes extracelulares, partes intramembranas o partes intracelulares de dicho GPCR estabilizado conformacionalmente o compuestos que se unen específicamente a dicha proteína G estabilizada conformacionalmente.

Alternativamente, 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 dominio de unión y el complejo GPCR:proteína G se proporcionan, por ejemplo, en una disolución de detergente o en una preparación de tipo membrana (véase a continuación).

Lo más preferiblemente, ni el dominio de unión, ni el complejo GPCR:proteína G o sus proteínas constituyentes, ni el compuesto de prueba se inmovilizan, como es el caso por ejemplo en los protocolos de selección de presentación en fagos en disolución, o en los ensayos de unión a radioligando. Se prefiere que el dominio de unión, el complejo GPCR:proteína G (o por separado, las proteínas constituyentes) tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen anteriores, se proporcionen como células completas, o extractos celulares (orgánulos) tales como extractos de membrana o fracciones de los mismos, o que puedan incorporarse en vesículas o capas lipídicas (que comprenden lípidos naturales y/o sintéticos), lipopartículas de alta densidad, o cualquier nanopartícula, tal como nanodiscos, o se proporcionen como VLP, de modo que se conserve una funcionalidad suficiente de las proteínas respectivas. Las preparaciones de GPCR formadas a partir de fragmentos de membrana o extractos de detergente de membrana se revisan en detalle en Cooper (2004), incorporado en el presente documento como referencia. Alternativamente, los dominios de unión, los complejos GPCR:proteína G o las proteínas constituyentes también pueden solubilizarse en detergentes. Los ejemplos no limitativos de preparaciones de receptor solubilizadas se proporcionan adicionalmente en la sección de ejemplos.

Pueden usarse diversos métodos para determinar la unión entre el complejo GPCR:proteína G estabilizado y un compuesto de prueba, incluyendo por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos basados en chips, inmunocitofluorescencia, tecnología de dos híbridos en levaduras y presentación en fagos 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 un GPCR incluyen ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas con ionización por electrospray/HPLC u otros métodos (bio)físicos y analíticos. También pueden usarse métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, bien conocidos para los expertos en la técnica. Se apreciará que un compuesto de prueba unido puede detectarse usando una etiqueta o marcador único asociado con el compuesto, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o una etiqueta de radiofrecuencia, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

La eficacia de los compuestos y/o las composiciones que comprenden los mismos puede someterse a prueba usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico implicado.

Puede determinarse si el compuesto altera la unión del GPCR 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 ligando 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 en células completas o en membranas obtenidas a partir de las células o el 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. Por tanto, el complejo tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen

anteriores puede comprender además un ligando de receptor. 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 completo, o un agonista parcial, o un agonista inverso, o un antagonista, tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Además de estabilizar la unión a un complejo GPCR:proteína G diana en un estado conformacional funcional, también será deseable determinar el efecto funcional de un compuesto sobre el complejo GPCR:proteína G, en particular sobre la actividad biológica del GPCR y las parejas que interaccionan posteriormente. En particular, los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden usarse para examinar compuestos que modulan (aumentan o disminuyen) la actividad biológica del complejo GPCR:proteína G, o sus constituyentes, ya sea el GPCR o la proteína G. La modulación deseada en la actividad biológica dependerá del GPCR de elección. Los compuestos pueden unirse al complejo GPCR:proteína G diana, en particular a uno o ambos de sus constituyentes, dando como resultado la modulación (activación o inhibición) de la señalización del receptor posterior. Esta modulación de la señalización del GPCR puede producirse orto- o alostéricamente. Los compuestos pueden unirse al complejo diana que comprende un GPCR unido a una proteína G o sus constituyentes para activar o aumentar la señalización del receptor; o alternativamente para disminuir o inhibir la señalización del receptor. Los compuestos también pueden unirse al complejo diana de tal manera que bloquean la actividad constitutiva del GPCR. Los compuestos también pueden unirse al complejo diana de tal manera que median en la modulación alostérica (por ejemplo, se unen al GPCR o a la proteína G en un sitio alostérico). De este modo, los compuestos pueden modular la función del receptor uniéndose a diferentes regiones en el complejo GPCR:proteína G (por ejemplo, en sitios alostéricos). Se hace referencia por ejemplo a George *et al.* (2002), Kenakin (2002) y Rios *et al.* (2001). Los compuestos también pueden unirse al complejo diana de tal manera que prolongan la duración de la señalización mediada por el GPCR o que potencian la señalización del receptor aumentando la afinidad receptor-ligando. Además, los compuestos también pueden unirse al complejo diana de tal manera que inhiben o potencian el ensamblaje de homómeros o heterómeros funcionales de GPCR.

Además, los ensayos basados en células son críticos para evaluar el mecanismo de acción de nuevas dianas biológicas y la actividad biológica de compuestos químicos. Los ensayos basados en células actuales para GPCR incluyen medidas de la activación de la ruta (liberación de Ca^{2+} , generación de AMPc o actividad transcripcional); mediciones del tráfico de proteínas mediante el etiquetado de GPCR y elementos posteriores con GFP; y medidas directas de interacciones entre proteínas usando transferencia de energía por resonancia Fóster (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o enfoques de dos híbridos en levaduras. La introducción de los dominios de unión tal como se describe en el presente documento, dentro de la célula en el compartimento relevante de la célula (por vía intra o extracelular) mediante cualquier medio bien conocido y usado comúnmente en la técnica, puede conducir a ensayos basados en células nuevos o mejores.

En particular, existe la necesidad de “hacer que ya no sean huérfanos” aquellos GPCR para los que no se ha identificado un ligando de activación natural. La estabilización de los GPCR en un estado conformacional funcional usando los dominios de unión tal como se describe en el presente documento permite enfoques de examen que pueden usarse para identificar ligandos de GPCR “huérfanos” donde se desconoce el ligando natural. Por ejemplo, se han adoptado diversos enfoques para “hacer que ya no sean huérfanos” incluyendo examen de alineamiento contra familias de ligandos conocidos. Los ligandos de GPCR huérfanos pueden identificarse a partir de muestras biológicas. Por tanto, el compuesto de prueba puede proporcionarse como una muestra biológica. En particular, la muestra puede ser cualquier muestra adecuada tomada de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de fluido corporal tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo. Alternativamente, la muestra es extracto tisular o celular.

El compuesto de prueba tal como se usa en cualquiera de los métodos de examen anteriores puede seleccionarse 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, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por puentes disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o que consisten en cualquiera de un dominio VL o VH, un anticuerpo de cadena pesada (HcAc), un anticuerpo de dominio individual (sdAb), un minicuerpo, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o Nanobody), el dominio variable de nuevos receptores antigénicos derivados anticuerpos de tiburón (VNAR), una estructura de soporte de proteínas incluyendo un alfacuerpo, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin), repeticiones de tipo II de fibronectina, anticalinas, knottinas, dominios CH2 obtenidos por ingeniería genética (nanoanticuerpos), tal como se definió anteriormente en el presente documento.

El compuesto de prueba puede unirse opcionalmente de manera covalente o no covalente a un marcador detectable. Marcadores detectables adecuados y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos 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, rojo Texas, 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, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios de detección de tales etiquetas los conocen bien los expertos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan dotando a la enzima de un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado. Otros marcadores detectables adecuados se describieron anteriormente dentro del contexto relacionado con un dominio de unión.

Se prefiere específicamente que el compuesto de prueba sea un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, tal como se describió anteriormente, incluyendo un Nanobody. Por ejemplo, y sin el fin de ser limitativo, los compuestos de prueba pueden ser anticuerpos (tal como se define en el presente documento en su sentido más amplio) que se han generado contra un complejo GPCR:proteína G estabilizado por un dominio de unión tal como se describe en el presente documento. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos *in vivo*. Preferiblemente, la inmunización de un animal se realizará de un modo similar al descrito en el presente documento anteriormente. En el presente documento también se proporcionan métodos para seleccionar anticuerpos que se unen específicamente a complejo GPCR:proteína G estabilizado conformacionalmente, que implican el examen de bibliotecas de expresión que codifican para genes de inmunoglobulina, o partes de las mismas, expresadas en bacteria, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas u otros sistemas de presentación en dicho complejo GPCR:proteína G.

Un aspecto particular de la presente memoria descriptiva se refiere a un soporte sólido al que se inmoviliza un dominio de unión tal como se describe en el presente documento. Un soporte sólido de este tipo (tal como se describió anteriormente en el presente documento) puede usarse por tanto en cualquiera de los métodos de examen anteriores.

Modulación de la señalización del receptor GPCR

Los dominios de unión tal como se describe en el presente documento también pueden usarse para modular la señalización de GPCR, en particular la señalización de GPCR mediada por proteínas G, incluyendo la supresión de la señalización de GPCR mediada por proteínas G. Los términos “modular”, “modulación”, “modulado” significan un aumento o una disminución en la actividad de una proteína o un complejo de proteínas, en particular un complejo GPCR:proteína G. En particular, los dominios de unión descritos en el presente documento pueden ser moduladores alostéricos o inhibidores alostéricos. Los términos “modulador alostérico” o “inhibidor alostérico” en el contexto de la presente memoria descriptiva se refieren a moduladores o inhibidores no competitivos, que ejercen su efecto mediante la unión a un sitio distinto del sitio activo del receptor, y modulan la actividad del receptor o hacen que el receptor sea ineficaz en lo que se refiere a la transducción de señales. Un “modulador alostérico positivo (PAM)” aumenta la transducción de señales, mientras que un “modulador alostérico negativo (NAM)” reduce la transducción de señales. En particular, un inhibidor alostérico también puede suprimir la transducción de señales. Los ensayos para evaluar la modulación en la señalización de GPCR por los dominios de unión descritos en el presente documento son tal como se describió anteriormente en el presente documento.

A este respecto, los dominios de unión tal como se describe en el presente documento, en particular los dominios variables individuales de inmunoglobulina, también pueden ser útiles para la identificación de prototipos y el diseño de peptidomiméticos. Usar una estructura peptídica o proteica biológicamente relevante como punto de partida para la identificación de prototipos representa uno de los enfoques más poderosos en el descubrimiento de fármacos actual. Los peptidomiméticos son compuestos cuyos elementos esenciales (farmacóforos) imitan a un péptido o proteína natural en el espacio tridimensional y conservan la capacidad para interactuar con la diana biológica y producir el mismo efecto biológico. Los peptidomiméticos están diseñados para evitar algunos de los problemas asociados con un péptido natural: por ejemplo, estabilidad contra proteólisis (duración de la actividad) y escasa biodisponibilidad. Otras propiedades determinadas, tales como selectividad o potencia del receptor, a menudo pueden mejorarse sustancialmente.

Aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico

Determinados de los dominios de unión descritos anteriormente pueden tener utilidad terapéutica y pueden administrarse a un sujeto que tiene un estado con el fin de tratar al sujeto para el estado. La utilidad terapéutica para un dominio de unión se determina por el complejo GPCR:proteína G diana al que se une el dominio de unión en la señalización a través de la que el GPCR se asocia con el estado. En determinados casos, el GPCR puede activarse en el estado mediante su unión a un ligando. En otros casos, el GPCR puede mutarse para hacerlo activo constitutivamente, por ejemplo. Puede emplearse un dominio de unión objeto para el tratamiento de un estado mediado por GPCR tal como esquizofrenia, migraña, cefalea, reflujo, asma, broncoespasmo, hipertrofia prostática, úlceras, epilepsia, angina, alergia, rinitis, cáncer por ejemplo cáncer de próstata, glaucoma y accidente cerebrovascular. Estados relacionados con GPCR a modo de ejemplo adicionales aparecen en la base de datos en línea Mendelian Inheritance in Man encontrada en el sitio web del NCBI. Por tanto, también se prevé en el presente documento el dominio de unión tal como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende el dominio de unión, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con

GPCR. Se apreciará que la utilidad terapéutica también dependerá del epítipo conformacional particular del complejo GPCR:proteína G contra el que se dirige el dominio de unión.

Un dominio de unión objeto puede mezclarse con otra sustancia farmacológica en una composición farmacéutica fija o puede administrarse por separado, antes, simultáneamente con o tras la otra sustancia farmacológica. En términos generales, estos protocolos implican administrar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno relacionado con GPCR una cantidad eficaz de un dominio de unión que modula la actividad de señalización de un GPCR en el huésped y tratar al individuo para el trastorno.

Cuando se desea una reducción en la actividad de un GPCR determinado, puede administrarse uno o más compuestos que disminuyen la actividad del GPCR, mientras que cuando se desea un aumento en la actividad de un GPCR determinado, puede administrarse uno o más compuestos que aumentan la actividad del GPCR.

Puede tratarse una variedad de individuos según los métodos objeto. Generalmente, tales individuos son mamíferos, donde este término se usa ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase *Mammalia*, incluyendo los órdenes Carnivora (por ejemplo, perros y gatos), Rodentia (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), y Primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los individuos serán seres humanos. Los métodos de tratamiento objeto se realizan normalmente en individuos con tales trastornos o en individuos que desean evitar tales trastornos.

En otro aspecto, la memoria descriptiva también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los dominios de unión tal como se describe en el presente documento y al menos un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un “portador”, o “adyuvante”, en particular un “portador farmacéuticamente aceptable” o “adyuvante farmacéuticamente aceptable” es cualquier excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante adecuado que, por sí mismo, no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición ni produce protección. Por tanto, los portadores farmacéuticamente aceptables son de manera inherente no tóxicos y no terapéuticos, y los conoce el experto en la técnica. Los portadores o adyuvantes adecuados normalmente comprenden uno o más de los compuestos incluidos en la siguiente lista no exhaustiva: grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. Los portadores o adyuvantes pueden ser, como ejemplo no limitativo, disolución de Ringer, disolución de dextrosa o disolución de Hank. También pueden usarse disoluciones no acuosas tales como aceites fijos y oleato de etilo. Un excipiente preferido es dextrosa al 5% en solución salina. El excipiente puede contener cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química, incluyendo tampones y conservantes.

La administración de un dominio de unión tal como se describe en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede realizarse por medio de administración oral, inhalada o parenteral. En particular, el Nanobody puede administrarse a través de administración intratecal o intracerebroventricular. El compuesto activo puede administrarse solo o preferiblemente formulado como una composición farmacéutica. Una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno determinado que expresa el antígeno reconocido por el dominio de unión depende de factores habituales tales como la naturaleza y la gravedad del trastorno que está tratándose y del peso del mamífero. Sin embargo, una dosis unitaria normalmente estará en el intervalo de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg, o de 0,05 a 2 mg de dominio de unión o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las dosis unitarias normalmente se administrarán una vez o más de una vez al día, por ejemplo 2, 3 ó 4 veces al día, más habitualmente de 1 a 3 veces al día, de manera que la dosis diaria total normalmente está en el intervalo de 0,0001 a 1 mg/kg; por tanto una dosis diaria total adecuada para un adulto de 70 kg es de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg o más habitualmente de 0,05 a 10 mg. Se prefiere enormemente que el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administre en forma de una composición de dosis unitaria, tal como una composición oral, parenteral o inhalada de dosis unitaria. Tales composiciones se preparan mediante mezcla y se adaptan de manera adecuada para administración oral, inhalada o parenteral, y como tal pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas para chupar, polvos reconstituibles, disoluciones o suspensiones inyectables e infundibles o supositorios o aerosoles. Los comprimidos y las cápsulas para administración oral habitualmente se presentan en una dosis unitaria, y contienen excipientes convencionales tales como agentes de unión, cargas, diluyentes, agentes de preparación de comprimidos, lubricantes, disgregantes, colorantes, aromatizantes y agentes humectantes. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la técnica. Las cargas adecuadas para su uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Los disgregantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón tales como glicolato sódico de almidón. Los lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Los agentes humectantes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen laurilsulfato de sodio. Estas composiciones orales sólidas pueden prepararse mediante métodos convencionales de combinación, relleno, preparación de comprimidos o similares. Pueden usarse operaciones de combinación repetidas para distribuir el agente por todas esas composiciones empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son, naturalmente, convencionales en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones

líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como ésteres de glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y si se desea agentes aromatizantes o colorantes convencionales. Las formulaciones orales también incluyen formulaciones de liberación sostenida convencionales, tales como comprimidos o gránulos que tienen un recubrimiento entérico. Preferiblemente, las composiciones para inhalación se presentan para su administración al aparato respiratorio como un rapé o un aerosol o disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de compuesto activo tienen de manera adecuada diámetros de menos de 50 micrómetros, preferiblemente menos de 10 micrómetros, por ejemplo entre 1 y 5 micrómetros, tal como entre 2 y 5 micrómetros. Una dosis inhalada favorecida estará en el intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg. Para la administración parenteral, se preparan formas fluidas de dosis unitaria que contienen un compuesto tal como se describe en el presente documento y un vehículo estéril. El compuesto activo, dependiendo del vehículo y la concentración, puede o bien suspenderse o bien disolverse. Las disoluciones parenterales normalmente se preparan disolviendo el compuesto en un vehículo y esterilizando por filtración antes del llenado en una ampolla o vial adecuado y sellando. Ventajosamente, también se disuelven en el vehículo adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes tamponantes. Para potenciar la estabilidad, la composición puede congelarse tras el llenado en el vial y puede retirarse el agua a vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera, excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y esterilizarse mediante su exposición a óxido de etileno antes de la suspensión en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un tensioactivo o agente humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. Cuando resulta apropiado, pueden incluirse pequeñas cantidades de broncodilatadores, por ejemplo aminas simpatomiméticas tales como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina y efedrina; derivados de xantina tales como teofilina y aminofilina y corticosteroides tales como prednisolona y estimulantes suprarrenales tales como ACTH. Tal como es práctica común, las composiciones irán acompañadas habitualmente de indicaciones por escrito o impresas para su uso en el tratamiento médico de interés.

La administración de dominios de unión, en particular dominios variables individuales de inmunoglobulina, a las células puede realizarse tal como se describe para péptidos, polipéptidos y proteínas. Si el antígeno es extracelular o un dominio extracelular, el dominio de unión puede ejercer su función uniéndose a este, sin necesidad de administración intracelular. Los dominios de unión tal como se describe en el presente documento pueden seleccionar como diana epítomos conformacionales intracelulares de GPCR:proteínas G de interés. Para usar estos dominios de unión como agentes terapéuticos eficaces y seguros dentro de una célula, puede potenciarse la administración intracelular mediante la transducción de proteínas o sistemas de administración conocidos en la técnica. Los dominios de transducción de proteínas (PTD) han atraído interés considerable en el campo de la administración de fármacos por su capacidad para translocarse a través de las membranas biológicas. Los PTD son secuencias relativamente cortas (11-35 aminoácidos) que confieren su actividad de translocación aparente a proteínas y otras cargas macromoleculares con las que se conjugan, complejan o fusionan (Sawant y Torchilin 2010). El péptido TAT derivado de VIH (YGRKKRRQRRR), por ejemplo, se ha usado ampliamente para la administración intracelular de diversos agentes que oscilan entre moléculas pequeñas y proteínas, péptidos, variedad de nanoportadores farmacéuticos y agentes de obtención de imágenes. Alternativamente, también pueden usarse mecanismos endocíticos mediados por receptor para la administración de fármacos intracelular. Por ejemplo, la ruta de internalización mediada por el receptor de transferrina es una ruta de captación celular eficaz que se ha explotado para la administración específica de sitio de fármacos y proteínas (Qian *et al.* 2002). Esto se logra o bien químicamente mediante la conjugación de transferrina con proteínas o fármacos terapéuticos o genéticamente mediante la infusión de proteínas o péptidos terapéuticos en la estructura de transferrina. Proteínas que existen de manera natural (tales como la proteína de unión a hierro, transferrina) son muy útiles en esta área de direccionamiento de fármacos, puesto que estas proteínas son biodegradables, no tóxicas y no inmunogénicas. Además, pueden lograr direccionamiento específico de sitio debido a las altas cantidades de sus receptores presentes sobre la superficie celular. Todavía otros sistemas de administración incluyen, sin el fin de ser limitativo, sistemas de administración basados en polímeros y liposomas.

La eficacia de los dominios de unión descritos en el presente documento, y de composiciones que comprenden los mismos, puede someterse a prueba usando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal adecuado conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específicos implicados.

Examen, selección, producción de dominios de unión

Todavía en otro aspecto, la memoria descriptiva también engloba un método de examinar dominios de unión dirigidos contra y/o que se unen específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una pluralidad de dominios de unión, y

b) examinar dicha pluralidad de dominios de unión para un dominio de unión que se une a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y

c) aislar el dominio de unión que se une al complejo.

Preferiblemente, los dominios de unión se generan y se examinan para su unión específica a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G y opcionalmente un ligando de receptor. Los dominios de unión también pueden generarse y examinarse para su unión específica a una proteína G. Tal como se describe en el presente documento, los dominios de unión pueden generarse de muchos modos. En el caso de dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como Nanobodies, normalmente, se realizará la inmunización de un animal con un complejo diana que comprende un GPCR unido a una proteína G y un ligando de receptor, tal como se describió anteriormente en el presente documento (por ejemplo, para secuencias de V_HH, como ejemplo no limitativo) y también se ejemplifican adicionalmente en el presente documento.

Para la inmunización de un animal con un complejo diana, las proteínas del complejo diana (es decir, GPCR y proteína G) pueden producirse y purificarse usando métodos convencionales que pueden emplearse expresando una forma recombinante de dichas proteínas en una célula huésped, y purificando las proteínas usando cromatografía de afinidad y/o métodos basados en anticuerpos. En particular, puede emplearse el sistema de baculovirus/Sf-9 para la expresión, aunque también pueden usarse otros sistemas de expresión (por ejemplo, sistemas de células bacterianas, de levaduras 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 en el libro "Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors" (Kevin R. Lynch (Ed.), 1998), entre muchos otros. También puede reconstituirse un complejo GPCR:proteína G funcional usando un receptor purificado (por ejemplo, β 2-AR o MOR) reconstituido en partículas de HDL recombinantes con un exceso estequiométrico de la proteína G (Gs o Gi) tal como se describe en Whorton *et al.* (2009) para β 2-AR:Gs o en Kuszak *et al.* (2009) para MOR:Gi. Un GPCR también puede reconstituirse en vesículas de fosfolípidos y cargarse con un exceso estequiométrico de la proteína G. 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 (por ejemplo, 1 mg de receptor por mg de fosfolípido). En muchos casos, un GPCR puede estar presente en la vesícula de fosfolípidos en ambas orientaciones (en la orientación normal, y en la orientación "invertida" en la que los bucles intracelulares están fuera de las vesículas). Otros métodos de inmunización con un GPCR incluyen, sin limitación, el uso de células completas que expresan un GPCR y/o una proteína G o membranas derivadas de los mismos.

En particular, el animal puede inmunizarse con un complejo diana que se reticula con un agente de reticulación bifuncional (véase también la sección de ejemplos). También puede realizarse reticulación química usando técnicas convencionales que conoce bien el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T. (2008) Bioconjugate Techniques, 2ª ed., Elsevier Inc., 1202 páginas).

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

El examen para determinar dominios de unión que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un complejo diana puede realizarse, por ejemplo, examinando un conjunto, colección o biblioteca de células que expresan los dominios de unión sobre su superficie (por ejemplo, células B obtenidas de un camélido inmunizado de manera adecuada), examinando una biblioteca de dominios de unión (no inmunitaria o inmunitaria), o examinando una biblioteca de secuencias de ácido nucleico (no inmunitaria o inmunitaria) que codifican para secuencias de aminoácidos de los dominios de unión, que pueden realizarse todos ellos de una manera conocida *per se*, y un método que puede comprender opcionalmente 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 para determinar la actividad contra el antígeno deseado, una etapa de determinación de la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos deseada, una etapa de introducción de una o más sustituciones de humanización, una etapa de aplicación de formato en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, una etapa de examen para determinar las propiedades biológicas y/o biofísicas 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.

Aún otro aspecto se refiere a un kit que comprende un dominio de unión tal como se describe en el presente documento. El kit puede comprender además una combinación de reactivos tales como tampones, etiquetas moleculares, constructos de vectores, material de muestra de referencia, así como soportes sólidos, células, ácidos nucleicos adecuados y similares. Un kit de este tipo puede ser útil para cualquiera de las aplicaciones 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.

Finalmente, un último aspecto es el uso de cualquier dominio de unión tal como se describe en el presente documento para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables para la unión específica a un epítipo

conformacional de un complejo GPCR:proteína G y para construir dominios de unión artificiales basándose en dichas secuencias de aminoácidos. Se apreciará que en los dominios de unión tal como se describe en el presente documento, se conocen las regiones de marco y las regiones determinantes de complementariedad, y el estudio de derivados del dominio de unión, que se unen al mismo epítipo conformacional de un complejo GPCR:proteína G, permitirá deducir los aminoácidos esenciales implicados en la unión a dicho epítipo conformacional. Este conocimiento puede usarse para construir un dominio de unión mínimo y para crear derivados del mismo, que pueden obtenerse de manera rutinaria mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Los siguientes ejemplos pretenden promover una comprensión adicional de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en el presente documento con referencia a las realizaciones ilustradas, debe entenderse que la invención no se limita a ellas. Los expertos habituales en la técnica y con acceso a las enseñanzas en el presente documento reconocerán modificaciones y realizaciones adicionales dentro del alcance de las mismas. Por tanto, la presente invención está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Formación y purificación de un complejo ternario agonista- β 2AR-Gs estable

Se llevó a cabo la formación de un complejo estable (véase la figura 2) mezclando heterotrímero de Gs a una concentración de aproximadamente 100 μ M con BI-167107 unido a T4L- β 2AR (o β 2AR-365) en exceso molar (aproximadamente 130 μ M) en 2 ml de tampón (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, DDM al 0,1%, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM, BI-167107 10 μ M) e incubando durante 3 h a temperatura ambiente. BI-167107, que se identificó examinando y caracterizando aproximadamente 50 agonistas de β 2AR diferentes, tiene una semivida de disociación de aproximadamente 30 h proporcionando un grado de estabilización mayor al receptor unido a proteína G activo que otros agonistas completos tales como isoproterenol (Rasmussen *et al.*, 2011). Para mantener el estado libre de nucleótidos de alta afinidad del complejo, se añadió apirasa (25 mU/ml, NEB) tras 90 min para hidrolizar GDP residual liberado de $G_{\alpha s}$ tras la unión al receptor. GMP que resulta de la hidrólisis de GDP mediante apirasa tiene muy poca afinidad por la proteína G en el complejo. La unión de nuevo de GDP puede producir la disociación del complejo R:G (figura 3a).

El complejo R:G en DDM muestra disociación significativa tras 48 horas a 4°C (figura 4a). Se examinaron y se caracterizaron más de 50 anfífilos (datos no mostrados) y se identificó MNG-3 (NG-310, Affymetrix-Anatrace; Chae *et al.*, 2011) y sus análogos estrechamente relacionados como detergentes que estabilizan sustancialmente el complejo (figuras 4a, b). El complejo se intercambió en MNG-3 añadiendo la mezcla R:G (2 ml) a 8 ml de tampón (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, BI-167107 10 μ M) que contenía MNG-3 al 1% durante 1 h a temperatura ambiente.

En esta fase, la mezcla contiene el complejo R:G, Gs no funcional y un exceso de β 2AR. Para separar el complejo R:G funcional de Gs no funcional, y para completar el intercambio con detergente, el complejo R:G se inmovilizó sobre resina M1 Flag y se lavó en tampón (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, BI-167107 10 μ M, y $CaCl_2$ 3 mM) que contenía MNG-3 al 0,2%. Para impedir la agregación mediada por puentes de cisteína de los complejos R:G, se añadió TCEP 100 μ M a la proteína eluida antes de concentrarla con un concentrador Millipore de MWCO de 50 kDa. El procedimiento de cromatografía de exclusión molecular final para separar el receptor libre en exceso del complejo R:G (figura 5b) se realizó en una columna 200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con tampón que contenía MNG-3 al 0,02%, HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, BI-167107 10 μ M, y TCEP 100 μ M. Se combinaron las fracciones pico (figura 5b) y se concentraron hasta aproximadamente 90 mg ml⁻¹ con un concentrador Viva-spin de MWCO de 100 kDa y se analizaron mediante tinción con SDS-PAGE/azul brillante de Coomassie (figura 5a) y filtración en gel (figura 5c). Para confirmar una preparación pura, homogénea y desfosforilada, el complejo R:G se analizó de manera rutinaria mediante cromatografía de intercambio iónico (figura 5d).

Ejemplo 2: Generación de Nanobodies que se unen al complejo ternario agonista: β 2AR:Gs

A partir de la obtención de imágenes al EM con tinción negativa (datos no mostrados), se observó que el dominio helicoidal alfa de $G_{\alpha s}$ era flexible. La estabilización dirigida de este dominio se abordó generando Nanobodies que se unen al complejo ternario agonista- β 2AR:Gs. Los Nanobodies son anticuerpos de dominio individual, derivados de anticuerpos sólo de cadena pesada de llama (Muidermans, 2001). Para identificar los Nanobodies que se unen al receptor (cargado con agonista) receptor acoplado a proteína Gs, se inmunizaron dos llamas (*Llama glama*) con el complejo ternario β 2AR:Gs:BI167107 reticulado con bis(sulfosucinimidil)glutarato (BS2G, Pierce). Se inmunizaron ambos animales con 4 inyecciones bisemanales de 50 a 100 μ g. Tras completar la inmunización, se aislaron linfocitos de sangre periférica de los animales inmunizados para extraer el ARN total y preparar ADNc. Se aisló ARN total de aproximadamente 10⁷ linfocitos tal como se describe en Chomczynski y Sacchi (1987). Se preparó síntesis de ADNc de primera hebra usando un cebador dN6 y la RT Superscript según las instrucciones de los fabricantes (Invitrogen). Se amplificaron genes VHH que codifican para los fragmentos a partir de este ADNc mediante PCR usando cebadores específicos tal como se describió anteriormente (Conrad *et al.*, 2001). Usando PCR anidada, se obtuvieron por ingeniería genética PstI y BstEII al inicio y al final del marco de lectura abierto de VHH,

respectivamente. Se clonaron los VHH como fragmentos Pst1-BstEII en el vector de presentación en fagos pMESy4. Para cada llama, se construyó una biblioteca de presentación en fagos independiente que albergaba el repertorio de Nanobodies respectivo como una fusión de genes III (Domanska *et al.* 2011). Los Nanobodies específicos de complejo R:G se enriquecieron mediante dos rondas *biopanning* (selección de fagos por afinidad) en i) el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ incluido en partículas de lipoproteínas de alta densidad biotiniladas ApoL (rHDL, Whorton *et al.* 2007) o ii) en el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ reticulado con BS2G. Para la primera estrategia de *biopanning*, se inmovilizaron partículas de rHDL biotiniladas que contenían el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ sobre una placa Maxisorp (Nunc) recubierta con neutravidina a 1 $\mu g/pocillo$ en Hepes 20 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, TCEP 100 μM y BI167107 100 nM. Para la segunda estrategia de *biopanning*, el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ reticulado con BS2G se recubrió en fase sólida sobre una placa Maxisorp a 1 $\mu g/pocillo$. Para cada ronda de *biopanning*, se añadieron 10^{11} fagos a los antígenos inmovilizados y se incubaron durante de una a dos horas. A continuación, se retiraron los fagos no unidos de los pocillos que contenían el antígeno y se lavaron los pocillos 14 veces con Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8 y finalmente se incubaron durante 10 minutos con 200 μl de Hepes 20 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, TCEP 100 μM y BI167107 100 nM para retirar los fagos no específicos. Para eluir los fagos específicos de complejo, se trataron los pocillos con tripsina, se recubrieron con fagos y se usaron para infectar células TG1 en crecimiento exponencial ($DO_{600\pm 0,5}$). A partir de cada biblioteca enriquecida, se recogieron aleatoriamente 48 colonias y se hicieron crecer en 1 ml de 2xTY que contenía ampicilina y glucosa. Se indujeron los cultivos con IPTG para inducir la expresión de los Nanobodies y se prepararon extractos periplasmáticos que contenían un Nanobody purificado parcialmente. Se analizaron los Nanobodies contenidos en estos extractos periplasmáticos para determinar la unión al complejo ternario agonista: $\beta 2AR:Gs$ mediante ELISA.

Se analizaron Nanobodies enriquecidos en partículas de rHDL biotiniladas que contenían el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ mediante ELISA comparativo en el mismo complejo inmovilizado sobre placas Maxisorb recubiertas con neutravidina frente a partículas rHDL vacías. Se analizaron Nanobodies enriquecidos en complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ reticulado con BS2G recubierto sobre fase sólida mediante ELISA comparativo en el mismo complejo recubierto sobre fase sólida frente a pocillos no recubiertos. A partir de las colonias que puntuaron positivo en ELISA comparativo, se prepararon clones individuales, se extrajo el ADN y se analizaron las secuencias de los genes de Nanobodies codificados usando métodos de rutina (secuencias de aminoácidos mostradas en las tablas 2-3). Para Nb35, Nb36 y Nb37, la unión al complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ se confirmó adicionalmente mediante filtración en gel analítica (figuras 3d, 3e, 3f, 3g).

Ejemplo 3: Nb35, Nb36 y Nb37 se unen a Gs e impiden la disociación del complejo mediante $GTP\gamma S$

Para determinar si los Nanobodies producidos contra el complejo ternario $\beta 2AR:Gs:BI167107$ (tabla 2) se unen al receptor o a Gs, a continuación se monitorizó la unión de estos Nanobodies en ELISA en receptor purificado solo. Todos los Nanobodies de la tabla 2 puntuaron negativos en $\beta 2AR-356$ unido a agonista recubierto sobre fase sólida (Maxisorb, Nunc) reconstituido a alta densidad en vesículas de fosfolípidos (Rasmussen *et al.*, 2011). Nb80, un Nanobody específico de $\beta 2AR$ (Rasmussen *et al.* 2011) puntuó positivo en este ELISA. Ninguno de los agentes de unión de $\beta 2AR:Gs:BI167107$ descritos en la tabla 2 se unen al receptor reconstituido solo, indicando que se unen a epítopos contenidos en Gs. La cromatografía de exclusión molecular muestra que Nb35 y Nb37 se unen a epítopos separados en el heterotrímero de Gs para formar un complejo R:G:Nb35:Nb37 (figura 3d). De manera similar, Nb36 y Nb37 se unen a epítopos separados en el heterotrímero de Gs para formar un complejo R:G:Nb36:Nb37 (figura 3e).

GDP, GTP y análogos de GTP no hidrolizables alteran el complejo $\beta 2AR:Gs$ (figura 3a), produciendo la disociación de complejos de GPCR y proteína G *in vitro* e *in vivo*. Se analizaron los efectos mutuos de los Nb y el análogo de GTP no hidrolizable $GTP\gamma S$ sobre la integridad del complejo ternario agonista: $\beta 2AR:Gs$ mediante cromatografía de exclusión molecular analítica en presencia y ausencia de $GTP\gamma S$. Se encontró que los Nanobodies 35, 36 y 37 protegen el complejo $\beta 2AR:Gs:BI167107$ de la disociación mediante $GTP\gamma S$ (figuras 3d, 3e y 3g).

Ejemplo 4. Cristalización asistida por Nanobody del complejo $\beta 2AR-Gs$

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son responsables de la mayoría de respuestas celulares a hormonas y neurotransmisores así como de los sentidos de la vista, el olfato y el gusto. El paradigma de señalización de GPCR es la activación de una proteína de unión a GTP heterotrimérica (proteína G) mediante un receptor ocupado por agonista. En un esfuerzo por entender la base estructural para la señalización de GPCR, se cristalizó el complejo $\beta 2AR-Gs$ para resolver su estructura mediante cristalografía de rayos X.

Un reto para la cristalogenéesis fue preparar un complejo $\beta 2AR:Gs$ estable en disolución de detergente. El $\beta 2AR$ y Gs se acoplan eficazmente en bicapas lipídicas, pero no en detergentes usados para solubilizar y purificar estas proteínas (ejemplo 1). Se encontró que podría prepararse un complejo $\beta 2AR:Gs$ relativamente estable mezclando GDP-Gs purificado (concentración final de aproximadamente 100 μM) con un exceso molar de $\beta 2AR$ purificado unido a un agonista de alta afinidad (BI167107; Rasmussen *et al.* 2011) en disolución de dodecilmaltósido. Se añadió apirasa, una purina pirofosfatasa no selectiva, para hidrolizar el GDP liberado de Gs en la formación de un complejo

con el β_2 AR. Posteriormente se purificó el complejo mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos secuenciales y cromatografía de exclusión molecular. Se potenció la estabilidad del complejo intercambiándolo en un detergente de maltosa-neopentilglicol desarrollado recientemente (NG-310, Anatrace) (Chae *et al.* 2010). Este complejo podía incubarse a temperatura ambiente durante 24 h sin degradación apreciable; sin embargo, los esfuerzos iniciales para cristalizar el complejo usando exámenes en matriz dispersa en micelas de detergente, bicelas y fase cúbica lipídica (LCP) fallaron.

Para evaluar adicionalmente la calidad del complejo, se analizó la proteína mediante microscopía electrónica (EM) de partículas individuales. Los resultados confirmaron que el complejo era monodisperso (datos no mostrados), pero revelaron otros posibles cuellos de botella para obtener cristales de difracción de calidad. En primer lugar, el detergente usado para estabilizar el complejo formó una gran micela, dejando poca superficie polar sobre el lado extracelular del complejo β_2 AR:Gs para la formación de contactos de estructura reticular cristalina. Por tanto, se reemplazó el extremo amino terminal no estructurado en el β_2 AR con lisozima de T4 (T4L). Se usó previamente T4L para facilitar la cristalogénesis del β_2 AR inactivo insertando T4L entre los extremos citoplasmáticos de los segmentos transmembrana (TM) 5 y 6 (Rosenbaum *et al.* 2007). Esta proteína de fusión (T4L- β_2 AR) mostró propiedades de unión a ligando y acoplamiento de Gs normales. Se llevaron a cabo ensayos de cristalización en LCP usando una monoleía modificada (7.7 MAG, proporcionada por Martin Caffrey) diseñada para adaptarse al gran componente hidrófilo del complejo T4L- β_2 AR:Gs (Misquitta *et al.* 2004). Aunque pudieron obtenerse cristales pequeños que difractaron a 7 Å, no pudo mejorarse su calidad a través del uso de aditivos y otras modificaciones.

Otro posible problema para la cristalogénesis revelado por el análisis de EM de partículas individuales fue la variabilidad aumentada en la colocación del componente de hélice α de la subunidad $G\alpha_s$. $G\alpha_s$ consiste en dos dominios, el dominio GTPasa similar a ras ($G\alpha_s$ Ras), que interacciona con el β_2 AR y la subunidad $G\beta$, y el dominio de hélice α ($G\alpha$ SAH) (Sprang *et al.* 1997). La superficie de contacto de los dos subdominios $G\alpha_s$ forma la cavidad de unión a nucleótidos (figura 1), y los promedios 2D de EM y las reconstrucciones 3D sugieren que en ausencia de nucleótido de guanina, $G\alpha$ SAH tiene una posición variable en relación con el complejo T4L- β_2 AR- $G\alpha$ sRAS- $G\beta\gamma$ (figura 1b).

En un esfuerzo por facilitar adicionalmente la cristalogénesis del complejo, se intentó la cocristalización del complejo con Nanobody 35. Nb35 protege el complejo de la disociación mediante $GTP\gamma S$, lo que sugiere una interacción Gs:Nb de estabilización (figura 3a). Se mezclaron el complejo T4L- β_2 AR:Gs unido a BI-167107 y Nb35 en una razón molar de 1:1,2 (véanse las figuras 6 y 7). Se verificó el pequeño exceso molar de Nb35 mediante filtración en gel analítica (figura 7b). Se incubó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente antes de mezclarse con 7.7 MAG (facilitado por Martin Caffrey) que contenía el 10% de colesterol (C8667, Sigma) en una razón de proteína con respecto a lípido de 1:1 (p/p) usando el método de mezclado con jeringuilla doble indicado previamente (Caffrey 2009). La concentración del complejo R:G:Nb en 7.7 MAG fue de aproximadamente 25 mg/ml. Se administró la mezcla de proteínas:lípidos a través de un robot de dispensación de LCP (Gryphon, Art Robbins Instruments) en gotas de 40 nl a placas sándwich de vidrio o bien de 24 pocillos o bien de 96 pocillos y se recubrieron en bloque con 0,8 μ l de disolución precipitante. Inicialmente se identificaron prototipos de cristalización múltiple usando exámenes internos basados parcialmente en reactivos del kit StockOptions Salt (Hampton Research). Se hicieron crecer cristales para la recogida de datos en PEG 400 del 18 al 22%, MES 100 mM pH 6,5 (figura 1c), nitrato de potasio de 350 a 450 mM, foscanet 10 mM (figura 3b), TCEP 1 mM y BI167107 10 μ M. Los cristales alcanzaron tamaño completo en el plazo de 3-4 días a 20°C (figura 8) y se recogieron de una mesofase de tipo esponja y se ultracongelaron sin agente crioprotector adicional en nitrógeno líquido.

Ejemplo 5: Nb35 facilita la formación de cristales del complejo R:G

El complejo T4L- β_2 AR:Gs:Nb35 unido a BI-167107 cristalizó en el grupo espacial $P2_1$, con un solo complejo en cada unidad asimétrica. La figura 9a muestra las interacciones de empaquetamiento cristalográfico. La figura 9b muestra la estructura del complejo completo incluyendo T4L y Nb35, y la figura 9c muestra el complejo β_2 AR:Gs solo.

Los complejos T4L- β_2 AR:Gs:Nb35 unidos a BI-167107 se disponen en capas acuosas y lipídicas alternas con contactos de estructura reticular formados casi exclusivamente entre los componentes solubles del complejo, dejando las moléculas de receptor suspendidas entre capas de proteínas G y ampliamente separadas entre sí en el plano de la membrana. Se forman amplios contactos de estructura reticular entre todas las proteínas solubles, representando probablemente la difracción global fuerte y la densidad electrónica notablemente clara para la proteína G.

Nb35 y T4L facilitaron la formación de cristales del complejo T4L- β_2 AR:Gs:Nb35 unido a BI-167107. Nb35 se une a un epítipo conformacional en Gs y se empaqueta en la superficie de contacto de las subunidades $G\beta$ y $G\alpha$ con la región determinante de complementariedad (CDR, definida según la numeración IMTG; Lefranc, 2003) 1 que interacciona principalmente con $G\beta$ (figura 10a) y un bucle de CDR3 largo que interacciona tanto con la subunidad $G\beta$ como con la $G\alpha$ (figura 10b). Algunas regiones de marco de Nb35 también interaccionan con $G\alpha$ del mismo complejo (figura 10c). Otras regiones de marco de un complejo interaccionan con las subunidades $G\alpha$ de dos complejos adyacentes (figura 11), contribuyendo considerablemente a los contactos cristalinos dentro de la estructura reticular cristalina. T4L forma interacciones relativamente escasas con el extremo amino-terminal del

receptor, pero se empaqueta contra el extremo amino-terminal de la subunidad $G\beta$ de un complejo, el extremo carboxilo-terminal de la subunidad $G\gamma$ de otro complejo, y la subunidad $G\alpha$ de aún otro complejo.

Ejemplo 6. Estructura del β_2 AR en estado activo

La estructura de β_2 AR:Gs proporciona los primeros conocimientos de alta resolución sobre el mecanismo de transducción de señales a través de la membrana plasmática por un GPCR, y la base estructural para las propiedades funcionales del complejo ternario. La figura 12a compara las estructuras del receptor unido a agonista en el complejo β_2 AR:Gs y el β_2 AR inactivo unido a carazolol. La mayor diferencia entre las estructuras inactivas y activas es un movimiento hacia el exterior de 14 Å de TM6 cuando se mide en el carbono $C\alpha$ de E268. Hay un movimiento hacia el exterior más pequeño y la extensión del extremo citoplasmático de la hélice de TM5 de 7 residuos. Una extensión de 26 aminoácidos en el tercer bucle intracelular (ICL3) está desordenada. Otra diferencia notable entre las estructuras inactivas y activas es el segundo bucle intracelular (ICL2), que forma un bucle extendido entre la estructura de β_2 AR inactiva y una hélice α en el complejo β_2 AR:Gs. Esta hélice también se observa en la estructura de β_2 AR-Nb80 (figura 12b); sin embargo, puede no ser una característica que sea única para el estado activo, puesto que también se observa en la estructura inactiva del β_1 AR aviar altamente homólogo (Warne *et al*, 2008).

La calidad de los mapeos de densidad electrónica para el β_2 AR es la mayor en esta superficie de contacto de β_2 AR- $G\alpha s$ Ras, y mucho más débil para la mitad extracelular, posiblemente debido a la falta de contactos de estructura reticular cristalina con la superficie extracelular (figura 9a). Como resultado, no puede modelarse con seguridad el agonista de alta afinidad (BI-167107) en la cavidad de unión a ligando. Sin embargo, la estructura global del β_2 AR en el complejo T4L- β_2 AR:Gs es muy similar a la estructura en estado activo reciente de β_2 AR estabilizada por un Nanobody mimético de proteína G (Nb80). Estas estructuras se desvían principalmente en los extremos citoplasmáticos de los TM 5 y 6 (figura 12b), debido posiblemente a la presencia de T4L que sustituye a ICL3 en la estructura de β_2 AR-Nb80. No obstante, el complejo β_2 AR-Nb80 presenta la misma alta afinidad por el agonista isoproterenol que el complejo β_2 AR:Gs (Rasmussen *et al*, 2011), lo que concuerda con la alta homología estructural entorno a la cavidad de unión a ligando. Los mapeos de densidad electrónica para los cristales de β_2 AR-Nb80 proporcionan una vista más fiable de los reordenamientos conformacionales de aminoácidos entorno a la cavidad de unión a ligando y entre la cavidad de unión a ligando y la superficie de contacto de acoplamiento con Gs (Rasmussen *et al*, 2011).

La figura 12c muestra la posición de los motivos de secuencia altamente conservados incluyendo D/ERY y NPxxY en el complejo β_2 AR:Gs en comparación con el complejo β_2 AR-Nb80 (véase también la figura 13). Se ha propuesto que estas secuencias conservadas son importantes para la activación o para el mantenimiento del receptor en el estado inactivo (Hofmann *et al*, 2009). Las posiciones de estos aminoácidos son esencialmente idénticas en estas dos estructuras lo que demuestra que Nb80 es un sustituto de proteína G muy bueno. Sólo Arg131 difiere entre estas dos estructuras. En la estructura de β_2 AR-Nb80, la Arg131 interacciona con Nb80, mientras que en la estructura de β_2 AR:Gs, Arg131 se empaqueta contra Tyr391 de $G\alpha s$ (figura 13).

El estado activo del β_2 AR se estabiliza mediante amplias interacciones con ($G\alpha s$ Ras) (figura 14). No hay interacciones directas con las subunidades $G\beta$ o $G\gamma$. La superficie enterrada total de la superficie de contacto de β_2 AR- $G\alpha s$ Ras es de 2576 Å² (1300 Å² para $G\alpha s$ Ras y 1276 Å² para el β_2 AR). Esta superficie de contacto se forma mediante ICL2, TM5 y TM6 del β_2 AR, y mediante la hélice $\alpha 5$, la unión αN - $\beta 1$, la parte superior de la hebra $\beta 3$ y la hélice $\alpha 4$ de $G\alpha s$ Ras (véase la tabla 6 para interacciones específicas). Se ha demostrado que las secuencias de β_2 AR implicadas en esta interacción desempeñan un papel en el acoplamiento de proteínas G; sin embargo, no hay ninguna secuencia consenso clara para la especificidad de acoplamiento de Gs cuando estos segmentos se alinean con otros GPCR. Quizá esto no sea sorprendente considerando que β_2 AR también se acopla a G_i y que muchos GPCR se acoplan a más de una isoforma de proteína G. La base estructural para la especificidad de acoplamiento de proteínas G debe implicar por tanto características más sutiles de la estructura secundaria y terciaria. No obstante, una interacción notable implica Phe139, que está ubicada al comienzo de la hélice ICL2 y se asienta en una cavidad hidrófoba formada por la His 41 de $G\alpha s$ al comienzo de la hebra $\beta 1$, Val213 al comienzo de la hebra $\beta 3$ y Phe376, Arg380 y Ile383 en la hélice $\alpha 5$ (figura 14c). El mutante F139A de β_2 AR presenta acoplamientos con Gs alterados gravemente (Moro *et al*, 1993). El residuo correspondiente a Phe139 es una Phe o Leu en casi todos los receptores acoplados a Gs, pero es más variable en los GPCR que se sabe que se acoplan a otras proteínas G. Es de interés que la hélice ICL2 se estabiliza mediante una interacción entre Asp130 de la secuencia DRY conservada y Tyr141 en el centro de la hélice ICL2 (figura 14c). Se ha demostrado que Tyr141 es un sustrato para la tirosina cinasa receptora de insulina (Baltensperger *et al*, 1996); sin embargo, actualmente se desconoce la importancia funcional de esta fosforilación.

Ejemplo 7. Estructura de Gs activada

La observación más sorprendente en el complejo β_2 AR:Gs es el gran desplazamiento de $G\alpha s$ AH en relación con $G\alpha s$ Ras (una rotación de aproximadamente 180° alrededor de la unión entre los dominios) (figura 15a). En la estructura cristalina de $G\alpha s$, la cavidad de unión a nucleótidos se forma mediante la superficie de contacto entre

G α sRas y G α sAH. La unión del nucleótido de guanina estabiliza la interacción entre estos dos dominios. La pérdida de este efecto de estabilización de la unión del nucleótido de guanina concuerda con la alta flexibilidad observada para G α sAH en el análisis de EM de partículas individuales del complejo solubilizado con detergente (datos no mostrados). Esto también está de acuerdo con el aumento en el intercambio de deuterio en la superficie de contacto entre estos dos dominios tras la formación del complejo (datos no mostrados). Recientemente Hamm, Hubbell y colaboradores, usando espectroscopía de resonancia de electrón doble (DEER), documentaron grandes cambios (de hasta 20 Å) en la distancia entre sondas de nitróxido colocadas en los dominios Ras y helicoidal de Gi tras la formación de un complejo con rodopsina activada por luz (Van Eps 2011). Por tanto, quizá no es sorprendente que G α sAH se desplace en relación con G α sRas; sin embargo, su localización en esta estructura cristalina refleja probablemente la influencia de interacciones de empaquetamiento cristalino más que una conformación fisiológica.

Las asociaciones conformacionales entre β_2 AR y la cavidad de unión a nucleótidos implican principalmente las hélices amino y carboxilo terminales de G α s (figura 14). La figura 15b se centra en la región de G α sRAS que experimenta el mayor cambio conformacional cuando se compara la estructura de G α sRAS del complejo Gs- β_2 AR complejo con la del complejo G α s-GTP γ S (Sunahara *et al.* 1997). La mayor diferencia se observa para la hélice α_5 , que está desplazada 6 Å hacia el receptor y rotada ya que el extremo carboxilo terminal se proyecta hacia el núcleo transmembrana del β_2 AR. Asociado con este movimiento, el bucle β_6 - α_5 , que interacciona con el anillo de guanina en la estructura de G α s-GTP γ S, está desplazado hacia fuera, alejándose de la cavidad de unión a nucleótidos (figuras 15b-d). El movimiento de la hélice α_5 también está asociado con cambios en las interacciones entre esta hélice y la lámina β_6 , el bucle α N- β_1 y la hélice α_1 . La hebra β_1 forma otra asociación entre el β_2 AR y la cavidad de unión a nucleótidos. El extremo C-terminal de esta hebra cambia la conformación entorno a Gly47, y hay cambios adicionales en el bucle β_1 - α_1 (bucle P) que coordina el fosfato γ en la forma unida a GTP (figura 15 b-d). Las observaciones en la estructura cristalina están de acuerdo con experimentos de intercambio de deuterio en los que se potencia el intercambio de deuterio en la lámina β_1 y el extremo amino terminal de la hélice α_5 tras la formación del complejo β_2 AR:Gs libre de nucleótido (datos no mostrados).

No se ha determinado la estructura de un heterotrímero de Gs, por lo que no es posible comparar directamente la superficie de contacto de G α s-GP γ antes y después de la formación del complejo β_2 AR:Gs. Basándose en la estructura del heterotrímero de Gi unido a GDP (Wall *et al.* 1995), no se observan grandes cambios en las interacciones entre G α sRAS y G $\beta\gamma$ tras la formación del complejo con β_2 AR. Esto también concuerda con estudios de intercambio de deuterio (datos no mostrados). Debe indicarse que Nb35 se une en la superficie de contacto entre G α sRas y G β (figura 2b). Por tanto, no puede excluirse la posibilidad de que Nb35 puede influir en la orientación relativa de la superficie de contacto de G α sRas-G $\beta\gamma$ en la estructura cristalina. Sin embargo, los estudios de EM de partículas individuales proporcionan evidencia de que Nb35 no altera las interacciones entre G α sAH y G α sRas (datos no mostrados).

Ejemplo 8: Nb35 y Nb37 se unen a diferentes epítomos en Gs e inhiben la unión a nucleótidos

Para investigar el efecto de los Nanobodies (Nb35 y Nb37) sobre Gs sola, se añadieron Nanobodies junto con bodipy-GTP γ S-FL y diversas preparaciones de proteínas Gs en Tris-HCl 20 mM, Ph 8,0, MgCl₂ 3 mM, DTT 1 mM en un volumen final de 200 μ l. Las muestras que contenían una proteína Gs heterotrimérica también incluían DDM al 0,1%. Bodipy-GTP γ S-FL es un análogo de GTP fluorescente estable ($\lambda_{ex} \cong 470$ nm, $\lambda_{em} \cong 515$ nm). Su intensidad de fluorescencia aumenta tras la unión de la proteína G y, por tanto, puede usarse Bodipy-GTP γ S-FL para mediciones en tiempo real de la unión de nucleótidos a proteínas G (McEwen *et al.* 2001). Se midió la fluorescencia en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos en un lector de placas de fluorescencia M5 (Molecular Precision).

En un primer experimento (figura 16), se incubaron cantidades crecientes de Nb37 con G α S 1 μ M y Bodipy-GTP γ S-FL 100 nM y se midió el aumento de fluorescencia en una escala de tiempo corto (300 segundos) para minimizar la acumulación del producto de hidrólisis, bodipy-fosfato (Jameson *et al.* 2005). Se purificó la subunidad G α s de la proteína Gs heterotrimérica tal como se describió anteriormente (Sunahara *et al.* 1997). A partir de este experimento, parece que Nb37 bloquea la unión de GTP γ S a G α s sola de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados también indican que el epítipo de unión de Nb37 está confinado a la subunidad G α s de la proteína Gs heterotrimérica. En un experimento similar (figura 17), se incubaron cantidades crecientes de Nb35 con G α s purificada 1 μ M y Bodipy-GTP γ S-FL 100 nM. De acuerdo con la observación de que Nb35 se une a un epítipo compuesto por elementos de G α sRAS y G β (véase el ejemplo 7), Nb35 no tiene efecto sobre la unión de GTP γ S a la subunidad G α S sola.

En otro experimento (figura 18), se incubaron cantidades crecientes de Nb35 con 1 μ M del heterotrímero G $\alpha\beta\gamma$ purificado y Bodipy-GTP γ S-FL 100 nM. Este experimento indica que Nb35 bloquea la unión de GTP γ S al heterotrímero de G $\alpha\beta\gamma$ libre de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 9. Nb35 estabiliza otros complejos agonista-GPCR-Gs

La subunidad Gs alfa (o proteína Gs) es una subunidad de proteína G heterotrimérica que activa la ruta dependiente de AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa. Los receptores acoplados a proteínas G que se acoplan a

Gs incluyen: receptores 5-HT tipos 5-HT₄ y 5-HT₇, receptor de ACTH, receptor de adenosina tipos A_{2a} y A_{2b}, receptor de arginina-vasopresina 2, receptores β -adrenérgicos tipos β_1 , β_2 y β_3 , receptor de calcitonina, receptor peptídico relacionado con el gen de calcitonina, receptor de la hormona liberadora de corticotropina, familia de receptores de dopamina similares a D₁ (D₁ y D₅), receptor de FSH, receptor del polipéptido inhibidor gástrico, receptor de glucagón, receptor del péptido similar a glucagón 1 (GLP1-R), receptor de histamina H₂, receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina, receptor de melanocortina, receptor 1 de hormona paratiroidea, receptor de prostaglandina tipos D₂ y I₂, receptor de secretina, receptor de tirotrina, entre otros.

Para determinar si los Nanobodies que se unen a Gs en β 2AR:Gs:BI167107 también estabilizan otros complejos GPCR:Gs:agonista, se preparó un complejo del receptor de arginina-vasopresina 2 (número de registro P30518; V2R_HUMAN) en complejo con Gs, Nb35 y arginina-vasopresina (AVP:NT4LV2R:Gs) y se demostró la estabilidad de este complejo en SEC. Arginina-vasopresina (AVP), también conocida como vasopresina, argipresina u hormona antidiurética, es un ligando natural que activa el receptor de arginina-vasopresina 2.

Se logró la formación de un complejo estable (figura 19a) mezclando el heterotrímero de Gs con etiqueta de His a una concentración de aproximadamente 90 μ M con NT4LV2R unido a AVP (90 μ M) y Nb35 (100 μ M) en 0,1 ml de tampón (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, DDM al 0,1%, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, AVP 10 μ M) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se purificó el complejo AVP:NT4LV2R:Gs en dos etapas de purificación por afinidad sucesivas. Se monitorizó la purificación mediante SDS-PAGE (figura 19). En primer lugar, se aplicó el complejo sobre una columna de Ni-NTA tras añadir 300 ml de MNG al 1% en tampón HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM sobre la mezcla de reacción. Tras el lavado exhaustivo con tampón, se eluyó el complejo en MNG al 0,2%, HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, AVP 10 μ M con imidazol 200 mM. A continuación, se aplicó el complejo sobre una columna de afinidad con etiqueta FLAG, se lavó exhaustivamente en el mismo tampón que contenía MNG al 0,01% y se eluyó con FLAG-péptido. Se monitorizó este procedimiento mediante SDS-PAGE (figura 19b) y muestra que puede purificarse por consiguiente un complejo que contiene NT4LVTR, G α S, G β , G γ y Nb35. Este complejo se purificó adicionalmente mediante SEC en una columna Superdex200 en HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MNG al 0,01%, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, AVP 1 μ M). Se monitorizó este procedimiento mediante SDS-PAGE (figura 19c) y muestra que puede purificarse por consiguiente un complejo monodisperso que contiene NT4LVTR, G α S, G β , G γ y Nb35.

Para confirmar la estabilidad del complejo AVP:NT4LV2R:Gs, se incubó la muestra purificada durante 24 h en hielo y se volvió a aplicar a SEC para conformar su carácter monodisperso y su PM (figura 20). Tal como se esperaba, una cantidad en exceso del antagonista SR121463 (10 μ M) altera el complejo AVP:NT4LV2R:Gs.

Ejemplo 10. Examen mejorado para determinar agonistas o moduladores alostéricos positivos usando Nanobodies que estabilizan complejos GPCR:proteína G.

Un Nanobody que estabiliza selectivamente un conformero no prominente de GPCR permitirá un examen más eficaz para ligandos que interaccionan selectivamente con este conformero de baja abundancia particular. Además, también podrían usarse Nanobodies selectivos de conformero para desenmascarar sitios farmacoconvertibles alostéricos u ocultos o para enmascarar a la inversa cavidades de unión no deseadas para el examen de fármacos. En el caso de que el conformero particular sea un estado activo, los ligandos identificados tendrán una alta probabilidad de comportarse como agonistas, lo que se respalda por experimentos de acoplamiento informáticos descritos por Costanzi & Vilar (2011). De hecho, sus resultados indican que las estructuras activadas favorecen la identificación de agonistas con respecto a antagonistas, mientras que las estructuras inactivas favorecen la identificación de bloqueantes de receptor con respecto a agonistas.

Se proporciona evidencia de que Nb35 estabiliza el complejo entre el β 2AR activado y la proteína G mediante la unión a la superficie de contacto de las subunidades G α s y G β γ . Un ejemplo de un ensayo de examen para identificar ligandos que interaccionan selectivamente con el conformero de estado activo poco abundante de β 2AR puede ser un ensayo de radioligando que usa Nb35 para cambiar la población de β 2AR más hacia su estado activo. Un ensayo de radioligando de este tipo puede ejecutarse de manera similar a la descrita por Seifert y colaboradores (1998) con pequeñas modificaciones. Se describe en el presente documento un ensayo que implica β 2AR como la diana de elección que reemplaza a β 2AR por otro GPCR que interacciona con la subunidad G α s, permitiendo la implementación de métodos de examen similares para identificar ligandos agonistas contra ese GPCR particular. Puede examinarse una biblioteca basada en moléculas pequeñas (el PM del compuesto será normalmente de entre 250 y 1000 Da) o incluso basada en fragmentos (el PM del compuesto será normalmente < 250 Da) para identificar los agonistas candidatos. La estabilización del conformero no prominente aumentará considerablemente el rendimiento de los exámenes de la biblioteca de fragmentos, especialmente debido a que las coincidencias iniciales en el examen de fármacos basado en fragmentos normalmente tienen una potencia/afinidad bajas. Nb35 aumentará selectivamente la afinidad de esos compuestos que son específicos para el conformero farmaconvertible selectivo, teniendo por tanto un efecto profundo sobre la identificación de fragmentos *de novo*.

Se incubaba una cantidad apropiada (normalmente 10 μ g) de extractos de membrana homogenizados de β 2AR humano de células HEK293T que contienen las subunidades de proteína G ancladas a la membrana en paralelo con Nb35 o un Nanobody no relacionado (que no estabiliza la conformación de GPCR activo) durante 1 h a 30°C en

tampón de incubación (Hepes 50 mM pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM y BSA al 0,5% p/v). Los Nanobodies se suministran de manera exógena en un gran exceso molar (por ejemplo $\geq 1 \mu\text{M}$) frente al receptor adrenérgico. Posteriormente, se añaden las membranas unidas a Nanobody a placas de 96 pocillos que contienen compuestos de biblioteca y 2 nM del radioligando antagonista 3H-dihidroalprenolol (DHA). Se ajusta el volumen total por pocillo con tampón de incubación a 100 μl y se incuba adicionalmente la mezcla de reacción durante otra hora a 30°C. Posteriormente, se recoge el radioligando unido a membrana usando una placa de filtro de 96 pocillos de fibra de vidrio GF/C (Perkin Elmer) sumergida previamente en polietilenimina al 0,3%. Se lavan las placas de filtro con tampón de lavado helado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), y se secan durante 30 minutos a 50°C. Tras añadir 25 μl de líquido de centelleo (MicroScint™-O, Perkin Elmer), se mide la radioactividad (cpm) en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux. Aquellos compuestos de la biblioteca que disminuyen significativamente las cpm en presencia de Nb35 a la vez que no usan el Nanobody no relacionado se consideran ligandos agonistas. Las coincidencias de agonista candidato identificadas a través del examen de biblioteca primario volvieron a someterse a examen de una manera de respuesta a la dosis. Se calcularán los valores de CI50 de las curvas de % de desplazamiento de radioligando para cada agonista candidato en presencia de Nb35 y el Nanobody no relacionado usando el software Graphpad Prism. Para demostrar el agonismo eficaz de los compuestos identificados *de novo*, se evaluarán el efecto dependiente de la dosis de estos compuestos en un ensayo de señalización de $\beta 2\text{AR}$ celular. Un ejemplo de un ensayo de este tipo se basa en la detección de moléculas de mensajero secundario tales como AMPc tras la señalización mediada por G α_s (por ejemplo, tecnología de ensayo de AMPc HitHunter, DiscoverX). En lugar de usar extractos de membrana y Nb35 aplicado de modo endógeno, el ensayo de radioligando podría realizarse en una línea celular que expresa $\beta 2\text{AR}$ cotransfectada con Nb35 como intracuerpo (o membranas derivadas) con el fin de cambiar la población de $\beta 2\text{AR}$ a su estado activo. Alternativamente, puede usarse $\beta 2\text{AR}$ y proteína G recombinante para estabilizar a través de Nb35 el estado activo del $\beta 2\text{AR}$.

Material y métodos para los ejemplos

Expresión y purificación de $\beta 2\text{AR}$, heterotrímero de Gs y Nanobody-35

Se expresó un constructo de lisozima de T4- $\beta 2\text{AR}$ fusionado en el extremo N-terminal truncado en la posición 365 (T4L- $\beta 2\text{AR}$, descrito en detalle a continuación) en cultivos de células de insecto Sf-9 infectados con baculovirus recombinantes (BestBac, Expression Systems), y se solubilizó en n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) según métodos descritos anteriormente (Kobilka *et al.* 1995) (véase la figura 6 para una visión general de la purificación). Se usó un constructo de $\beta 2\text{AR}$ truncado tras el residuo 365 ($\beta 2\text{AR}$ -365; SEQ ID NO: 55) para la mayoría de los experimentos analíticos y para los experimentos de intercambio de deuterio. La cromatografía de afinidad con M1 Flag (Sigma) sirvió como etapa de purificación inicial seguida por cromatografía con alprenolol-Sepharose para la selección del receptor funcional. Se usó una etapa de cromatografía de afinidad con M1 Flag posterior para intercambiar alprenolol unido a receptor por el agonista de alta afinidad BI-167107. Se eluyó el receptor unido a agonista, se dializó frente a tampón (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DDM al 0,1% y BI-167107 10 μM), se trató con fosfatasa lambda (New England Biolabs), y se concentró hasta aproximadamente 50 mg ml⁻¹ con un concentrador de Millipore de punto de corte de peso molecular (MWCO) de 50 kDa. Antes de la concentración por centrifugación, se trató el constructo $\beta 2\text{AR}$ -365, pero no T4L- $\beta 2\text{AR}$, con PNGaseF (New England Biolabs) para retirar la glicosilación unida al extremo en N al extremo amino-terminal. El receptor purificado se analizó de manera rutinaria mediante tinción con SDS-PAGE/azul brillante de Coomassie (véase la figura 5a).

Se expresaron la subunidad corta G α_s bovina, G β_1 de rata fusionada a una etiqueta de His6, y G $\gamma 2$ de rata (véase la tabla 5) en células de insecto High 5 (Invitrogen) crecidas en medios libre de suero Insect Xpress (Lonza). Se hicieron crecer los cultivos a una densidad de 1,5 millones de células por ml y entonces se infectaron con tres virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* separados que contenían cada uno el gen para una de las subunidades de la proteína G a una multiplicidad de infección de 1:1 (los virus fueron un generoso obsequio del Dr. Alfred Gilman). Tras 40-48 horas de incubación, se recogieron las células infectadas mediante centrifugación y se resuspendieron en 75 ml de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 8,0, NaCl 65 mM, MgCl₂ 1,1 mM, EDTA 1 mM, 1x PTT (fluoruro de fenilmetanosulfonilo 35 $\mu\text{g/ml}$, tosil fenilalanil clorometil cetona 32 $\mu\text{g/ml}$, tosil lisil clorometil cetona 32 $\mu\text{g/ml}$), 1x LS (leupeptina 3,2 $\mu\text{g/ml}$ e inhibidor de tripsina de soja 3,2 $\mu\text{g/ml}$), β -ME 5 mM y GDP 10 μM) por litro de volumen de cultivo. Se presurizó la suspensión con 600 psig de N₂ durante 40 minutos en una bomba de cavitación de nitrógeno (Parr Instrument Company). Tras la despresurización, se centrifugó el lisado para retirar los núcleos y las células no lisadas, y luego se ultracentrifugó a 180.000 x g durante 40 minutos. Se resuspendieron las membranas sedimentadas en 30 ml de tampón de lavado (HEPES 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 100 μM , 1x PTT, 1x LS, β -ME 5 mM, GDP 10 μM) por litro de volumen de cultivo usando un homogeneizador Dounce y se centrifugó de nuevo a 180.000 x g durante 40 minutos. Se resuspendió el sedimento lavado en un volumen mínimo de tampón de lavado y se ultracongelaron con nitrógeno líquido.

Se descongelaron las membranas congeladas y se diluyeron para dar una concentración de proteína total de 5 mg/ml con tampón de lavado reciente. Se añadió detergente de colato de sodio a la suspensión a una concentración final de MgCl₂ al 1,0% hasta una concentración final de 5 mM, y se añadieron 0,05 mg de proteína fosfatasa 5 purificada (preparada internamente) por litro de volumen de cultivo. Se agitó la muestra en hielo durante 40 minutos, y luego se centrifugó a 180.000 x g durante 40 minutos para retirar los desechos insolubles. Se diluyó el

sobrenadante 5 veces con tampón cargado con Ni-NTA (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 363 mM, MgCl₂ 1,25 mM, imidazol 6,25 mM, Anzergent 3-12 al 0,2%, 1x PTT, 1x LS, β-ME 5 mM, GDP 10 μM), teniendo cuidado de añadir el tampón lentamente para evitar la disminución de la concentración de colato por debajo de la concentración micelar crítica demasiado rápidamente. Se añadieron 3 ml de resina de Ni-NTA (Qiagen) pre-equilibrada en tampón de lavado 1 de Ni-NTA (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, MgCl₂ 2 mM, imidazol 5 mM, colato al 0,2%, Anzergent 3-12 al 0,15%, 1x PTT, 1x LS, β-ME 5 mM, GDP 10 μM) por litro de volumen de cultivo y se agitó la muestra en hielo durante 20 minutos. Se recogió la resina en una columna de gravedad y se lavó con 4x volúmenes de columna de tampón de lavado 1 de Ni-NTA, tampón de lavado 2 de Ni-NTA (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, imidazol 10 mM, Anzergent 3-12 al 0,15%, DDM al 0,1%, 1x PTT, 1x LS, β-ME 5 mM, GDP 10 μM), y tampón de lavado 3 de Ni-NTA (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, imidazol 5 mM, DDM al 0,1%, 1x PTT, 1x LS, β-ME 5 mM, GDP 10 μM). Se eluyó la proteína con tampón de elución de Ni-NTA (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 40 mM, MgCl₂ 1 mM, imidazol 200 mM, DDM al 0,1%, 1x PTT, 1x LS, β-ME 5 mM, GDP 10 μM). Se combinaron las fracciones que contenían proteína y se añadió MnCl₂ hasta una concentración final de 100 μM. Se añadieron 50 μg de proteína fosfatasa lambda purificada (preparada internamente) por litro de volumen de cultivo y se incubó el eluato en hielo con agitación durante 30 minutos. Se hizo pasar el eluato a través de un filtro de 0,22 μm y se cargó directamente sobre una columna MonoQ HR 16/10 (GE Healthcare) equilibrada en tampón A de MonoQ (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 100 μM, DDM al 0,1%, β-ME 5 mM, 1x PTT). Se lavó la columna con 150 ml de tampón A a 5 ml/min y se eluyeron las proteínas unidas sobre 350 ml con un gradiente lineal de hasta el 28% de tampón B de MonoQ (igual que el tampón A, excepto con NaCl 1 M). Se recogieron las fracciones en tubos a los que se les añadió GDP suficiente como para obtener una concentración final de 10 μM. Se concentraron las fracciones que contenían Gs hasta 2 ml usando una célula de ultrafiltración con agitación con una membrana de celulosa regenerada con NMWL de 10 kDa (Millipore). Se hizo pasar la muestra concentrada por una columna Superdex 200 prep grade XK 16/70 (GE Healthcare) equilibrada en tampón S200 (HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM, DDM al 0,012%, TCEP 100 μM, GDP 2 μM). Se combinaron las fracciones que contenían Gs pura, se añadió glicerol hasta una concentración final del 10%, y entonces de concentró la proteína hasta al menos 10 mg/ml usando un dispositivo de ultrafiltración centrífugo Amicon de celulosa regenerada de MWCO de 30 kDa. Entonces se tomaron alícuotas de la muestra concentrada, se ultracongelaron y se almacenaron a -80°C. Un rendimiento típico del heterotrímero de Gs purificado final a partir de 8 litros de cultivo celular fue de 6 mg.

Se expresó Nanobody-35 (Nb35) (SEQ ID NO: 1) en el periplasma de la cepa WK6 de *Escherichia coli*, se extrajo y se purificó mediante cromatografía de afinidad con níquel según métodos descritos anteriormente (Rasmussen *et al.* 2011) seguido por cromatografía de intercambio iónico (figura 7a) usando una columna Mono S 10/100 GL (GE Healthcare). Se dializaron las fracciones de Nb35 seleccionadas frente a tampón (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM) y se concentraron hasta aproximadamente 65 mg ml⁻¹ con un concentrador Millipore de MWCO de 10 kDa.

Ingeniería genética de proteínas

Para aumentar la probabilidad de obtener cristales del complejo R:G se estableció aumentar el área superficial polar de la superficie extracelular de los receptores usando dos estrategias. El enfoque fue reemplazar el extremo N-terminal flexible y presumiblemente no estructurado por la proteína globular lisozima de T4 (T4L) usada anteriormente para cristalizar y resolver el receptor unido a carazolol (Rosenbaum *et al.* 2007). El constructo usado en este caso (T4L-β₂AR) contenía la secuencia señal escindible seguida por el epítipo M1 Flag (DYKDDDDA; SEQ ID NO: 70), la secuencia de reconocimiento de TEV proteasa (ENLYFQG; SEQ ID NO: 71), la lisozima del bacteriófago T4 de N2 a Y161 incluyendo las mutaciones C54T y C97A, y un ligador de alanina de dos residuos fusionado a la secuencia de β₂AR humano de D29 a G365 (constructo de fusión T4L-β₂AR definido por SEQ ID NO: 69). Se mutó el sitio de glicosilación inaccesible por PNGaseF de β₂AR en N187 para dar Glu. M96 y M98 en el primer bucle extracelular se reemplazaron cada uno por Thr para aumentar el nivel de expresión, de otro modo bajo, de T4L-β₂AR. Las mutaciones de treonina no afectaron a la afinidad de unión del ligando por ³H-dihidro-alprenolol, pero produjeron una disminución de aproximadamente dos veces en la afinidad por isoproterenol (datos no mostrados). Obsérvese que el β₂AR de referencia silvestre que se usa en este caso se define por SEQ ID NO: 72.

Procesamiento y recogida de datos de microcristalografía.

Se realizó la recogida de datos en la línea de haz 23 ID-B de la fuente avanzada de fotones. Se examinaron cientos de cristales y se compiló un conjunto de datos finales usando cuñas de difracción normalmente de 10 grados de 20 cristales que difractaban fuertemente. Se realizó la reducción de todos los datos usando HKL2000 (Otwinowski *et al.* 1997). Aunque en muchos casos se observó difracción más allá de 3 Å en los marcos iniciales, el daño por radiación y la difracción anisotrópica dieron como resultado baja completitud en niveles de resolución superiores. El análisis del conjunto de datos final mediante el servidor de anisotropía de difracción UCLA (Strong *et al.* 2006) indicó que la difracción a lo largo del eje recíproco a* fue superior que en otras direcciones. Basándose en un punto de corte F/sigF de 3 a lo largo de cada eje espacial recíproco, se sometieron las reflexiones a un truncamiento anisotrópico con límites de resolución de 2,9, 3,2, y 3,2 Angstroms a lo largo de a*, b* y c* antes de su uso en el refinamiento. Debido a la baja completitud de los niveles de alta resolución, se indica que esta estructura tiene una resolución global de sólo 3,3 Å, aunque debe indicarse que se incluyeron algunos datos de difracción de hasta 2,9 Å durante el refinamiento y el cálculo del mapa.

Resolución y refinamiento de la estructura

La estructura se resolvió mediante sustitución molecular usando un dispositivo Phaser (McCoy *et al.* 2007a, b). Se encontró que el orden de la sustitución molecular era crítico en la resolución de la estructura. En el orden usado, los modelos de búsqueda fueron: la estructura de las subunidades beta y gamma de la estructura de una proteína G heterotrimérica Gi (PDB ID: 1GP2), dominio alfa ras de Gs (PDB ID: 1AZT), receptor adrenérgico beta2 en estado activo (PDB ID: 3P0G), Nanobody de unión a beta2 (PDB ID: 3P0G), lisozima de T4 (PDB ID: 2RH1), dominio de hélice alfa de Gs (PDB ID: 1AZT). Tras la determinación de la estructura inicial mediante sustitución molecular, se realizaron el refinamiento de cuerpo rígido y el apareamiento simulado en Phenix (Afonine *et al.* 2005) y BUSTER (Blanc *et al.* 2004), seguido por el refinamiento restringido y la reconstrucción manual en Coot (Emsley *et al.* 2004). Tras el refinamiento iterativo y los ajustes manuales, se refinó la estructura en CNS usando el método DEN. Aunque la resolución de esta estructura supera aquella para la que DEN es más útil normalmente, la presencia de varias regiones resueltas escasamente indicó que la incorporación de información adicional para guiar el refinamiento podría proporcionar mejores resultados. Los modelos de referencia de DEN usados fueron los indicados anteriormente como modelos de búsqueda por sustitución molecular, con la excepción de NB35, que se ordenó bien y para el que no se dispone de estructura de alta resolución. Se prepararon figuras usando PyMOL (el sistema de gráficos moleculares PyMOL, versión 1.3, Schrödinger, LLC.). Los datos estadísticos de refinamiento se facilitan en la tabla 7.

Unión

Se prepararon membranas que expresaban β_2 AR o la fusión β_2 AR-péptido Gs a partir de células Sf9 infectadas por baculovirus y se realizó la unión de 3 H-dihidroalprenolol (3 H-DHA) tal como se describió anteriormente (Swaminath *et al.* 2002). Para la unión por competición, se incubaron las membranas con 3 H-DHA (1,1 nM final) y concentraciones crecientes de (-)-isoproterenol (ISO) durante 1 h antes de la recogida sobre filtros GF/B. Los datos de competición se ajustaron a un modelo de unión de dos sitios y se calcularon las fracciones y las K_i alta y baja de ISO usando GraphPad Prism.

Purificación de NT4LV2R

Se expresó el constructo T4L V2R fusionado al extremo N-terminal (NT4L-V2R; SEQ ID NO: 73) en células Sf9 usando el sistema de baculovirus (PfastBac). Se infectaron las células a una densidad de 4×10^6 células por ml y se agitaron los matraces de cultivo a 27°C durante 48 h. Tras la recogida, se lisaron las células mediante choque osmótico en un tampón que comprendía Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, Tolvaptan 1 μ M (Sigma) y yodoacetamida 2 mg ml⁻¹ para bloquear las cisteínas reactivas. La extracción de NT4LV2R de las membranas de Sf9 se realizó con un homogeneizador Dounce en un tampón de solubilización que comprendía dodecilmaltósido (DDM) al 0,5%, colato al 0,3%, hemisuccinato de colesterol al 0,03% (CHS), HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, glicerol al 30% v/v, yodoacetamida 2 mg ml⁻¹ y Tolvaptan 1 μ M. Tras la centrifugación, se añadió níquel-NTA agarosa al sobrenadante, se agitó durante 2 h y entonces se lavó por lotes con centrifugados de 100 g durante 5 min cada uno con un tampón de lavado de DDM al 0,1%, colato al 0,03%, CHS al 0,01%, HEPES 20 mM pH 7,5 y NaCl 0,5 M. Se vertió la resina en una columna de vidrio y se eluyó el receptor unido en tampón de lavado complementado con imidazol 300 mM. Se usó una resina de afinidad anti-Flag M1 para purificar NT4L-V2R adicionalmente y para intercambiar el ligando con la AVP agonista. El eluato de la resina de Ni-NTA se cargó en una resina anti-Flag M1 y se lavó exhaustivamente en presencia de AVP 10 μ M. Entonces se eluyó el receptor de la resina de afinidad anti-Flag M1 con el péptido Flag 0,2 mg ml⁻¹ y EDTA 2 mM en presencia de AVP 1 μ M y se concentró usando un concentrador de MWCO de 100 kDa.

Tabla 2. Lista de Nanobodies

Número de referencia Nanobody	de de	Notación corta de Nanobody	SEQ ID NO	Secuencia (incluyendo la etiqueta de histidina C-terminal y la etiqueta EPEA)
CA4435		Nb35	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY KMNWVRQAPGKGLEWVSDISQSGASISYTGSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR CPAPFTRDCFDVTSTTYAYRGQGTQVTVSSHHH HHHEPEA
CA4433		Nb33	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY VMNWVRQAPGKGLEWVSDISNGGGTTSYASSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNLKPADTAVYYCA RCPAPFTNDCMDITSTTYAYRGQGTQVTVSSHH HHHEPEA

CA4436	Nb36	3	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTVSGTIFSVTV MGWYRQAPGKQRELVAGFTNTRNTNYVDSVKG RFTISKDSAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCNVR RWGGTNWNDYWGGGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4437	Nb37	4	QVQLQESGGGFVQAGGSLRLSCAASGSIFSNT MAWFRQAPGKERELVAASPTGGSTAYKDSVKG RFTISRDSAKNTVLLQMNVLKPEDTAVYYCHLRQ NNRGSWFHYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4440	Nb40	5	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGTIFDITP MGWYRQTPGKQREVADLTSGRTTNYADSVKG RFTISRDNAAKMLYLQMNSLKSDDTGVYYCNVK RWGGIGWNDYWGGGTQVTVSSHHHHHHEPEA
CA4441	Nb41	6	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCVASGFRFSNF PMMWVRQAPGKGLEWVSLISIGGSTTNYADSVK GRFTISRDNAAKNTLFLQMNSLKPEDTAVYYCAKY LGRLVPPTTEGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA

Tabla 3. Combinaciones de FR y CDR de Nanobodies

Número de referencia de Nanobody	Notación corta de Nanobody	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
CA4435	Nb35	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAAS (SEQ ID NO 7)	GFTFSNYK (SEQ ID NO 13)	MNWVRQAPG KGLEWVSD (SEQ ID NO 19)	ISQSGASI (SEQ ID NO 25)	SYTGSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTAVY YC (SEQ ID NO 31)	ARCPAPFTRDCFD VTSTTYAY (SEQ ID NO 37)	RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 43)
CA4433	Nb33	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAAS (SEQ ID NO 8)	GFTFSNYV (SEQ ID NO 14)	MNWVRQAPG KGLEWVSD (SEQ ID NO 20)	ISNGGGTT (SEQ ID NO 26)	SYASSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTAVY YC (SEQ ID NO 32)	ARCPAPFTNDICM DITSTTYAY (SEQ ID NO 38)	RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 44)
CA4436	Nb36	QVQLQESG GGSVQAGG SLRLSCTVS (SEQ ID NO 9)	GTIFSVTV (SEQ ID NO 15)	MGWYRQAPG KQRELVA (SEQ ID NO 21)	FTNTRNT (SEQ ID NO 27)	NYVDSVKGRFTI SKDSAKNTMYL QMNSLKPEDTA VYYC (SEQ ID NO 33)	NVRRWGGTNWN DY (SEQ ID NO 39)	WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 45)
CA4437	Nb37	QVQLQESG GGFVQAGG SLRLSCAAS (SEQ ID NO 10)	GSIFSNT (SEQ ID NO 16)	MAWFRQAPGK ERELVAA (SEQ ID NO 22)	SPTGGST (SEQ ID NO 28)	AYKDSVKGRFTI SRDSAKNTVLLQ MNSLKPEDTAVY YC (SEQ ID NO 34)	HLRQNNRGSWFH Y (SEQ ID NO 40)	WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 46)
CA4440	Nb40	QVQLQESG GGLVQAGG SLRLSCAVS (SEQ ID NO 11)	GTIFDITP (SEQ ID NO 17)	MGWYRQTPG KQREVVAD (SEQ ID NO 23)	LTSRGTT (SEQ ID NO 29)	NYADSVKGRFTI SRDNAKKMMLYL QMNSLKSDDTG VYYC (SEQ ID NO 35)	NVKRWGGIGWND Y (SEQ ID NO 41)	WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 47)
CA4441	Nb41	QVQLQESG GGLVQSGG SLRLSCVAS (SEQ ID NO 12)	GFRFSNFP (SEQ ID NO 18)	MMWVRQAPG KGLEWVSL (SEQ ID NO 24)	ISIGGST (SEQ ID NO 30)	NYADSVKGRFTI SRDNAKNTLFLQ MNSLKPEDTAVY YC (SEQ ID NO 36)	AKYLGRLVPPTT (SEQ ID NO 42)	EGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 48)

Tabla 4. Secuencias de ácido nucleico de Nanobodies

Número de referencia Nanobody	de de	Notación corta de Nanobody	SEQ ID NO	Secuencia de nucleótidos del Nanobody (incluyendo secuencias de nucleótidos de etiqueta His y etiqueta EPEA, que están subrayadas)
CA4435		Nb35	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGGGGCTTG GTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGTCATG AACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTC GAGTGGGTCTCAGATATTTCTAATGGCGGTGGTA CCACAAGTTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACGGCCTGAAGCCTGCGGACA CGGCCGTCTATTACTGTGCAAGATGTCCGGCCCC ATTCACGAACGATTGTATGGACATAACTAGTACCA CGTATGCCTACAGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCACGAACC <u>TGAAGCCTAG</u>
CA4433		Nb33	50	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCG GTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTA CAGTCTCTGGAACCATCTTCAGTGTCACTGTCATG GGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGC GAGTTGGTTCGCAGGTTTTACTAATACTAGAAACAC AACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACC ATCTCCAAAGACAGCGCCAAGAACACGATGTATC TACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACAGC CGTCTATTACTGTAATGTACGTCCGTGGGGCGGT ACGAATTGGAATGACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCA <u>CGAACCTGAAGCCTAG</u>
CA4436		Nb36	51	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGGGGCTTC GTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAAGAATACCATG GCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGA GAGTTGGTTCGCAGCTAGTCTACGGGTGGTAGCA CAGCGTATAAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTTG CTGCAAATGAACGTCCTGAAACCTGAGGATACTG CCGTCTATTACTGTCATCTACGTCAAATAAACCGT GGTTCTTGTTCCACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCA <u>CGAACCTGAAGCCTAG</u>
CA4437		Nb37	52	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGGGGCTTC GTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAAGAATACCATG GCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGA GAGTTGGTTCGCAGCTAGTCTACGGGTGGTAGCA CAGCGTATAAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTTG CTGCAAATGAACGTCCTGAAACCTGAGGATACTG CCGTCTATTACTGTCATCTACGTCAAATAAACCGT GGTTCTTGTTCCACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCATCA <u>CGAACCTGAAGCCTAG</u>
CA4440		Nb40	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTGCAGGCTGGGGGGTCTGCTGAGACTCTCTTGT GCAGTCTCTGGTACGATCTTCGATATCACTCCCAT GGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCAGCG CGAAGTGGTTCGCAGATCTTACTAGTCGCGGTACC

			ACAAATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAAATGTTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAAATCTGACGACACAG GCGTGTATTACTGTAACGTGAAACGGTGGGGAGG TATTGGCTGGAACGACTACTGGGGCCAGGGGAC CCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCAT CACGAACCTGAAGCCTAG
CA4441	Nb41	54	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTG GTGCAGTCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG TAGCCTCTGGATTGAGATTGAGTAACCTTCTCTATG ATGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGAAAGGGGCTC GAGTGGGTCTCGCTGATTAGCATTGGTGGTAGTA CCACGAATTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTG TTTCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCAAAATATCTTGGTCG GCTGGTCCCACCGACTACTGAGGGGCCAGGGGAC CCAGGTCACCGTCTCCTCACACCACCATCACCAT CACGAACCTGAAGCCTAG

Tabla 5: Ejemplos de isoformas de subunidades de proteínas G

Proteína/subunidad	Número de registro (SEQ ID NO)	Isoforma	Secuencia de aa
G α s humana corta	P63092 (56)	GNAS2_HUMAN	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQ VYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGD SEKATKVQDIKNNLKEAETIVAAMS NLVPPVELANP ENQFRVDYILSVMNVPDFDFPPEFYEHAKALWEDE GVRACYERSNEYQLIDCAQYFLDKIDVIKQADYVPSD QDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVNFMFDVGGQRD ERRKWIQCFNDVTAIIFVVASSSYNMVIREDNQTNR LQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL AGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKY FIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFN DCRDIIQRMHLRQYELL
G α i humana	P63096 (57)	GNAI1_HUMAN	MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKL LLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEAGYSEEECKQYKAVV YSNTIQSIIAIRAMGRLKIDFGDSARADDARQLFVLA GAAEEGFMTAELAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREY QLND SAAYYLNDLDRIAQPNYIPTQQDVLRTVKT GIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKWKWICFEGV TAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICN NKWFTDTSIILFLNKKDLFEKIKKSPLTICYPEYAGSN TYEEAAAYIQCFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKN VQFVFDVAVTDVVIKNNLKDCGLF
G α t humana	P11488 (58)	GNAT1_HUMAN	MGAGASAEKHSRELEKLLKEDAEKDARTVKLLLLG AGESGKSTIVKQMKIIHQDGYSLEECLEFIAIYGNLTQ SILAIVRAMTTLN IQYGD SARQDDARKLMHMADTIE

			EGTMPKEMSDIIQRLWKDSGIQACFERASEYQLNDS AGYYLSDLERLVTGPYVPTQDVLRSRVKTTGIIETQF SFKDLNFRMFVGGQRSEKRWIHCFEVTCIIFIAA LSAYDMVLVEDDEVNRMHESLHLFNSICNHRYFATT SIVLFLNKKDVFFKIKKAHLSICFPDYDGPNTYEDAG NYIKVQFLELNMRRDVKEIYSHMTCATDTQNVKFVF DAVTDIIKENLKDCGLF
Gαs bovina corta	P04896 (59)	GNAS2_BOVIN	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQ VYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGE GGEEDPQAARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIETIV AAMSNLVPPVELANPENQFRVDYILSVMNVPDFDF PPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYF LDKIDVIKQDDYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVD KVNFMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVAS SSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTIS VILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDA TPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYP HFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL
Gαs de rata corta	P63095 (60)	GNAS2_RAT	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQ VYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGE GGEEDPQAARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIETIV AAMSNLVPPVELANPENQFRVDYILSVMNVPNDFDF PPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYF LDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDK VNFMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVAS SYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISV ILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDAT PEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPH FTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL
Gαs de ratón corta	P63094 (61)	GNAS2_MOUSE	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQ VYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGE GGEEDPQAARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIETIV AAMSNLVPPVELANPENQFRVDYILSVMNVPNDFDF PPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYF LDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDK VNFMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVAS SYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISV ILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDAT PEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPH FTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL
Gβ bovina	P62871 (62)	GBB1_BOVIN	MSELDQLRQAEQLKNQIRDARKACADATLSQITN NIDPVGRIQMRTTRTLRGLAKIYAMHWGTDSSRL VSASQDGKLIWDSYTTNKVHAIPRSSWVMTCAYA PSGNYVACGGLDNICSIYNLKTREGNVRVSRELIGHT GYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETGQQT FTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVR EGMCRQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATC RLFDLRADQELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAG YDDFNCNVWDALKADRAGVLGHDRVSLGVTD DGMVAATGSWDSFLKIWN

Gβ humana	P62873 (63)	GBB1_HUMAN	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITN NIDPVGRIQMRTTRTLRGHLAKIYAMHWGDSRLL VSASQDGKLIWDSYTTNKVHAIPLRSSWVMTCAYA PSGNYVACGGLDNICSIYNLKTREGNVRVSRELAGHT GYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETGQQTTT FTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVR EGMCQQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATC RLFDLRADQELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAG YDDFNCNVWDALKADRAGVLAGHDNRVSLGVTD DGMVATGSWDSFLKIWN
Gβ de rata	P54311 (64)	GBB1_RAT	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITN NIDPVGRIQMRTTRTLRGHLAKIYAMHWGDSRLL VSASQDGKLIWDSYTTNKVHAIPLRSSWVMTCAYA PSGNYVACGGLDNICSIYNLKTREGNVRVSRELAGHT GYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETGQQTTT FTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVR EGMCQQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATC RLFDLRADQELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAG YDDFNCNVWDALKADRAGVLAGHDNRVSLGVTD DGMVATGSWDSFLKIWN
Gβ de ratón	P62874 (65)	GBB1_RATÓN	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITN NIDPVGRIQMRTTRTLRGHLAKIYAMHWGDSRLL VSASQDGKLIWDSYTTNKVHAIPLRSSWVMTCAYA PSGNYVACGGLDNICSIYNLKTREGNVRVSRELAGHT GYLSCCRFLDDNQIVTSSGDTTCALWDIETGQQTTT FTGHTGDVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLWDVR EGMCQQTFTGHESDINAICFFPNGNAFATGSDDATC RLFDLRADQELMTYSHDNIICGITSVSFSKSGRLLLAG YDDFNCNVWDALKADRAGVLAGHDNRVSLGVTD DGMVATGSWDSFLKIWN
Gγ bovina	P63212 (66)	GBG2_BOVIN	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAAD LMAYCEAHAKEDPLLTPVPASENPFREKKFFCAIL
Gγ de ratón	P63213 (67)	GBG2_MOUSE	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAAD LMAYCEAHAKEDPLLTPVPASENPFREKKFFCAIL
Gγ humana	P59768 (68)	GBG2_HUMAN	MASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAAD LMAYCEAHAKEDPLLTPVPASENP FREKKFFCAIL

Tabla 6. Posibles interacciones intermoleculares dentro de la superficie de contacto de R:G

	átomo en β_2AR	átomo en $Gs\alpha$	distancia (Å)
TM3	[ARG 131 CG]	[TYR 391 CE2]	3,6
	[ALA 134 O]	[HIS 387 ND1]	3,1
	[ALA 134 CB]	[HIS 387 ND1]	3,8
	[ALA 134 CB]	[HIS 387 CG]	3,8
	[ILE 135 O]	[GLN 384 NE2]	2,9
	[ILE 135 CD1]	[LEU 388 CD1]	3,5
	[ILE 135 CD1]	[LEU 393 CD1]	3,5
	[THR 136 O]	[ARG 380 NH2]	3,0
IL2	[PRO 138 O]	[ILE 383 CD1]	3,4
	[PRO 138 CG]	[GLN 384 CG]	3,3
	[PHE 139 CD2]	[HIS 41 NE2]	3,6
	[PHE 139 CB]	[VAL 217 CG2]	3,7
	[PHE 139 CE1]	[PHE 376 CZ]	3,3
	[PHE 139 CZ]	[CYS 379 C]	3,9
	[PHE 139 CZ]	[ARG 380 N]	3,2
	[TYR 141 CD2]	[HIS 387 NE2]	3,9
	[GLN 142 OE1]	[HIS 387 NE2]	3,5
	[SER 143 OG]	[ALA 39 CB]	3,6
TM5	[VAL 222 CG1]	[LEU 393 CD1]	3,7
	[GLU 225 OE2]	[GLN 384 NE2]	3,0
	[ALA 226 CA]	[LEU 388 CD2]	3,6
	[ALA 226 CB]	[LEU 393 O]	3,8
	[GLN 229 NE2]	[ASP 381 OD1]	3,6
	[GLN 229 NE2]	[GLN 384 OE1]	2,8
	[GLN 229 OE1]	[ARG 385 NE]	3,4
	[GLN 229 CG]	[LEU 388 CD2]	3,9
	[LEU 230 CG]	[LEU 394 CD1]	3,5
	[LYS 232 NZ]	[ASP 381 OD1]	3,1
	[ILE 233 CD1]	[TYR 358 OH]	3,4
	[ILE 233 CG1]	[ARG 385 NH1]	3,5
	[ARG 239 NE]	[THR 350 OG1]	3,5
TM6	[ALA 271 CB]	[LEU 393 O]	3,0
	[THR 274 CG2]	[GLU 392 O]	3,4
	[THR 274 OG1]	[LEU 393 CD2]	3,3
	[LEU 275 CD2]	[LEU 393 CD2]	3,6

Tabla 7. Recogida de datos y datos estadísticos de refinamiento

Recogida de datos*	
Número de cristales	20
Grupo espacial	P 2 ₁
Dimensiones celulares	
a, b, c (Å)	119,3, 64,6, 131,2
α, β, γ (°)	90,0, 91,7, 90,0
Resolución (Å)	41 - 3,2 (3,26 - 3,20)
R _{fusión} (%)	15,6 (55,3)
<I>/<σI>	10,8 (1,8)
Compleitud (%)	91,2 (53,9)
Redundancia	6,5 (5,0)
Refinamiento	
Resolución (Å)	41 - 3,2
N.º de reflexiones	31075 (1557 en el conjunto de prueba)
R _{trabajo} /R _{libre} (%)	22,5 / 27,7
N.º de átomos	10277
N.º de residuos de proteína	1318
Tensor anisotrópico B	B ₁₁ = -7,0 / B ₂₂ = 4,7 / B ₃₃ =2,3 / B ₁₃ =2,1
Secuencias no modeladas ^a	
Receptor adrenérgico β2	29 ^b , 176-178, 240-264, 342-365
Gs α, dominio ras	1-8, 60-88, 203-204, 256-262
Gs γ	1-4, 63-68
Lisozima de T4	161 ^c
Factores B promedio (Å ²)	
Receptor adrenérgico β2	133,5
Gs α, dominio ras	82,8
Gs α, dominio helicoidal	123,0
Gs β	64,2
Gs γ	85,2
Nanobody 35	60,7
Lisozima de T4	113,7
R.m.s., desviación de la idealidad	
Longitud de unión (Å)	0,007
Ángulos de unión (°)	0,72
Datos estadísticos de Ramachandran ^d	
Regiones favorecidas (%)	95,8
Regiones permitidas (%)	4,2
Valores atípicos (%)	0

*Los datos estadísticos de nivel superior están entre paréntesis. ^aSe omitieron estas regiones del modelo debido a densidad electrónica escasamente resuelta. No se incluyen etiquetas de purificación no modeladas en estos intervalos de residuos. ^bSe omitieron los residuos 1-28 de β2AR del constructo y T4L se fusionó al extremo amino-terminal de la hélice 1 transmembrana para facilitar la cristalización. ^cSe omitió el residuo de T4L del constructo. ^dTal como se define por MolProbity.

Bibliografía

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., & Adams, P. D. (2005). A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61, 850-5.

- Baltensperger, K. *et al.* The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271, 1061-1064 (1996).

- Binz *et al.* *Nature Biotech.*, 22: 575-582 (2004)

- Blanc, E., Roversi, P., Vonnrhein, C., Flensburg, C., Lea, S. M., Bricogne, G., *et al.* (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 60, 2210-21.

- Caffrey (2003). Membrane protein crystallization. *J Struct. Biol.* 2003 142:108-32.

- Caffrey, M. & Cherezov, V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat Protoc* 4, 706-731,

(2009).

- Chae, P. S. *et al.* Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 7, 1003-1008 (2010).
- Chelikani *et al* *Protein Sci.* 2006 15:1433-40.
- 5 - Chini, B., & Parenti, M. (2009). G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *Journal of molecular endocrinology*, 42(5), 371-9.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, pág. 156.
- 10 - Conrath K, Pereira AS, Martins CE, Timóteo CG, Tavares P, Spinelli S, Kinne J, Flaudrops C, Cambillau C, Muyldermans S, Moura I, Moura JJ, Tegoni M, Desmyter A. Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase. *Protein Sci.* Marzo de 2009;18(3):619-28.
- Conrath K. E., M. Lauwereys, M. Galleni *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 45 (10), 2807 (2001).
- Costanzi S, Vilar S (2011). In Silico screening for agonists and blockers of the beta(2) adrenergic receptor: Implications of inactive and activated state structures. *Journal of computational chemistry* 33:561-572.
- 15 - 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.
- Delean, A., J. M. Stadel, *et al.* (1980). "A TERNARY COMPLEX MODEL EXPLAINS THE AGONIST-SPECIFIC BINDING-PROPERTIES OF THE ADENYLATE CYCLASE-COUPLED BETA-ADRENERGIC-RECEPTOR." *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 255(15): 7108-7117.
- 20 - Derewenda Z. S. Rational protein crystallization by mutational surface engineering, *Structure (Camb)* 12 (2004), págs. 529-535.
- Domanska, K. *et al.* Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1314-1319, (2011).
- 25 - Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132, (2004).
- Eroglu *et al* *EMBO* 2002 3: 491^96
- Eroglu *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100: 10219-10224.
- Faham *et al* Crystallization of bacteriorhodopsin from bicelle formulations at room temperature. *Protein Sci.* 2005 14:836-40. 2005.
- 30 - Faham *et al*, Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol.* 8 de febrero de 2002;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.
- 35 - 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.
- Gebauer & Skerra (2009) *Current opinion in chemical biology* 13, 245-255.
- George *et al*, *Nat Rev Drug Discov* 1:808-820 (2002).
- 40 - Gouaux, It's not just a phase: crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *Structure.* 1998 6:5-10.
- 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).
- Hendrickson WA. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science.* 4 de octubre de 1991;254(5028):51-8.
- 45 - Hofmann K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand *et al.*, *Trends Biochem Sci* 34 (11), 540 (2009).

- Hunte C. and Michel H., Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002), págs. 503-508.
- Jameson, E. E. *et al.* (2005). Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. *J Biol Chem* 280, 7712-7719.
- 5 - Kenakin, Trends Pharmacol Sci 25:186-192 (2002).
- Kobilka *et al.* (2007) Trends in pharmacological sciences 28, 397-406.
- 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).
- 10 - Kolakowski, L. F. (1994). "GCRDB - A G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR DATABASE." *Receptors & Channels* 2(1): 1-7.
- Kolb, P., D. M. Rosenbaum, *et al.* (2009). "Structure-based discovery of beta(2)-adrenergic receptor ligands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16): 6843-6848.
- Kuszak, A. J., S. Pitchiaya, *et al.* (2009). "Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2." *The Journal of biological chemistry* 284: 26732-26741.
- 15 - 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.
- 20 - Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1666(1-2), 62-87.
- Lee GM, Craik CS (2009). Trapping moving targets with small molecules. *Science*. 10 de abril; 324(5924):213-5.
- 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.
- 25 - Li H., Dunn J.J., Luft B.J. and Lawson C.L., Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), págs. 3584-3589.
- Luca *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100:10706-11
- Lynch Kevin R. (Ed) *Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors* publicado por John Wiley & Sons (Marzo de 1998).
- 30 - Mansoor *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006 103: 3060-3065.
- Marchese *et al* *Genomics* 23: 609-618, 1994.
- McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 32-41 (2007).
- 35 - McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J., *et al.* (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, 40(Pt 4), 658-674.
- McEwen, D. P., Gee, K. R., Kang, H. C. & Neubig, R. R. (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal Biochem* 291, 109-117.
- Misquitta, L. V. *et al.* Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure* 12, 2113-2124, (2004).
- 40 - Moro, O., Lamah, J., Hogger, P. & Sadée, W. Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 268, 22273-22276 (1993).
- 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.
- Ostermeier C., Iwata S., Ludwig B. and Michel H., Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase, *Nat Struct Biol* 2 (1995), págs. 842-846.
- 45

- Otwinowski, Z., & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology*, 276, 307-325.
- Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [véanse comentarios]. *Science* 289, 739-745 (2000).
- 5 - Probst *et al.* 1992, *DNA Cell Biol.* 1992 11: 1 -20.
- Qian ZM, Li H, Sun H and Ho K (2002). Targeted drug delivery via the transferring receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54, 561-587.
- Rasmussen *et al.* (2011) *Nature* 469, 175-180.
- 10 - Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R. and Fischetti R.F. *et al.*, Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* 450 (2007), págs. 383-387.
- Riechmann and Muyldermans J. *Immunol. Methods* 2000; 240: 185-195.
- Rios *et al.*, *Pharmacol Ther* 92:71-87 (2001).
- 15 - Ritter, S. L., & Hall, R. a. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), 819-30. *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrm2803.)
- Rosenbaum D. M., S. G. Rasmussen, y B. K. Kobilka, *Nature* 459 (7245), 356 (2009).
- Rosenbaum, D. M. *et al.* Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236-240 (2011).
- 20 - Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, *et al.* (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." *Science* 318: 1266-1273.
- Rummel *et al.*, *Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins*. *J. Struct. Biol.* 1998 121:82-91.
- Sawant R, Torchilin V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol Biosyst.* Abril de 2010; 6(4):628-40. Epub 21 de diciembre de 2009.
- 25 - Seifert *et al.* (1998). Reconstitution of beta2-adrenoceptor-GTP-binding-protein interaction in Sf9 cells--high coupling efficiency in a beta2-adrenoceptor-G(s alpha) fusion protein. *Eur. J. Biochem.* 255:369-382.
- Shimada *et al* *J. Biol. Chem.* 2002 277:31774-80.
- Skerra, J. *Molecular Recognition*, 13:167-187 (2000).
- Sprang, S. R. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66, 639-678 (1997).
- 30 - Starovasnik *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10080- 10085 (1997).
- Steyaert J, Kobilka BK (2011). Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr Opin Struct Biol.* Agosto; 21(4):567-72.
- Strong, M. *et al.* Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8060-8065, (2006).
- 35 - Sunahara, R. K., Tesmer, J. J., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. Crystal structure of the adenylyl cyclase activator Gsalpha [véase comentarios]. *Science* 278, 1943-1947 (1997).
- Swaminath, G., Steenhuis, J., Kobilka, B. & Lee, T. W. Allosteric modulation of beta2-adrenergic receptor by Zn(2+). *Mol Pharmacol* 61, 65-72. (2002).
- Tatsuya Haga (Ed), *G Protein-Coupled Receptors*, publicado por CRC Press (24 de septiembre de 1999)
- 40 - Van Eps, N. *et al.* Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
- Wall, M. A. *et al.* The structure of the G protein heterotrimer G_i1 b1 g 2. *Cell* 83, 1047-1058 (1995).
- Warne, T. *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491, (2008).
- Watson, S. (Ed) *G-Protein Linked Receptor Factsbook*, publicado por Academic Press (1ª edición; 1994).

- Wess Jurgen (Ed) Structure-Function Analysis of G Protein- Coupled Receptors publicado por Wiley-Liss (1ª edición; 15 de octubre de 1999).

- Whorton, M. R. *et al.* A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 7682-7687 (2007).

- 5 - Whorton, M. R., S. G. F. Rasmussen, *et al.* (2009). "The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex." PNAS 106: 1-6.

Lista de secuencias

<110> VIB VZW

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL

- 10 CONSEJO DE ADMINISTRACIÓN DE LA UNIVERSIDAD LELAND STANFORD JUNIOR

RECTORES DE LA UNIVERSIDAD DE MICHIGAN

<120> DOMINIOS DE UNIÓN DIRIGIDOS CONTRA COMPLEJOS GPCR:PROTEÍNA G Y USOS DERIVADOS DE LOS MISMOS

<130> JS/GPROT/380

- 15 <150> Documento US 61/571.159

<151> 21-06-2011

<150> Documento EP 11181357.2

<151> 15-09-2011

<160> 73

- 20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> *Lama glama*

- 25 <400> 1

ES 2 662 372 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Cys Pro Ala Pro Phe Thr Arg Asp Cys Phe Asp Val Thr Ser
100 105 110

Thr Thr Tyr Ala Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

His His His His His His Glu Pro Glu Ala
130 135

<210> 2

<211> 138

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 2

ES 2 662 372 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Cys Pro Ala Pro Phe Thr Asn Asp Cys Met Asp Ile Thr Ser
100 105 110

Thr Thr Tyr Ala Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

His His His His His His Glu Pro Glu Ala
130 135

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 3

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

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

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

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

ES 2 662 372 T3

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Thr Met 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 Arg Arg Trp Gly Gly Thr Asn Trp Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His Glu Pro Glu
115 120 125

Ala

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gly Ser Trp Phe His Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His Glu Pro Glu
115 120 125

Ala

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 5

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 Val Ser Gly Thr Ile Phe Asp Ile Thr
20 25 30

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

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

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

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

Val Lys Arg Trp Gly Gly Ile Gly Trp Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His Glu Pro Glu
115 120 125

5 Ala

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> *Lama glama*

10 <400> 6

ES 2 662 372 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Leu Gly Arg Leu Val Pro Pro Thr Thr Glu Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His Glu Pro Glu
115 120 125

Ala

<210> 7

<211> 25

5 <212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 8

10 <211> 25

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> *Lama glama*

5 <400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

10 <213> *Lama glama*

<400> 10

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 Val Ser
20 25

<210> 11

<211> 25

15 <212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 11

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 Val Ser
20 25

<210> 12

20 <211> 25

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
20 25

25 <210> 13

<211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 13
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Lys
 5 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 10 <400> 14
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Val
 1 5
 <210> 15
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 15
 Gly Thr Ile Phe Ser Val Thr Val
 1 5
 <210> 16
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 16
 Gly Ser Ile Phe Ser Lys Asn Thr
 1 5
 25 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 17
 Gly Thr Ile Phe Asp Ile Thr Pro
 30 1 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*

<400> 18

Gly Phe Arg Phe Ser Asn Phe Pro
1 5

<210> 19

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 19

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Asp

<210> 20

10 <211> 17

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 20

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Asp

15 <210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 21

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10 15

20 Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> *Lama glama*

25 <400> 22

Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> *Lama glama*

5 <400> 23

Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Val	Val	Ala
1				5					10					15	

Asp

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Lama glama*

<400> 24

Met	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
1				5					10					15	

Leu

<210> 25

15 <211> 8

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 25

Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile
1				5			

20 <210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 26

Ile	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr
1				5			

25 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> *Lama glama*

30 <400> 27

Phe Thr Asn Thr Arg Asn Thr
 1 5
 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Lama glama*
 <400> 28
 Ser Pro Thr Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 29
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 29
 Leu Thr Ser Arg Gly Thr Thr
 1 5
 <210> 30
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 30
 Ile Ser Ile Gly Gly Ser Thr Thr
 1 5
 20 <210> 31
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 31
 Ser Tyr Thr Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 25 35
 <210> 32
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*

ES 2 662 372 T3

<400> 32

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

Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 33

<211> 38

5 <212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 33

Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 34

10 <211> 38

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 34

Ala Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Val Leu Leu Gln Met Asn Val Leu Lys Pro Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

15 <210> 35

<211> 38

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 35

ES 2 662 372 T3

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

Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Asp Asp
20 25 30

Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 36

<211> 38

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 36

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

Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 37

<211> 21

10 <212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 37

Ala Arg Cys Pro Ala Pro Phe Thr Arg Asp Cys Phe Asp Val Thr Ser
1 5 10 15

Thr Thr Tyr Ala Tyr
20

15 <210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> *Lama glama*

<400> 38

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

Thr Thr Tyr Ala Tyr
20

20

<210> 39

<211> 13
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 39
 Asn Val Arg Arg Trp Gly Gly Thr Asn Trp Asn Asp Tyr
 5 1 5 10
 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 10 <400> 40
 His Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gly Ser Trp Phe His Tyr
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> *Lama glama*
 <400> 41
 Asn Val Lys Arg Trp Gly Gly Ile Gly Trp Asn Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 42
 Ala Lys Tyr Leu Gly Arg Leu Val Pro Pro Thr Thr
 1 5 10
 <210> 43
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 43
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 30 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*

<400> 44
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 46
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 46
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 15 <210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 <400> 47
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 20 1 5 10
 <210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Lama glama*
 25 <400> 48
 Glu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 417
 <212> PRT
 30 <213> *Lama glama*
 <400> 49

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
 20 25 30
 Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
 50 55 60
 Gly Thr Gly Cys Gly Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
 65 70 75 80
 Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Thr Ala Thr
 85 90 95
 Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys
 100 105 110
 Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Cys Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys
 130 135 140
 Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala Gly Ala
 145 150 155 160
 Gly Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Thr Ala Ala Gly
 165 170 175
 Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly
 180 185 190
 Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala
 195 200 205
 Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys
 210 215 220

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr
225 230 235 240

Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys
245 250 255

Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
260 265 270

Gly Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
275 280 285

Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Cys Cys
290 295 300

Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gly
305 310 315 320

Thr Thr Thr Thr Gly Ala Cys Gly Thr Gly Ala Cys Thr Ala Gly Thr
325 330 335

Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Ala Thr Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala
340 345 350

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala
355 360 365

Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala
370 375 380

Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys
385 390 395 400

Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Ala
405 410 415

Gly

<210> 50

<211> 417

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 50

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Thr
 20 25 30

ES 2 662 372 T3

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
 50 55 60
 Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
 65 70 75 80
 Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Thr
 85 90 95
 Gly Thr Cys Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys
 100 105 110
 Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Cys Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys
 130 135 140
 Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Cys Thr Ala Ala Thr Gly
 145 150 155 160
 Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Gly
 165 170 175
 Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly
 180 185 190
 Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala
 195 200 205
 Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys
 210 215 220
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys
 245 250 255
 Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Gly Gly Ala Cys Ala Cys
 260 265 270
 Gly Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
 275 280 285

ES 2 662 372 T3

Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Cys Cys
290 295 300

Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Gly Ala Thr Thr Gly
305 310 315 320

Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Ala Ala Cys Thr Ala Gly Thr
325 330 335

Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Ala Thr Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala
340 345 350

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala
355 360 365

Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala
370 375 380

Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys
385 390 395 400

Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Ala
405 410 415

Gly

<210> 51

<211> 390

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 51

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys
20 25 30

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Thr Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys
65 70 75 80

Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Cys Ala Cys Thr

ES 2 662 372 T3

85					90					95					
Gly	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Cys	Cys
			100					105					110		
Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala
			115					120					125		
Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys
			130					135					140		
Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
															160
Cys	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Ala
				165					170						175
Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly
			180						185					190	
Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr
			195					200						205	
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Ala
			210					215					220		
Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala
															240
Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala
				245					250						255
Ala	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys
				260					265						270
Cys	Gly	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr
				275					280						285
Gly	Thr	Ala	Cys	Gly	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly
				290					295					300	
Gly	Thr	Ala	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala
															320
Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly
				325					330						335
Ala	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Thr
				340					345					350	

ES 2 662 372 T3

Cys Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala
355 360 365

Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala
370 375 380

Gly Cys Cys Thr Ala Gly
385 390

<210> 52

<211> 390

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 52

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Thr
20 25 30

Cys Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly
65 70 75 80

Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr
85 90 95

Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala
115 120 125

Gly Gly Ala Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys
130 135 140

Gly Cys Ala Gly Cys Thr Ala Gly Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly
145 150 155 160

Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Thr Ala
165 170 175

ES 2 662 372 T3

Thr Ala Ala Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly
180 185 190

Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr
195 200 205

Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala
210 215 220

Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Thr Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly
225 230 235 240

Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Gly Thr Cys Cys Thr Gly Ala
245 250 255

Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys
260 265 270

Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Thr
275 280 285

Cys Thr Ala Cys Gly Thr Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Cys Cys
290 295 300

Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys Ala
305 310 315 320

Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly
325 330 335

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr
340 345 350

Cys Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala
355 360 365

Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala
370 375 380

Gly Cys Cys Thr Ala Gly
385 390

<210> 53

<211> 390

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 53

Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	

ES 2 662 372 T3

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
20 25 30

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Thr
50 55 60

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys
65 70 75 80

Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr
85 90 95

Cys Cys Cys Ala Thr Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala
115 120 125

Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys
130 135 140

Gly Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Gly Thr Cys
145 150 155 160

Gly Cys Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala
165 170 175

Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly
180 185 190

Gly Gly Cys Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr
195 200 205

Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys Cys Ala Ala
210 215 220

Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr Cys Thr Gly
225 230 235 240

Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala
245 250 255

Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly
260 265 270

ES 2 662 372 T3

Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Ala Ala Cys
275 280 285

Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly
290 295 300

Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala
305 310 315 320

Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly
325 330 335

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr
340 345 350

Cys Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala
355 360 365

Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala
370 375 380

Gly Cys Cys Thr Ala Gly
385 390

<210> 54

<211> 390

<212> PRT

5 <213> *Lama glama*

<400> 54

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
20 25 30

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
65 70 75 80

Cys Ala Gly Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr
85 90 95

Cys Cys Thr Ala Thr Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys

ES 2 662 372 T3

100					105					110					
Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Cys
	130					135					140				
Thr	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly
145					150					155					160
Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Ala
				165					170					175	
Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly
			180					185					190		
Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala
		195					200					205			
Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys
	210					215					220				
Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr
225					230					235					240
Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys
				245					250					255	
Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys
			260					265					270		
Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr
		275					280					285			
Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys
	290					295					300				
Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys
305					310					315					320
Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly
				325					330					335	
Ala	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Thr
				340				345					350		
Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala
		355					360					365			

ES 2 662 372 T3

Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala
370 375 380

Gly Cys Cys Thr Ala Gly
385 390

<210> 55

<211> 1095

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo Beta2AR

<400> 55

ES 2 662 372 T3

Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly
1 5 10 15

Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Thr Thr Gly Cys Thr
20 25 30

Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Thr Ala Gly Ala Ala Gly Cys
35 40 45

Cys Ala Thr Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly
50 55 60

Ala Cys Gly Thr Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Thr Gly
85 90 95

Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly
100 105 110

Thr Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Cys Ala Thr Cys Gly Thr
115 120 125

Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Thr Thr Thr
130 135 140

Gly Gly Cys Ala Ala Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala
145 150 155 160

Thr Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Ala
165 170 175

Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Gly

ES 2 662 372 T3

180					185					190					
Ala	Cys	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr
		195					200					205			
Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys
	210					215					220				
Cys	Thr	Gly	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys
225						230					235				240
Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly
				245					250					255	
Thr	Gly	Cys	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys
			260					265					270		
Cys	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala
		275					280					285			
Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala
	290					295						300			
Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr
305						310					315				320
Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr
				325					330					335	
Gly	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Gly
			340					345					350		
Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr
		355					360					365			
Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly
	370					375					380				
Gly	Ala	Thr	Cys	Gly	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala
385						390					395				400
Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala
				405					410					415	
Gly	Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly
			420					425					430		
Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys
		435					440					445			

ES 2 662 372 T3

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys Ala Thr Thr Cys Thr Gly Ala Thr
 450 455 460

Gly Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Cys Ala
 465 470 475 480

Gly Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr
 485 490 495

Thr Gly Cys Cys Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Ala
 500 505 510

Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Cys
 515 520 525

Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala
 530 535 540

Ala Cys Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala
 545 550 555 560

Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Ala Cys Thr Thr Cys
 565 570 575

Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 580 585 590

Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys
 595 600 605

Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys
 610 615 620

Gly Thr Thr Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys Ala
 625 630 635 640

Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Gly Thr Cys Thr Ala Cys Thr Cys
 645 650 655

Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Gly Ala Gly
 660 665 670

Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys
 675 680 685

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys
 690 695 700

ES 2 662 372 T3

Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Thr
 705 710 715 720
 Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys
 725 730 735
 Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Thr Gly Gly
 740 745 750
 Gly Cys Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala
 755 760 765
 Cys Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala
 770 775 780
 Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala
 785 790 795 800
 Gly Cys Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly
 805 810 815
 Ala Cys Gly Thr Thr Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala
 820 825 830
 Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 835 840 845
 Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys
 850 855 860
 Thr Thr Cys Ala Thr Cys Gly Thr Thr Ala Ala Cys Ala Thr Thr Gly
 865 870 875 880
 Thr Gly Cys Ala Thr Gly Thr Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala
 885 890 895
 Thr Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Gly Thr Ala Ala Gly
 900 905 910
 Gly Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys
 915 920 925
 Thr Ala Ala Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Ala Gly Gly Cys Thr Ala
 930 935 940
 Thr Gly Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys
 945 950 955 960

ES 2 662 372 T3

Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Thr Thr Ala Thr Cys Thr Ala Cys Thr
965 970 975

Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr
980 985 990

Cys Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly
995 1000 1005

Gly Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly
1010 1015 1020

Cys Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr Thr Gly
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala Thr Gly Gly Gly Ala Ala Thr
1040 1045 1050

Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys
1055 1060 1065

Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly
1070 1075 1080

Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ala Ala
1085 1090 1095

<210> 56

<211> 380

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

ES 2 662 372 T3

Met Gly Cys Leu Gly Asn Ser Lys Thr Glu Asp Gln Arg Asn Glu Glu
1 5 10 15

Lys Ala Gln Arg Glu Ala Asn Lys Lys Ile Glu Lys Gln Leu Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Gln Val Tyr Arg Ala Thr His Arg Leu Leu Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Arg Ile Leu His
50 55 60

Val Asn Gly Phe Asn Gly Asp Ser Glu Lys Ala Thr Lys Val Gln Asp
65 70 75 80

Ile Lys Asn Asn Leu Lys Glu Ala Ile Glu Thr Ile Val Ala Ala Met
85 90 95

ES 2 662 372 T3

Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Gln	Phe	100	105	110
Arg	Val	Asp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Met	Asn	Val	Pro	Asp	Phe	Asp	Phe	115	120	125
Pro	Pro	Glu	Phe	Tyr	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Leu	Trp	Glu	Asp	Glu	Gly	130	135	140
Val	Arg	Ala	Cys	Tyr	Glu	Arg	Ser	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ile	Asp	Cys	145	150	155
Ala	Gln	Tyr	Phe	Leu	Asp	Lys	Ile	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Ala	Asp	Tyr	165	170	175
Val	Pro	Ser	Asp	Gln	Asp	Leu	Leu	Arg	Cys	Arg	Val	Leu	Thr	Ser	Gly	180	185	190
Ile	Phe	Glu	Thr	Lys	Phe	Gln	Val	Asp	Lys	Val	Asn	Phe	His	Met	Phe	195	200	205
Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Arg	Asp	Glu	Arg	Arg	Lys	Trp	Ile	Gln	Cys	Phe	210	215	220
Asn	Asp	Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asn	225	230	235
Met	Val	Ile	Arg	Glu	Asp	Asn	Gln	Thr	Asn	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	245	250	255
Asn	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Trp	Asn	Asn	Arg	Trp	Leu	Arg	Thr	Ile	Ser	260	265	270
Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Gln	Asp	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	275	280	285
Ala	Gly	Lys	Ser	Lys	Ile	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Phe	Ala	Arg	Tyr	290	295	300
Thr	Thr	Pro	Glu	Asp	Ala	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	305	310	315
Thr	Arg	Ala	Lys	Tyr	Phe	Ile	Arg	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Ile	Ser	Thr	325	330	335
Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Arg	His	Tyr	Cys	Tyr	Pro	His	Phe	Thr	Cys	Ala	340	345	350

ES 2 662 372 T3

Val Asp Thr Glu Asn Ile Arg Arg Val Phe Asn Asp Cys Arg Asp Ile
 355 360 365

Ile Gln Arg Met His Leu Arg Gln Tyr Glu Leu Leu
 370 375 380

<210> 57

<211> 354

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

ES 2 662 372 T3

Met	Gly	Cys	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Ser	1	5	10	15
Lys	Met	Ile	Asp	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Ala	Arg	20	25	30	
Glu	Val	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	35	40	45	
Ile	Val	Lys	Gln	Met	Lys	Ile	Ile	His	Glu	Ala	Gly	Tyr	Ser	Glu	Glu	50	55	60	
Glu	Cys	Lys	Gln	Tyr	Lys	Ala	Val	Val	Tyr	Ser	Asn	Thr	Ile	Gln	Ser	65	70	75	80
Ile	Ile	Ala	Ile	Ile	Arg	Ala	Met	Gly	Arg	Leu	Lys	Ile	Asp	Phe	Gly	85	90	95	
Asp	Ser	Ala	Arg	Ala	Asp	Asp	Ala	Arg	Gln	Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Gly	100	105	110	
Ala	Ala	Glu	Glu	Gly	Phe	Met	Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Gly	Val	Ile	Lys	115	120	125	
Arg	Leu	Trp	Lys	Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Ala	Cys	Phe	Asn	Arg	Ser	Arg	130	135	140	
Glu	Tyr	Gln	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Asp	145	150	155	160
Arg	Ile	Ala	Gln	Pro	Asn	Tyr	Ile	Pro	Thr	Gln	Gln	Asp	Val	Leu	Arg	165	170	175	
Thr	Arg	Val	Lys	Thr	Thr	Gly	Ile	Val	Glu	Thr	His	Phe	Thr	Phe	Lys	180	185	190	
Asp	Leu	His	Phe	Lys	Met	Phe	Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	Arg				

ES 2 662 372 T3

195					200					205					
Lys	Lys	Trp	Ile	His	Cys	Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Phe	Cys
210						215					220				
Val	Ala	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Met
225					230					235					240
Asn	Arg	Met	His	Glu	Ser	Met	Lys	Leu	Phe	Asp	Ser	Ile	Cys	Asn	Asn
				245					250					255	
Lys	Trp	Phe	Thr	Asp	Thr	Ser	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Lys	Asp
			260					265					270		
Leu	Phe	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Lys	Ser	Pro	Leu	Thr	Ile	Cys	Tyr	Pro
		275					280					285			
Glu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Thr	Tyr	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ile	Gln
290						295					300				
Cys	Gln	Phe	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Arg	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	Ile	Tyr
305					310					315					320
Thr	His	Phe	Thr	Cys	Ala	Thr	Asp	Thr	Lys	Asn	Val	Gln	Phe	Val	Phe
				325					330					335	
Asp	Ala	Val	Thr	Asp	Val	Ile	Ile	Lys	Asn	Asn	Leu	Lys	Asp	Cys	Gly
			340					345					350		

Leu Phe

<210> 58

<211> 350

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

ES 2 662 372 T3

Met Gly Ala Gly Ala Ser Ala Glu Glu Lys His Ser Arg Glu Leu Glu
1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Glu Asp Ala Glu Lys Asp Ala Arg Thr Val Lys Leu
20 25 30

Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln
35 40 45

Met Lys Ile Ile His Gln Asp Gly Tyr Ser Leu Glu Glu Cys Leu Glu
50 55 60

ES 2 662 372 T3

Phe	Ile	Ala	Ile	Ile	Tyr	Gly	Asn	Thr	Leu	Gln	Ser	Ile	Leu	Ala	Ile		
65					70					75					80		
Val	Arg	Ala	Met	Thr	Thr	Leu	Asn	Ile	Gln	Tyr	Gly	Asp	Ser	Ala	Arg		
				85					90					95			
Gln	Asp	Asp	Ala	Arg	Lys	Leu	Met	His	Met	Ala	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu		
			100					105					110				
Gly	Thr	Met	Pro	Lys	Glu	Met	Ser	Asp	Ile	Ile	Gln	Arg	Leu	Trp	Lys		
		115					120					125					
Asp	Ser	Gly	Ile	Gln	Ala	Cys	Phe	Glu	Arg	Ala	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu		
	130					135					140						
Asn	Asp	Ser	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Leu	Val	Thr		
145					150					155					160		
Pro	Gly	Tyr	Val	Pro	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Leu	Arg	Ser	Arg	Val	Lys		
				165					170					175			
Thr	Thr	Gly	Ile	Ile	Glu	Thr	Gln	Phe	Ser	Phe	Lys	Asp	Leu	Asn	Phe		
			180					185					190				
Arg	Met	Phe	Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	Arg	Lys	Lys	Trp	Ile		
		195					200					205					
His	Cys	Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Cys	Ile	Ile	Phe	Ile	Ala	Ala	Leu	Ser		
	210					215					220						
Ala	Tyr	Asp	Met	Val	Leu	Val	Glu	Asp	Asp	Glu	Val	Asn	Arg	Met	His		
225					230					235					240		
Glu	Ser	Leu	His	Leu	Phe	Asn	Ser	Ile	Cys	Asn	His	Arg	Tyr	Phe	Ala		
				245					250					255			
Thr	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Lys	Asp	Val	Phe	Phe	Glu		
			260					265					270				
Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	His	Leu	Ser	Ile	Cys	Phe	Pro	Asp	Tyr	Asp	Gly		
		275					280					285					
Pro	Asn	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Lys	Val	Gln	Phe	Leu		
	290					295					300						
Glu	Leu	Asn	Met	Arg	Arg	Asp	Val	Lys	Glu	Ile	Tyr	Ser	His	Met	Thr		
305					310					315					320		

ES 2 662 372 T3

Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Val Lys Phe Val Phe Asp Ala Val Thr
 325 330 335

Asp Ile Ile Ile Lys Glu Asn Leu Lys Asp Cys Gly Leu Phe
 340 345 350

<210> 59

<211> 394

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 59

ES 2 662 372 T3

Met	Gly	Cys	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	Thr	Glu	Asp	Gln	Arg	Asn	Glu	Glu	1	5	10	15
Lys	Ala	Gln	Arg	Glu	Ala	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Gln	Leu	Gln	Lys	20	25	30	
Asp	Lys	Gln	Val	Tyr	Arg	Ala	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	35	40	45	
Gly	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Ile	Val	Lys	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	His	50	55	60	
Val	Asn	Gly	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Ala	65	70	75	80
Arg	Ser	Asn	Ser	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Thr	Lys	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	85	90	95	
Asn	Asn	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	Glu	Thr	Ile	Val	Ala	Ala	Met	Ser	Asn	100	105	110	
Leu	Val	Pro	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Val	115	120	125	
Asp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Met	Asn	Val	Pro	Asp	Phe	Asp	Phe	Pro	Pro	130	135	140	
Glu	Phe	Tyr	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Leu	Trp	Glu	Asp	Glu	Gly	Val	Arg	145	150	155	160
Ala	Cys	Tyr	Glu	Arg	Ser	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ile	Asp	Cys	Ala	Gln	165	170	175	
Tyr	Phe	Leu	Asp	Lys	Ile	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Asp	Asp	Tyr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Asp	Gln	Asp	Leu	Leu	Arg	Cys	Arg	Val	Leu	Thr	Ser	Gly	Ile	Phe	195	200	205	

ES 2 662 372 T3

Glu Thr Lys Phe Gln Val Asp Lys Val Asn Phe His Met Phe Asp Val
210 215 220

Gly Gly Gln Arg Asp Glu Arg Arg Lys Trp Ile Gln Cys Phe Asn Asp
225 230 235 240

Val Thr Ala Ile Ile Phe Val Val Ala Ser Ser Ser Tyr Asn Met Val
245 250 255

Ile Arg Glu Asp Asn Gln Thr Asn Arg Leu Gln Glu Ala Leu Asn Leu
260 265 270

Phe Lys Ser Ile Trp Asn Asn Arg Trp Leu Arg Thr Ile Ser Val Ile
275 280 285

Leu Phe Leu Asn Lys Gln Asp Leu Leu Ala Glu Lys Val Leu Ala Gly
290 295 300

Lys Ser Lys Ile Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Phe Ala Arg Tyr Thr Thr
305 310 315 320

Pro Glu Asp Ala Thr Pro Glu Pro Gly Glu Asp Pro Arg Val Thr Arg
325 330 335

Ala Lys Tyr Phe Ile Arg Asp Glu Phe Leu Arg Ile Ser Thr Ala Ser
340 345 350

Gly Asp Gly Arg His Tyr Cys Tyr Pro His Phe Thr Cys Ala Val Asp
355 360 365

Thr Glu Asn Ile Arg Arg Val Phe Asn Asp Cys Arg Asp Ile Ile Gln
370 375 380

Arg Met His Leu Arg Gln Tyr Glu Leu Leu
385 390

<210> 60

<211> 394

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 60

Met Gly Cys Leu Gly Asn Ser Lys Thr Glu Asp Gln Arg Asn Glu Glu
1 5 10 15

Lys Ala Gln Arg Glu Ala Asn Lys Lys Ile Glu Lys Gln Leu Gln Lys
20 25 30

ES 2 662 372 T3

Asp Lys Gln Val Tyr Arg Ala Thr His Arg Leu Leu Leu Leu Gly Ala
 35 40 45
 Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Arg Ile Leu His
 50 55 60
 Val Asn Gly Phe Asn Gly Glu Gly Gly Glu Glu Asp Pro Gln Ala Ala
 65 70 75 80
 Arg Ser Asn Ser Asp Gly Glu Lys Ala Thr Lys Val Gln Asp Ile Lys
 85 90 95
 Asn Asn Leu Lys Glu Ala Ile Glu Thr Ile Val Ala Ala Met Ser Asn
 100 105 110
 Leu Val Pro Pro Val Glu Leu Ala Asn Pro Glu Asn Gln Phe Arg Val
 115 120 125
 Asp Tyr Ile Leu Ser Val Met Asn Val Pro Asn Phe Asp Phe Pro Pro
 130 135 140
 Glu Phe Tyr Glu His Ala Lys Ala Leu Trp Glu Asp Glu Gly Val Arg
 145 150 155 160
 Ala Cys Tyr Glu Arg Ser Asn Glu Tyr Gln Leu Ile Asp Cys Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Phe Leu Asp Lys Ile Asp Val Ile Lys Gln Ala Asp Tyr Val Pro
 180 185 190
 Ser Asp Gln Asp Leu Leu Arg Cys Arg Val Leu Thr Ser Gly Ile Phe
 195 200 205
 Glu Thr Lys Phe Gln Val Asp Lys Val Asn Phe His Met Phe Asp Val
 210 215 220
 Gly Gly Gln Arg Asp Glu Arg Arg Lys Trp Ile Gln Cys Phe Asn Asp
 225 230 235 240
 Val Thr Ala Ile Ile Phe Val Val Ala Ser Ser Ser Tyr Asn Met Val
 245 250 255
 Ile Arg Glu Asp Asn Gln Thr Asn Arg Leu Gln Glu Ala Leu Asn Leu
 260 265 270
 Phe Lys Ser Ile Trp Asn Asn Arg Trp Leu Arg Thr Ile Ser Val Ile
 275 280 285
 Leu Phe Leu Asn Lys Gln Asp Leu Leu Ala Glu Lys Val Leu Ala Gly

ES 2 662 372 T3

290

295

300

Lys Ser Lys Ile Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Phe Ala Arg Tyr Thr Thr
305 310 315 320

Pro Glu Asp Ala Thr Pro Glu Pro Gly Glu Asp Pro Arg Val Thr Arg
325 330 335

Ala Lys Tyr Phe Ile Arg Asp Glu Phe Leu Arg Ile Ser Thr Ala Ser
340 345 350

Gly Asp Gly Arg His Tyr Cys Tyr Pro His Phe Thr Cys Ala Val Asp
355 360 365

Thr Glu Asn Ile Arg Arg Val Phe Asn Asp Cys Arg Asp Ile Ile Gln
370 375 380

Arg Met His Leu Arg Gln Tyr Glu Leu Leu
385 390

<210> 61

<211> 394

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 61

ES 2 662 372 T3

Met	Gly	Cys	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	Thr	Glu	Asp	Gln	Arg	Asn	Glu	Glu	1	5	10	15
Lys	Ala	Gln	Arg	Glu	Ala	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Gln	Leu	Gln	Lys	20	25	30	
Asp	Lys	Gln	Val	Tyr	Arg	Ala	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	35	40	45	
Gly	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Ile	Val	Lys	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	His	50	55	60	
Val	Asn	Gly	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Ala	65	70	75	80
Arg	Ser	Asn	Ser	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Thr	Lys	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	85	90	95	
Asn	Asn	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	Glu	Thr	Ile	Val	Ala	Ala	Met	Ser	Asn	100	105	110	
Leu	Val	Pro	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Val	115	120	125	

ES 2 662 372 T3

Asp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Met	Asn	Val	Pro	Asn	Phe	Asp	Phe	Pro	Pro				
					130					135					140				
Glu	Phe	Tyr	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Leu	Trp	Glu	Asp	Glu	Gly	Val	Arg				
					145					155					160				
Ala	Cys	Tyr	Glu	Arg	Ser	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ile	Asp	Cys	Ala	Gln				
					165					170					175				
Tyr	Phe	Leu	Asp	Lys	Ile	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Ala	Asp	Tyr	Val	Pro				
					180					185					190				
Ser	Asp	Gln	Asp	Leu	Leu	Arg	Cys	Arg	Val	Leu	Thr	Ser	Gly	Ile	Phe				
					195					200					205				
Glu	Thr	Lys	Phe	Gln	Val	Asp	Lys	Val	Asn	Phe	His	Met	Phe	Asp	Val				
					210					215					220				
Gly	Gly	Gln	Arg	Asp	Glu	Arg	Arg	Lys	Trp	Ile	Gln	Cys	Phe	Asn	Asp				
					225					230					235				
Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asn	Met	Val				
					240					245					250				
Ile	Arg	Glu	Asp	Asn	Gln	Thr	Asn	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Asn	Leu				
					255					260					265				
Phe	Lys	Ser	Ile	Trp	Asn	Asn	Arg	Trp	Leu	Arg	Thr	Ile	Ser	Val	Ile				
					270					275					280				
Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Gln	Asp	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	Ala	Gly				
					285					290					295				
Lys	Ser	Lys	Ile	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Phe	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr				
					300					305					310				
Pro	Glu	Asp	Ala	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Thr	Arg				
					315					320					325				
Ala	Lys	Tyr	Phe	Ile	Arg	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Ile	Ser	Thr	Ala	Ser				
					330					335					340				
Gly	Asp	Gly	Arg	His	Tyr	Cys	Tyr	Pro	His	Phe	Thr	Cys	Ala	Val	Asp				
					345					350					355				
Thr	Glu	Asn	Ile	Arg	Arg	Val	Phe	Asn	Asp	Cys	Arg	Asp	Ile	Ile	Gln				
					360					365					370				
					375					380									

Arg Met His Leu Arg Gln Tyr Glu Leu Leu
 385 390

<210> 62

<211> 340

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 62

ES 2 662 372 T3

Met	Ser	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Asn	1	5	10	15
Gln	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Ala	Thr	Leu	Ser	Gln	20	25	30	
Ile	Thr	Asn	Asn	Ile	Asp	Pro	Val	Gly	Arg	Ile	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	35	40	45	
Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Gly	50	55	60	
Thr	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	65	70	75	80
Ile	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	85	90	95	
Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Tyr	Val	100	105	110	
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Thr	115	120	125	
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ala	Gly	His	Thr	Gly	130	135	140	
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Gln	Ile	Val	Thr	Ser	145	150	155	160
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	165	170	175	
Thr	Thr	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Val	Met	Ser	Leu	Ser	Leu	180	185	190	
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala	195	200	205	
Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Met	Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	210	215	220	

ES 2 662 372 T3

His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Asn Ala
225 230 235 240

Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg
245 250 255

Ala Asp Gln Glu Leu Met Thr Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly
260 265 270

Ile Thr Ser Val Ser Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly
275 280 285

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ala Leu Lys Ala Asp Arg
290 295 300

Ala Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val
305 310 315 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu
325 330 335

Lys Ile Trp Asn
340

<210> 63

<211> 340

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Met Ser Glu Leu Asp Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Asn
1 5 10 15

Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Ala Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Ile Thr Asn Asn Ile Asp Pro Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg
35 40 45

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly
50 55 60

Thr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile
65 70 75 80

Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg
85 90 95

ES 2 662 372 T3

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val
 100 105 110
 Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr
 115 120 125
 Arg Glu Gly Asn Val Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly
 130 135 140
 Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Gln Ile Val Thr Ser
 145 150 155 160
 Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln
 165 170 175
 Thr Thr Thr Phe Thr Gly His Thr Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu
 180 185 190
 Ala Pro Asp Thr Arg Leu Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala
 195 200 205
 Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Met Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly
 210 215 220
 His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Asn Ala
 225 230 235 240
 Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg
 245 250 255
 Ala Asp Gln Glu Leu Met Thr Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly
 260 265 270
 Ile Thr Ser Val Ser Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly
 275 280 285
 Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ala Leu Lys Ala Asp Arg
 290 295 300
 Ala Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val
 305 310 315 320
 Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu
 325 330 335
 Lys Ile Trp Asn
 340

<210> 64

<211> 340

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 64

ES 2 662 372 T3

Met	Ser	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Asn	
1				5					10					15		
Gln	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Ala	Thr	Leu	Ser	Gln	
			20					25					30			
Ile	Thr	Asn	Asn	Ile	Asp	Pro	Val	Gly	Arg	Ile	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	
		35					40					45				
Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Gly	
	50					55					60					
Thr	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	
65					70					75					80	
Ile	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	
				85					90					95		
Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Tyr	Val	
			100					105					110			
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Thr	
		115					120					125				
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ala	Gly	His	Thr	Gly	
	130					135					140					
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Gln	Ile	Val	Thr	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	
				165					170					175		
Thr	Thr	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Val	Met	Ser	Leu	Ser	Leu	
			180					185					190			
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala	
		195					200					205				
Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Met	Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	
	210					215					220					
His	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	Asn	Gly	Asn	Ala	
225					230				235						240	

ES 2 662 372 T3

Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg
245 250 255

Ala Asp Gln Glu Leu Met Thr Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly
260 265 270

Ile Thr Ser Val Ser Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly
275 280 285

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ala Leu Lys Ala Asp Arg
290 295 300

Ala Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val
305 310 315 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu
325 330 335

Lys Ile Trp Asn
340

<210> 65

<211> 340

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 65

ES 2 662 372 T3

Met Ser Glu Leu Asp Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Asn
1 5 10 15

Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Ala Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Ile Thr Asn Asn Ile Asp Pro Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg
35 40 45

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly
50 55 60

Thr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile
65 70 75 80

Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg
85 90 95

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val
100 105 110

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr

ES 2 662 372 T3

115					120					125						
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ala	Gly	His	Thr	Gly	
130					135					140						
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Gln	Ile	Val	Thr	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	
165					170					175						
Thr	Thr	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Val	Met	Ser	Leu	Ser	Leu	
180					185					190						
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala	
195					200					205						
Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Met	Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	
210					215					220						
His	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	Asn	Gly	Asn	Ala	
225					230					235					240	
Phe	Ala	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Thr	Cys	Arg	Leu	Phe	Asp	Leu	Arg	
245					250					255						
Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Met	Thr	Tyr	Ser	His	Asp	Asn	Ile	Ile	Cys	Gly	
260					265					270						
Ile	Thr	Ser	Val	Ser	Phe	Ser	Lys	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	
275					280					285						
Tyr	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Asn	Val	Trp	Asp	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp	Arg	
290					295					300						
Ala	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	His	Asp	Asn	Arg	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Val	
305					310					315					320	
Thr	Asp	Asp	Gly	Met	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Ser	Trp	Asp	Ser	Phe	Leu	
325					330					335						
Lys	Ile	Trp	Asn													
340																

<210> 66

<211> 71

<212> PRT

ES 2 662 372 T3

<213> *Bos taurus*

<400> 66

Met Ala Ser Asn Asn Thr Ala Ser Ile Ala Gln Ala Arg Lys Leu Val
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Met Glu Ala Asn Ile Asp Arg Ile Lys Val Ser Lys
20 25 30

Ala Ala Ala Asp Leu Met Ala Tyr Cys Glu Ala His Ala Lys Glu Asp
35 40 45

Pro Leu Leu Thr Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro Phe Arg Glu Lys
50 55 60

Lys Phe Phe Cys Ala Ile Leu
65 70

<210> 67

5 <211> 71

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 67

Met Ala Ser Asn Asn Thr Ala Ser Ile Ala Gln Ala Arg Lys Leu Val
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Met Glu Ala Asn Ile Asp Arg Ile Lys Val Ser Lys
20 25 30

Ala Ala Ala Asp Leu Met Ala Tyr Cys Glu Ala His Ala Lys Glu Asp
35 40 45

Pro Leu Leu Thr Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro Phe Arg Glu Lys
50 55 60

Lys Phe Phe Cys Ala Ile Leu
65 70

10 <210> 68

<211> 71

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

ES 2 662 372 T3

Met Ala Ser Asn Asn Thr Ala Ser Ile Ala Gln Ala Arg Lys Leu Val
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Met Glu Ala Asn Ile Asp Arg Ile Lys Val Ser Lys
20 25 30

Ala Ala Ala Asp Leu Met Ala Tyr Cys Glu Ala His Ala Lys Glu Asp
35 40 45

Pro Leu Leu Thr Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro Phe Arg Glu Lys
50 55 60

Lys Phe Phe Cys Ala Ile Leu
65 70

<210> 69

<211> 514

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo de fusión T4L-Beta2AR

<400> 69

ES 2 662 372 T3

Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Ala	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Asn	
1				5					10					15		
Ile	Phe	Glu	Met	Leu	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Leu	Arg	Leu	Lys	Ile	Tyr	
			20					25					30			
Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Gly	Ile	Gly	His	Leu	Leu	Thr	
		35					40					45				
Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Glu	Leu	Asp	Lys	Ala	Ile	
	50					55					60					
Gly	Arg	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	
65					70				75						80	
Phe	Asn	Gln	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	Arg	Asn	Ala	
				85					90					95		
Lys	Leu	Lys	Pro	Val	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	
			100					105					110			
Leu	Ile	Asn	Met	Val	Phe	Gln	Met	Gly	Glu	Thr	Gly	Val	Ala	Gly	Phe	
		115					120					125				
Thr	Asn	Ser	Leu	Arg	Met	Leu	Gln	Gln	Lys	Arg	Trp	Asp	Glu	Ala	Ala	
	130					135					140					
Val	Asn	Leu	Ala	Lys	Ser	Arg	Trp	Tyr	Asn	Gln	Thr	Pro	Asn	Arg	Ala	
145					150					155					160	
Lys	Arg	Val	Ile	Thr	Thr	Phe	Arg	Thr	Gly	Thr	Trp	Asp	Ala	Tyr	Ala	
			165						170					175		
Ala	Asp	Glu	Val	Trp	Val	Val	Gly	Met	Gly	Ile	Val	Met	Ser	Leu	Ile	

ES 2 662 372 T3

180	185	190
Val Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala		
195	200	205
Lys Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu		
210	215	220
Ala Cys Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala		
225	230	235
Ala His Ile Leu Thr Lys Thr Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu		
245	250	255
Phe Trp Thr Ser Ile Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr		
260	265	270
Leu Cys Val Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe		
275	280	285
Lys Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu		
290	295	300
Met Val Trp Ile Val Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met		
305	310	315
His Trp Tyr Arg Ala Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Glu		
325	330	335
Glu Thr Cys Cys Asp Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser		
340	345	350
Ser Ile Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr		
355	360	365
Ser Arg Val Phe Gln Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys		
370	375	380
Ser Glu Gly Arg Phe His Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp		
385	390	395
Gly Arg Thr Gly His Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys		
405	410	415
Glu His Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr		
420	425	430
Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln		
435	440	445

ES 2 662 372 T3

Asp Asn Leu Ile Arg Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Ile Gly
450 455 460

Tyr Val Asn Ser Gly Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp
465 470 475 480

Phe Arg Ile Ala Phe Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu
485 490 495

Lys Ala Tyr Gly Asn Gly Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln
500 505 510

Ser Gly

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo M1 Flag

<400> 70

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala
1 5

10 <210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento de TEV proteasa

<400> 71

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 72

<211> 413

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

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

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

ES 2 662 372 T3

Val	Val	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		
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

ES 2 662 372 T3

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> 73

<211> 539

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo T4LV2R N-terminal

<400> 73

ES 2 662 372 T3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ala Gly Leu Met Ala Ser Thr Thr Ser
1 5 10 15

Ala Val Pro Gly His Pro Ser Leu Pro Ser Leu Pro Ser Asn Ser Ser
20 25 30

Gln Glu Arg Pro Leu Asp Thr Asn Ile Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp
35 40 45

Glu Gly Leu Arg Leu Lys Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr
50 55 60

Ile Gly Ile Gly His Leu Leu Thr Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala
65 70 75 80

Lys Ser Glu Leu Asp Lys Ala Ile Gly Arg Asn Thr Asn Gly Val Ile
85 90 95

ES 2 662 372 T3

Thr Lys Asp Glu Ala Glu Lys Leu Phe Asn Gln Asp Val Asp Ala Ala
 100 105 110
 Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Ala Lys Leu Lys Pro Val Tyr Asp Ser
 115 120 125
 Leu Asp Ala Val Arg Arg Ala Ala Leu Ile Asn Met Val Phe Gln Met
 130 135 140
 Gly Glu Thr Gly Val Ala Gly Phe Thr Asn Ser Leu Arg Met Leu Gln
 145 150 155 160
 Gln Lys Arg Trp Asp Glu Ala Ala Val Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp
 165 170 175
 Tyr Asn Gln Thr Pro Asn Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg
 180 185 190
 Thr Gly Thr Trp Asp Ala Tyr Arg Asp Pro Leu Leu Ala Arg Ala Glu
 195 200 205
 Leu Ala Leu Leu Ser Ile Val Phe Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Gly
 210 215 220
 Leu Val Leu Ala Ala Leu Ala Arg Arg Gly Arg Arg Gly His Trp Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile His Val Phe Ile Gly His Leu Cys Leu Ala Asp Leu Ala Val
 245 250 255
 Ala Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln Leu Ala Trp Lys Ala Thr Asp Arg
 260 265 270
 Phe Arg Gly Pro Asp Ala Leu Cys Arg Ala Val Lys Tyr Leu Gln Met
 275 280 285
 Val Gly Met Tyr Ala Ser Ser Tyr Met Ile Leu Ala Met Thr Leu Asp
 290 295 300
 Arg His Arg Ala Ile Cys Arg Pro Met Leu Ala Tyr Arg His Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Ala His Trp Asn Arg Pro Val Leu Val Ala Trp Ala Phe Ser Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Leu Pro Gln Leu Phe Ile Phe Ala Gln Arg Asn Val Glu
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Val Thr Asp Cys Trp Ala Cys Phe Ala Glu Pro Trp

ES 2 662 372 T3

355					360					365					
Gly	Arg	Arg	Thr	Tyr	Val	Thr	Trp	Ile	Ala	Leu	Met	Val	Phe	Val	Ala
370						375					380				
Pro	Thr	Leu	Gly	Ile	Ala	Ala	Cys	Gln	Val	Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Ile
385					390					395					400
His	Ala	Ser	Leu	Val	Pro	Gly	Pro	Ser	Glu	Arg	Pro	Gly	Gly	Arg	Arg
				405					410					415	
Arg	Gly	Arg	Arg	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	His	Val	Ser	Ala
				420				425						430	
Ala	Val	Ala	Lys	Thr	Val	Arg	Met	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Val	Val	Tyr
		435					440					445			
Val	Leu	Cys	Trp	Ala	Pro	Phe	Phe	Leu	Val	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Trp
	450					455					460				
Asp	Pro	Glu	Ala	Pro	Leu	Glu	Gly	Ala	Pro	Phe	Val	Leu	Leu	Met	Leu
465					470					475					480
Leu	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser	Cys	Thr	Asn	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Ser	Phe
				485					490					495	
Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Arg
			500					505					510		
Gly	Arg	Thr	Pro	Pro	Ser	Leu	Gly	Pro	Gln	Asp	Glu	Ser	Cys	Thr	Thr
		515					520					525			
Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser					
530						535									

REIVINDICACIONES

1. Nanobody (V_H H) que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 4 regiones de marco (de FR1 a FR4) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3) según la fórmula siguiente (1):
- 5 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (1),
 en el que dicho Nanobody tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que dicho Nanobody se dirige contra y/o se une específicamente a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, y en el que dicho Nanobody se une específicamente a la proteína G y no al GPCR en el complejo.
- 10 2. Nanobody según la reivindicación 1, que se une con mayor afinidad al complejo en comparación con la unión a la proteína G heterotrimérica sola.
3. Nanobody según la reivindicación 1, en el que el complejo comprende además un ligando de receptor.
4. Nanobody según la reivindicación 3, en el que dicho ligando de receptor es un agonista.
- 15 5. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína G está en una forma libre de nucleótido.
6. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se une específicamente a un epítipo conformacional en la superficie de contacto entre la subunidad alfa y la beta de dicha proteína G.
7. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que
- 20 a) impide o inhibe la disociación del complejo en presencia de nucleótidos, o
 b) impide o inhibe la unión de nucleótidos a la proteína G, o
 c) que puede desplazar nucleótidos de la proteína G.
8. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dichos nucleótidos son nucleótidos de guanina, tales como GDP o GTP, o análogos de los mismos, tales como GTP γ S.
- 25 9. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el GPCR está en una conformación activa.
10. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteína G se selecciona del grupo que consiste en Gs, Gi, Go, Gt, Ggust, Gz, Golf, Gq, G12, G13.
- 30 11. Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho Nanobody está comprendido en un polipéptido.
12. Complejo que comprende un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. Vector recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13.
- 35 15. Célula que comprende el vector según la reivindicación 14 o la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13.
16. Uso de un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para estabilizar *in vitro* un complejo que comprende un GPCR y una proteína G y opcionalmente un ligando de receptor en una conformación activa.
- 40 17. Uso según la reivindicación 16, para impedir la disociación del complejo en presencia de nucleótidos, en particular nucleótidos de guanina o análogos de los mismos, tales como GTP γ S.
18. Uso de un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para cristalizar y/o para resolver la estructura de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G y opcionalmente un ligando de receptor.
- 45 19. Uso de un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una célula según la reivindicación 15, o una preparación de membrana de una célula según la reivindicación 15, para examinar compuestos

que modulan la actividad de señalización del GPCR.

20. Método *in vitro* de captura y/o purificación de un complejo que comprende un GPCR y una proteína G, comprendiendo el método las etapas de:

a. proporcionar un Nanobody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y

5 b. permitir que el Nanobody se una a un complejo que comprende un GPCR y una proteína G y opcionalmente un ligando de receptor, y

c. opcionalmente, aislar el complejo formado en la etapa b).

Figura 1

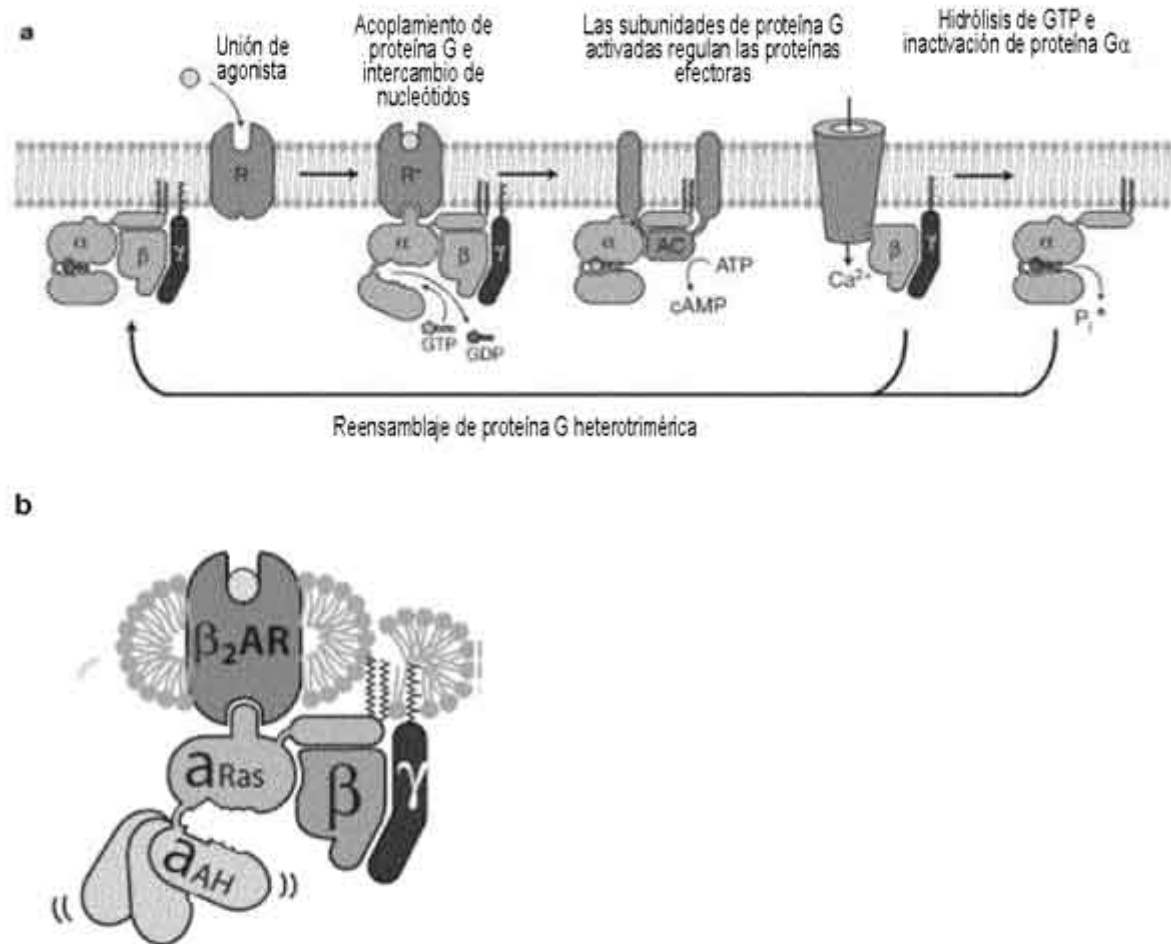


Figura 2

1) Unión de agonista de alta afinidad

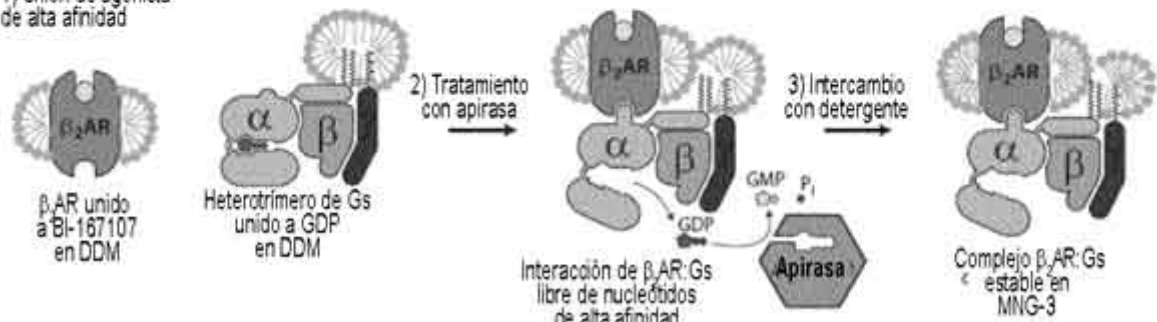
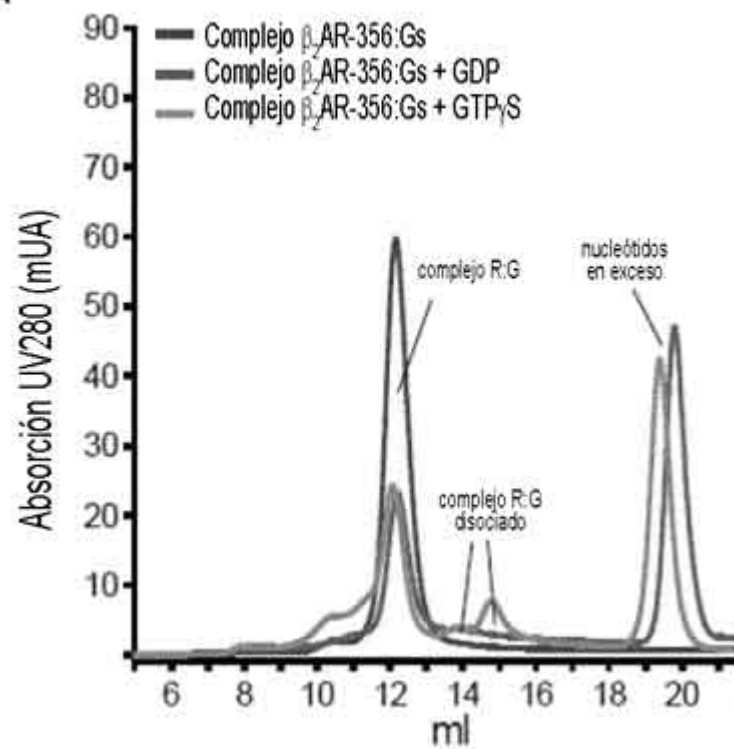
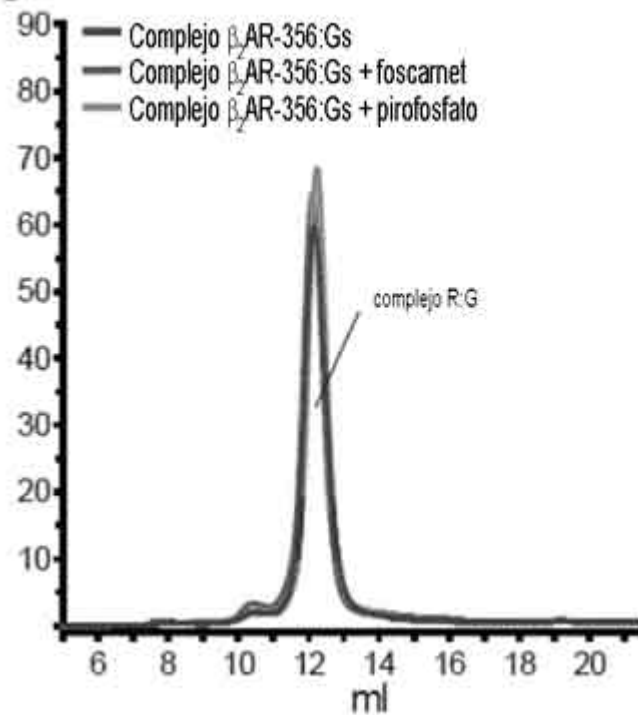


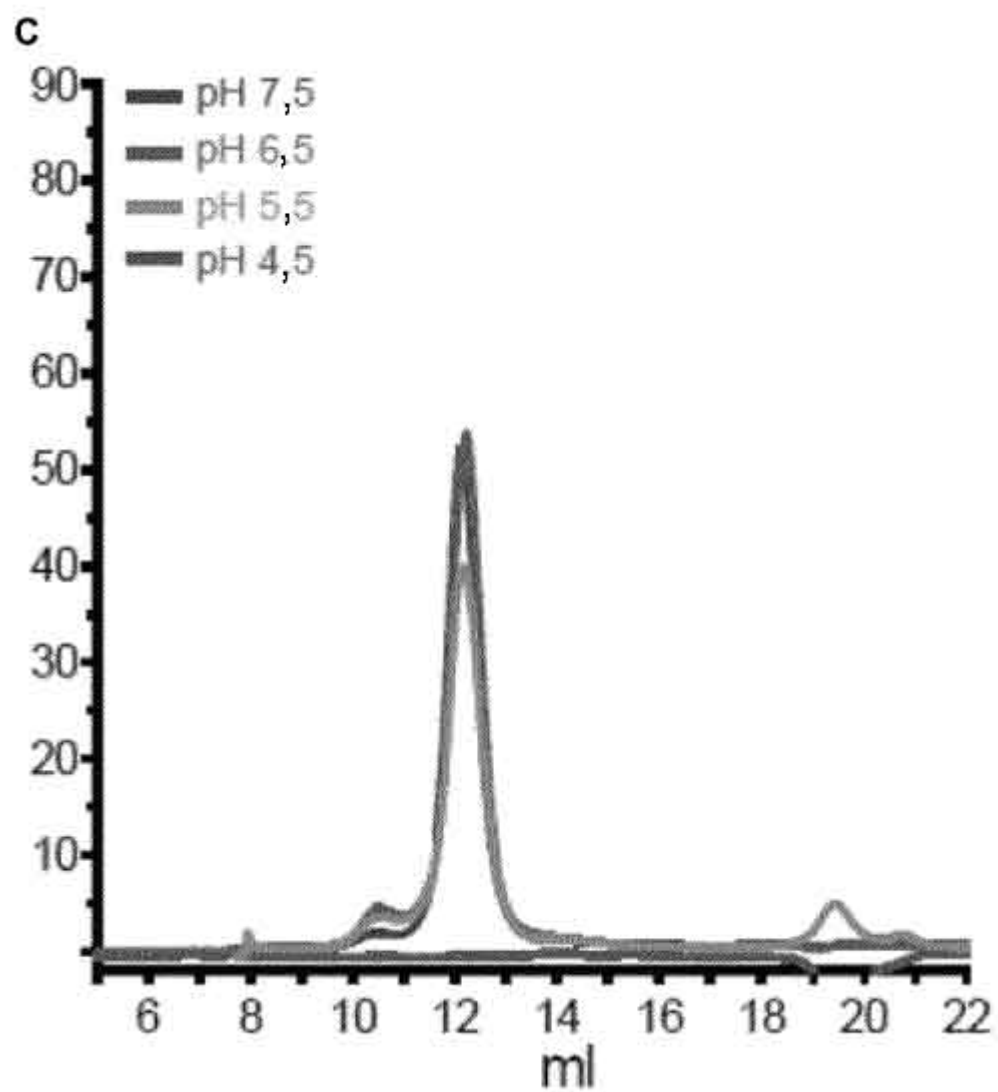
Figura 3

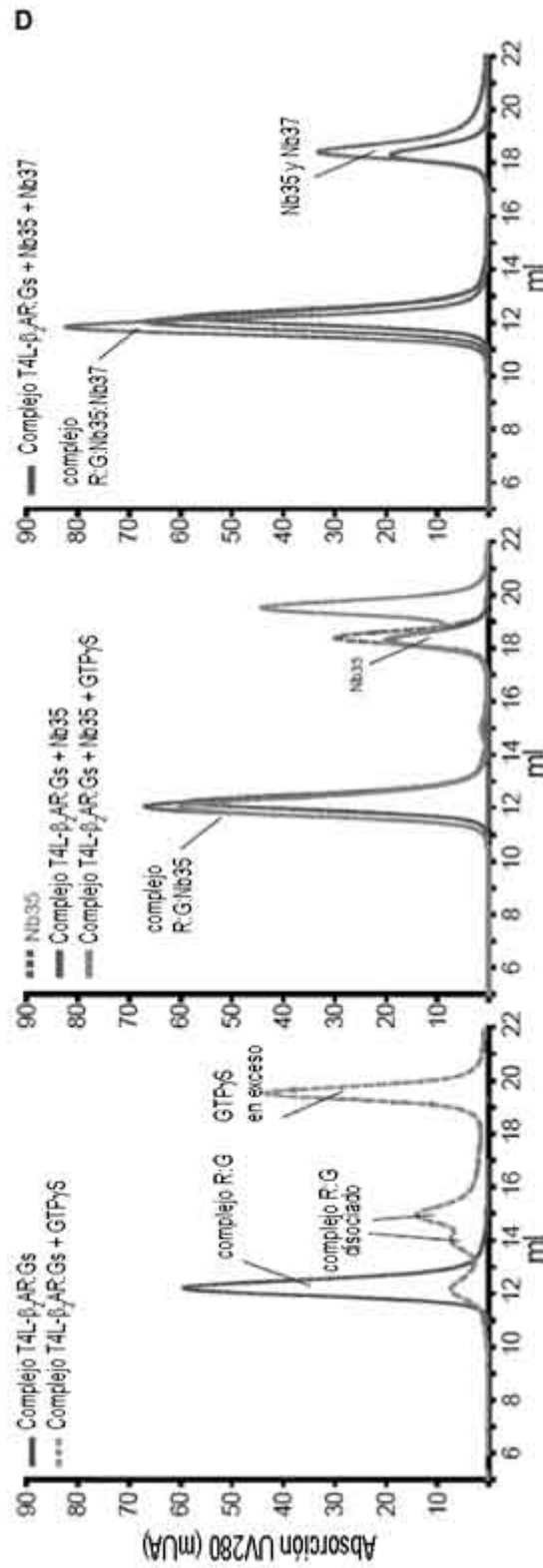
A



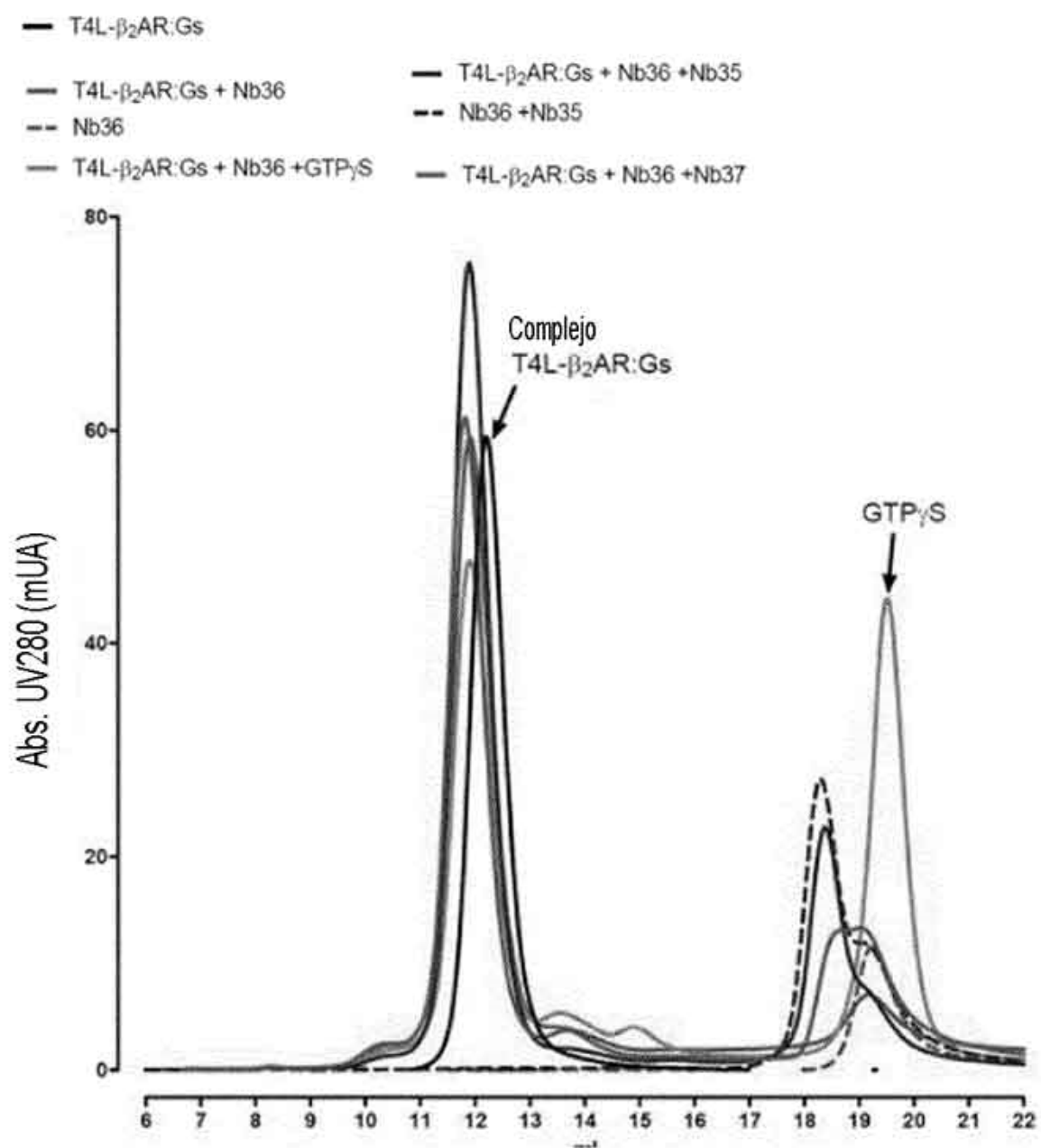
B







E



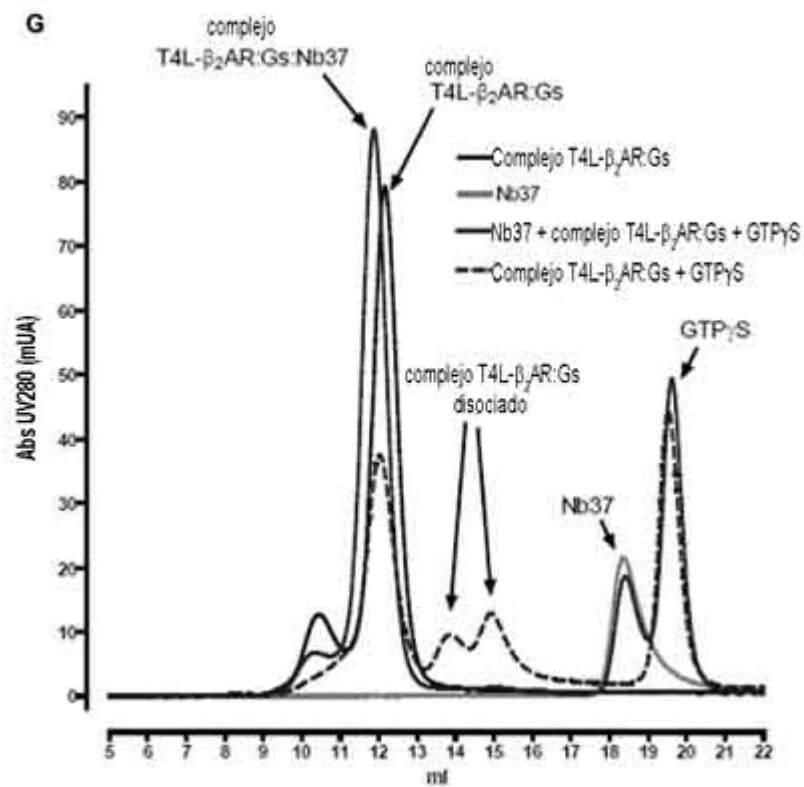
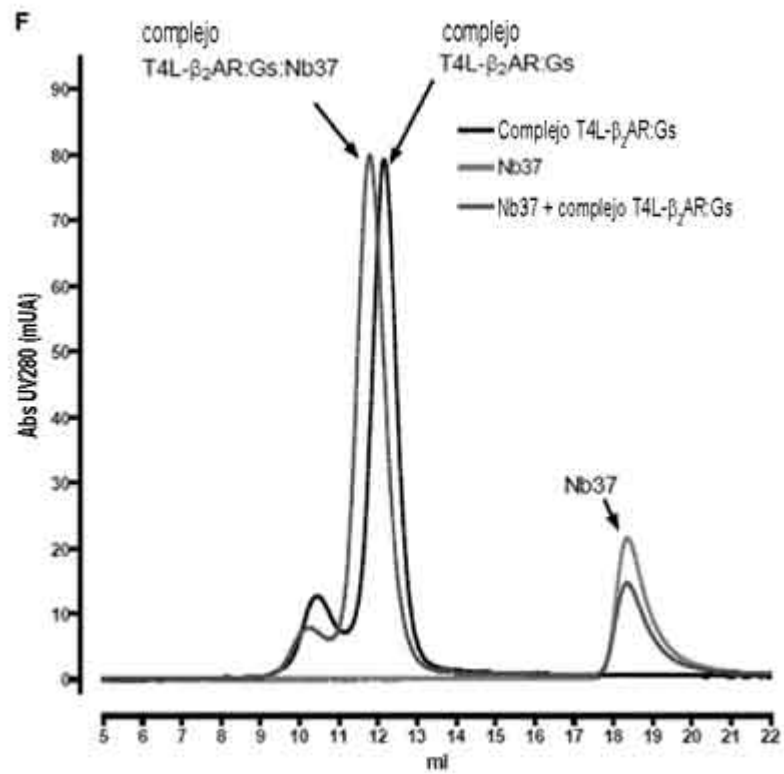


Figura 4

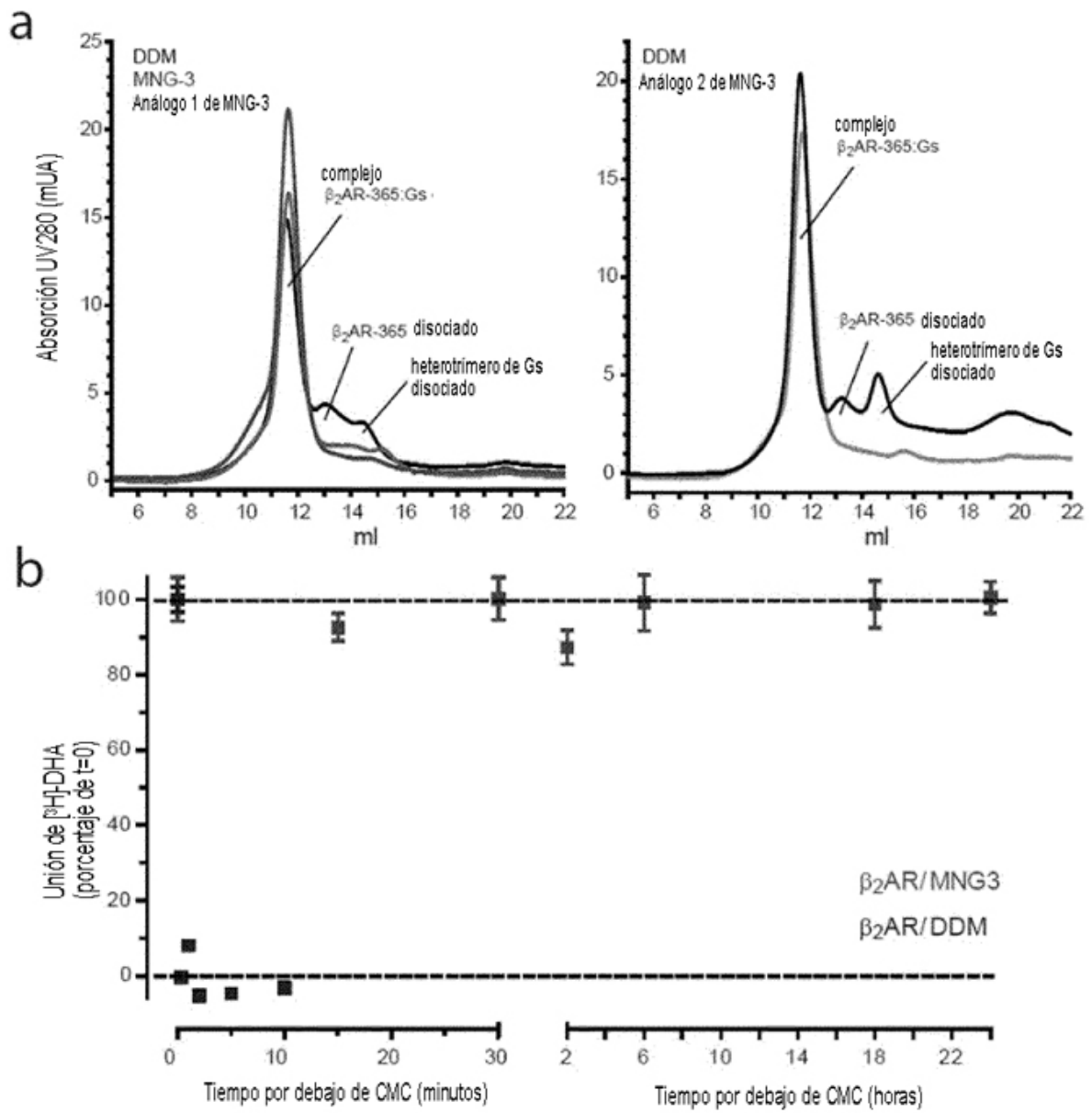


Figura 5

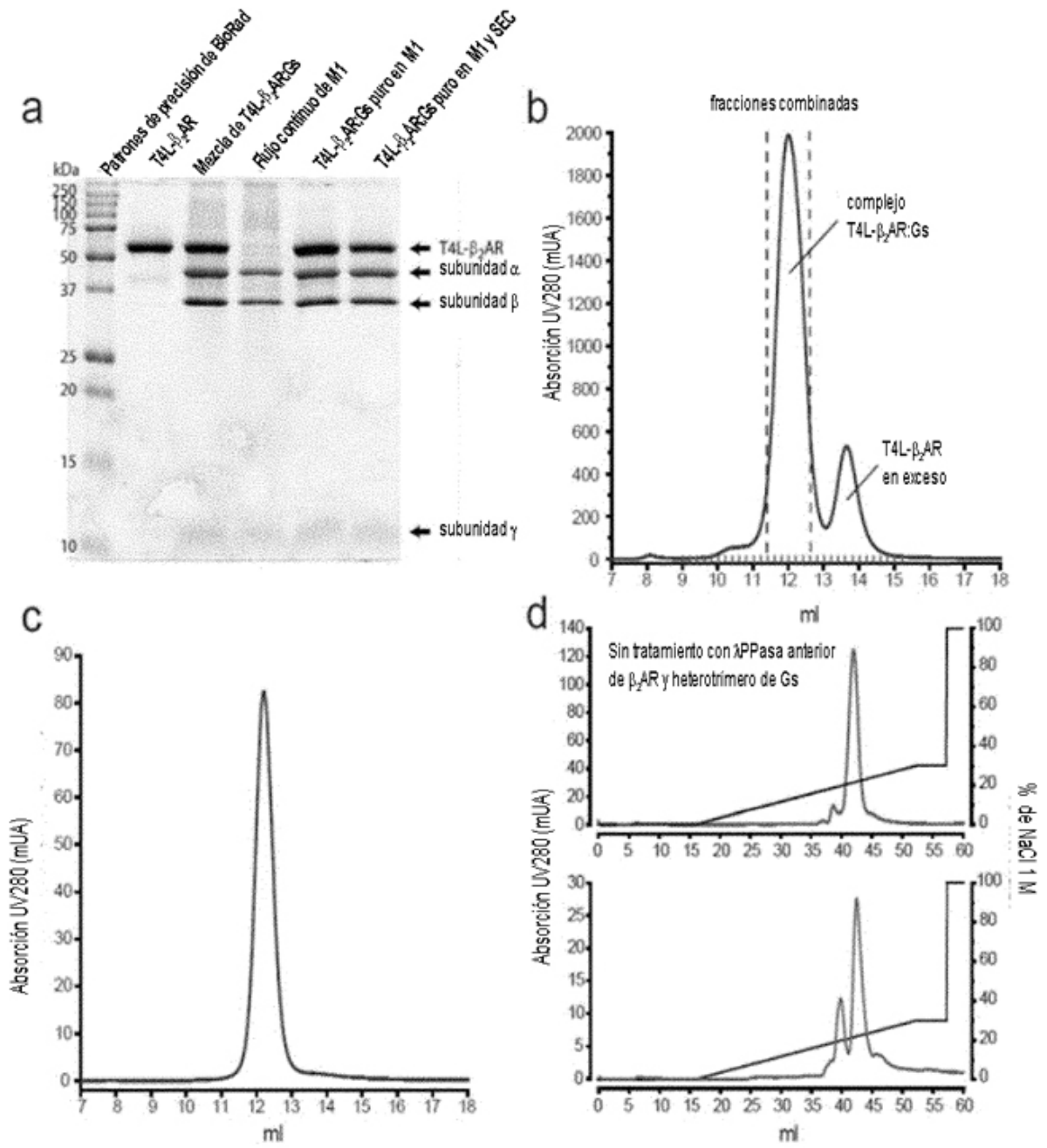


Figura 6

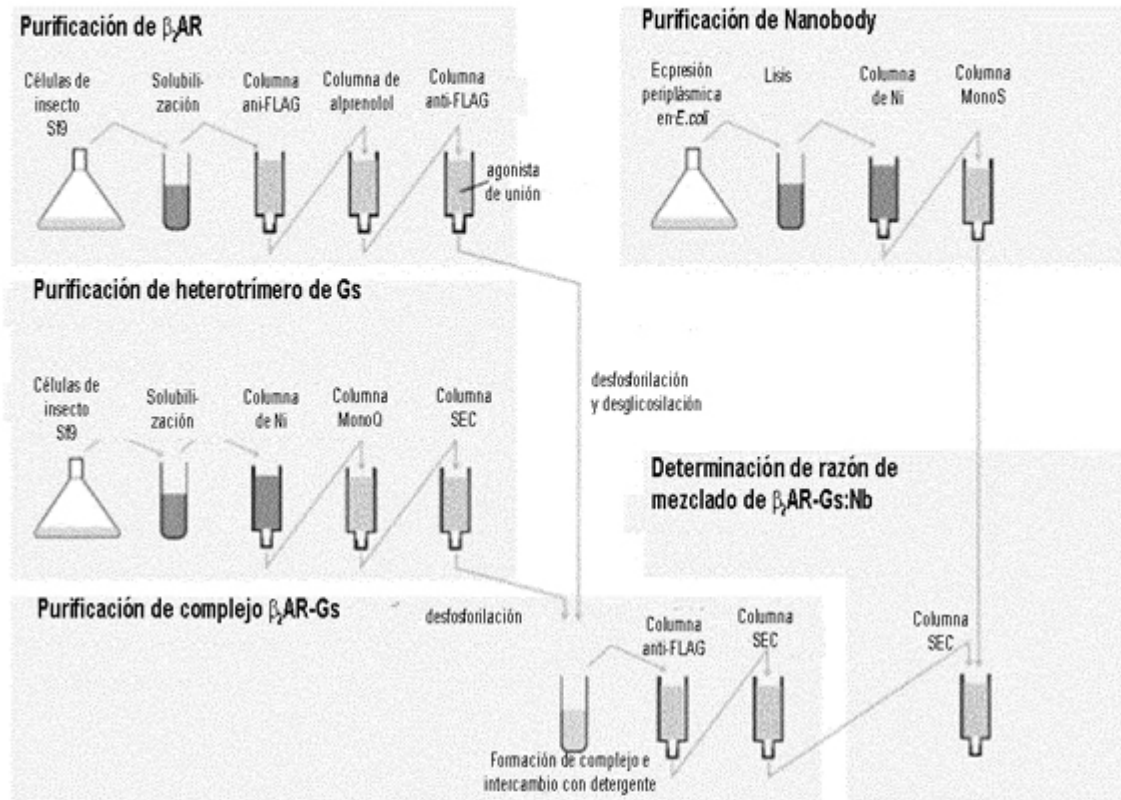


Figura 7

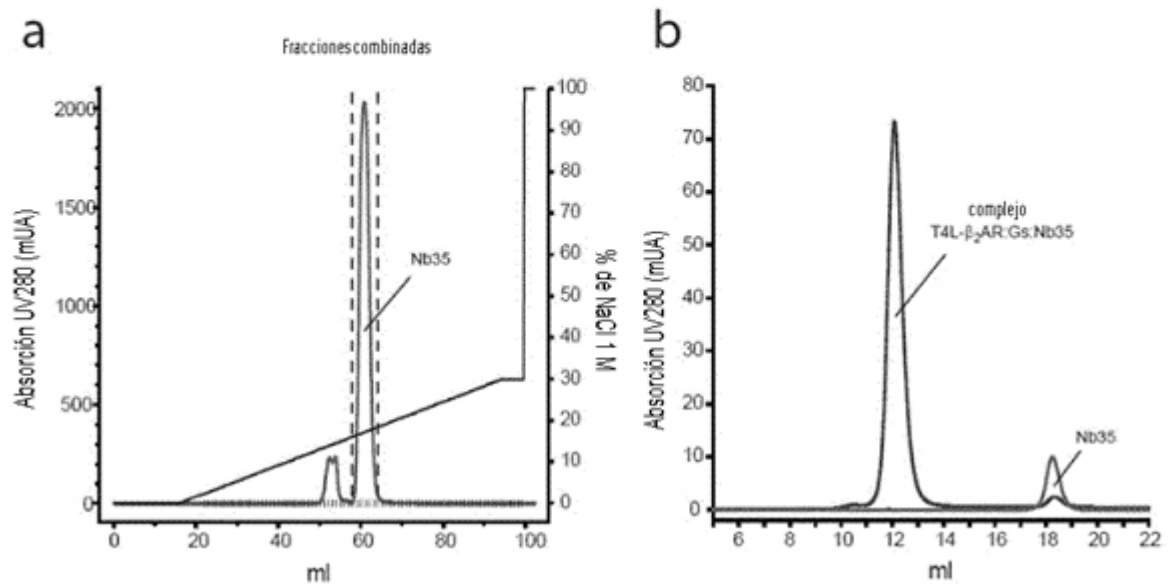


Figura 8

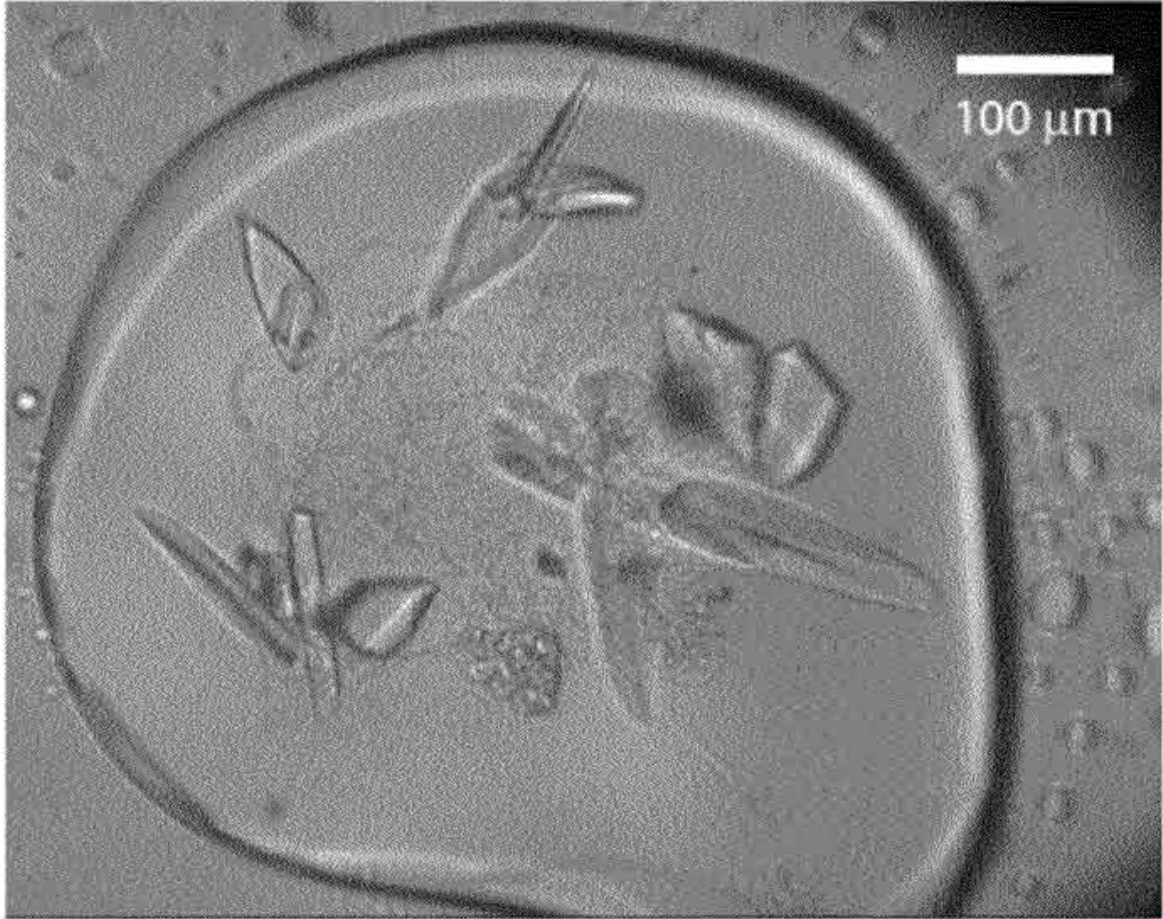
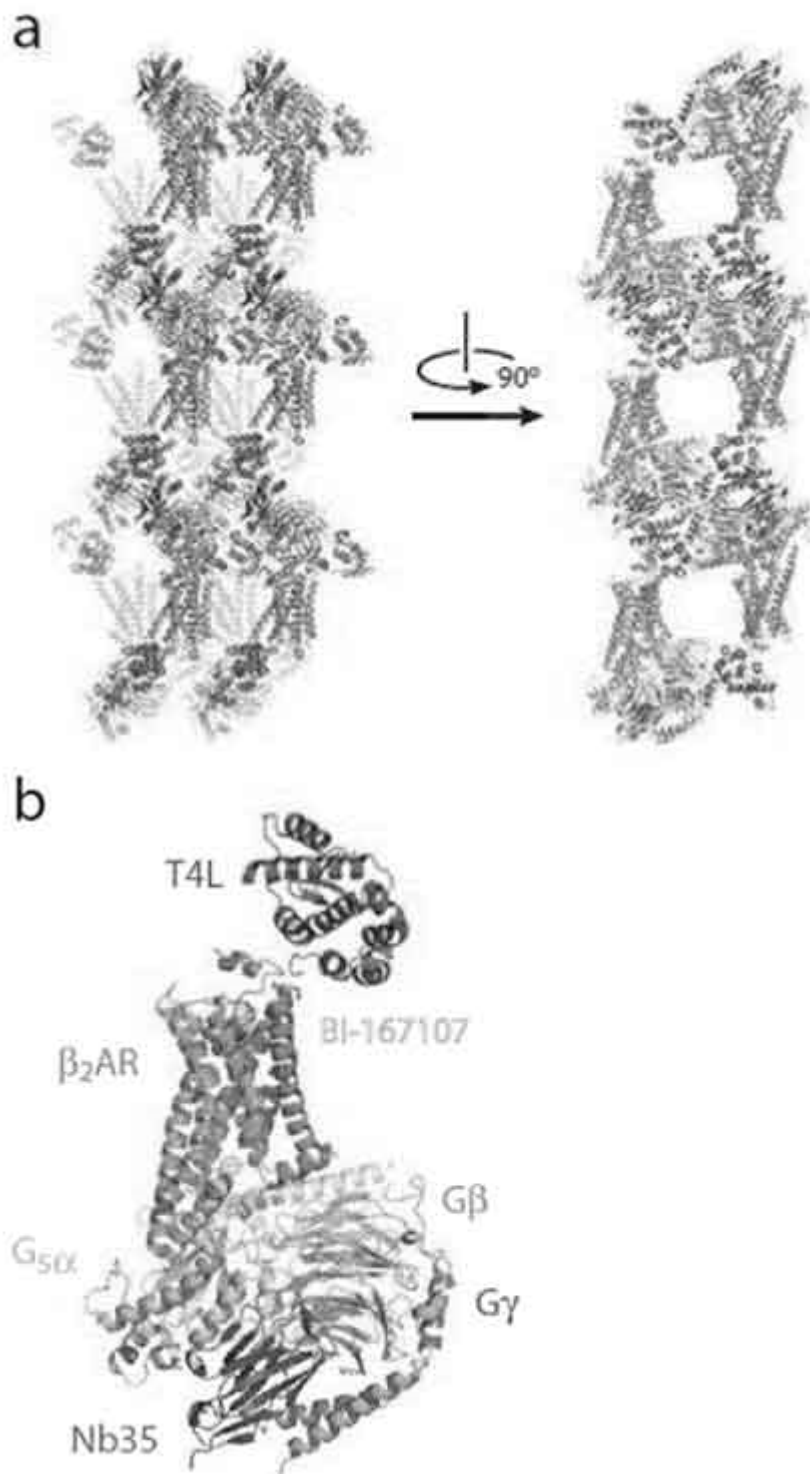


Figura 9



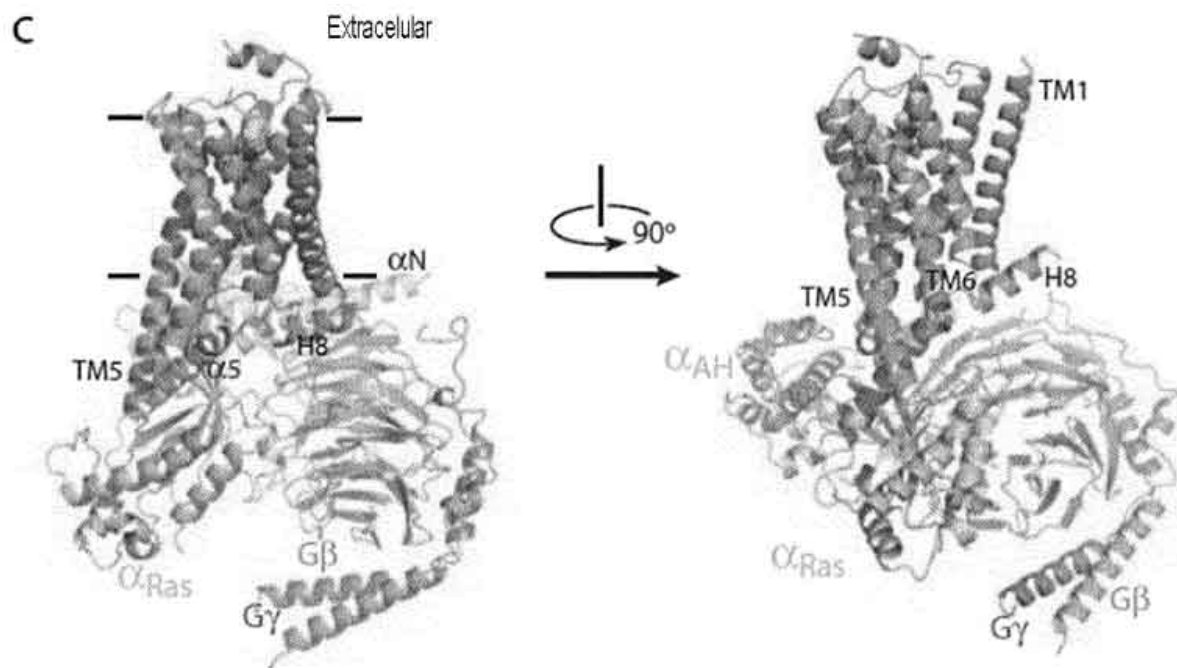


Figura 10

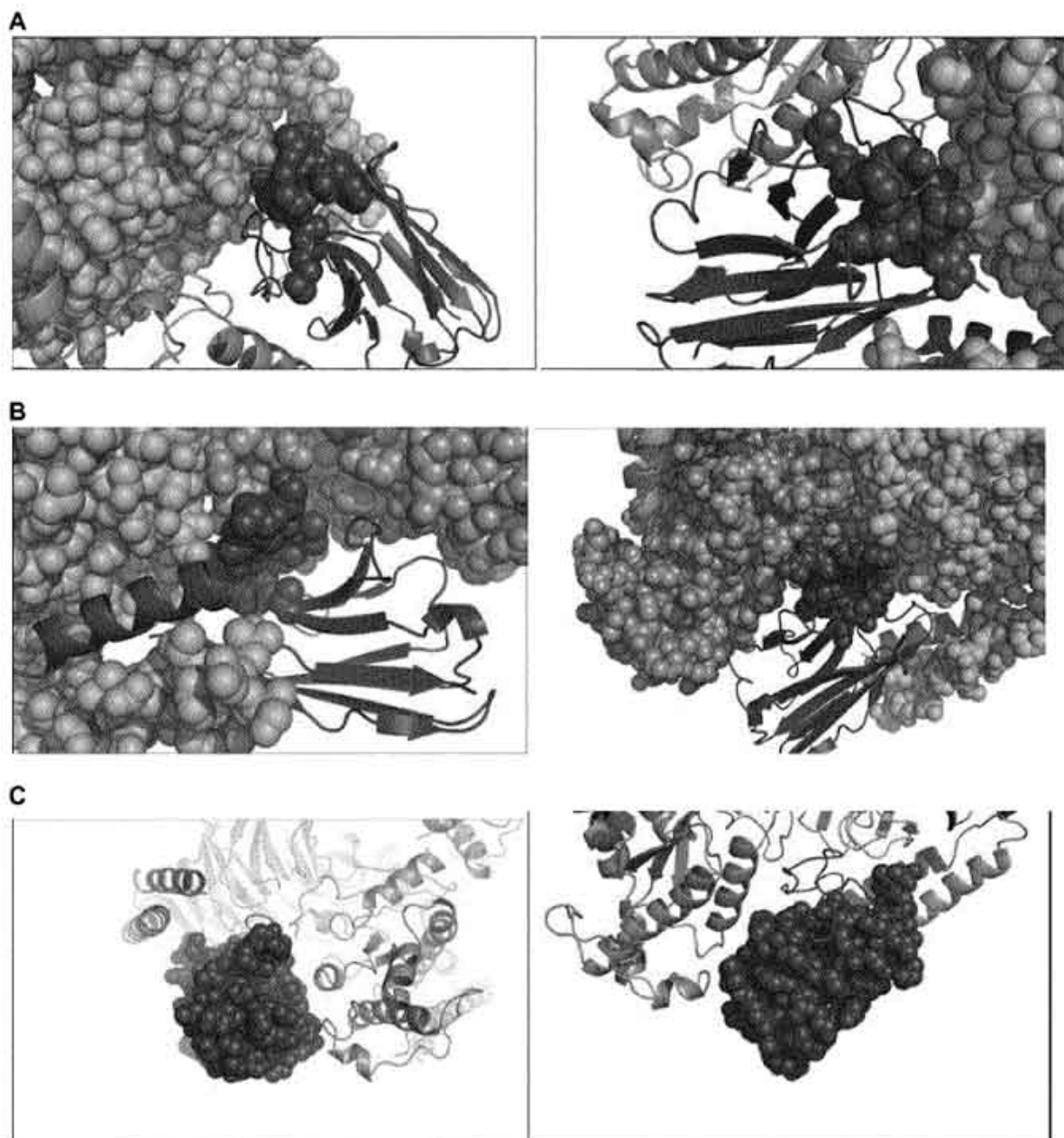


Figura 11

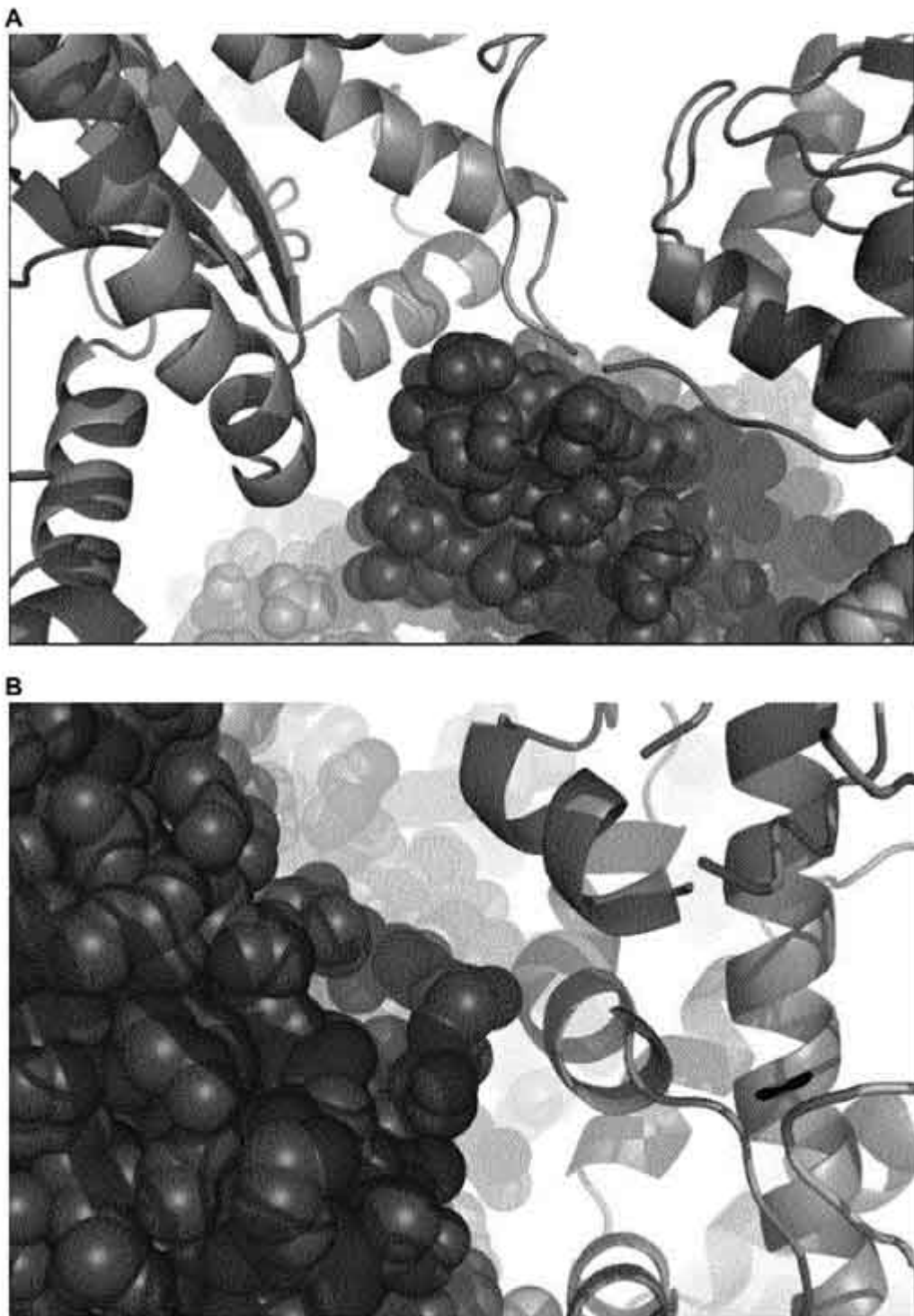
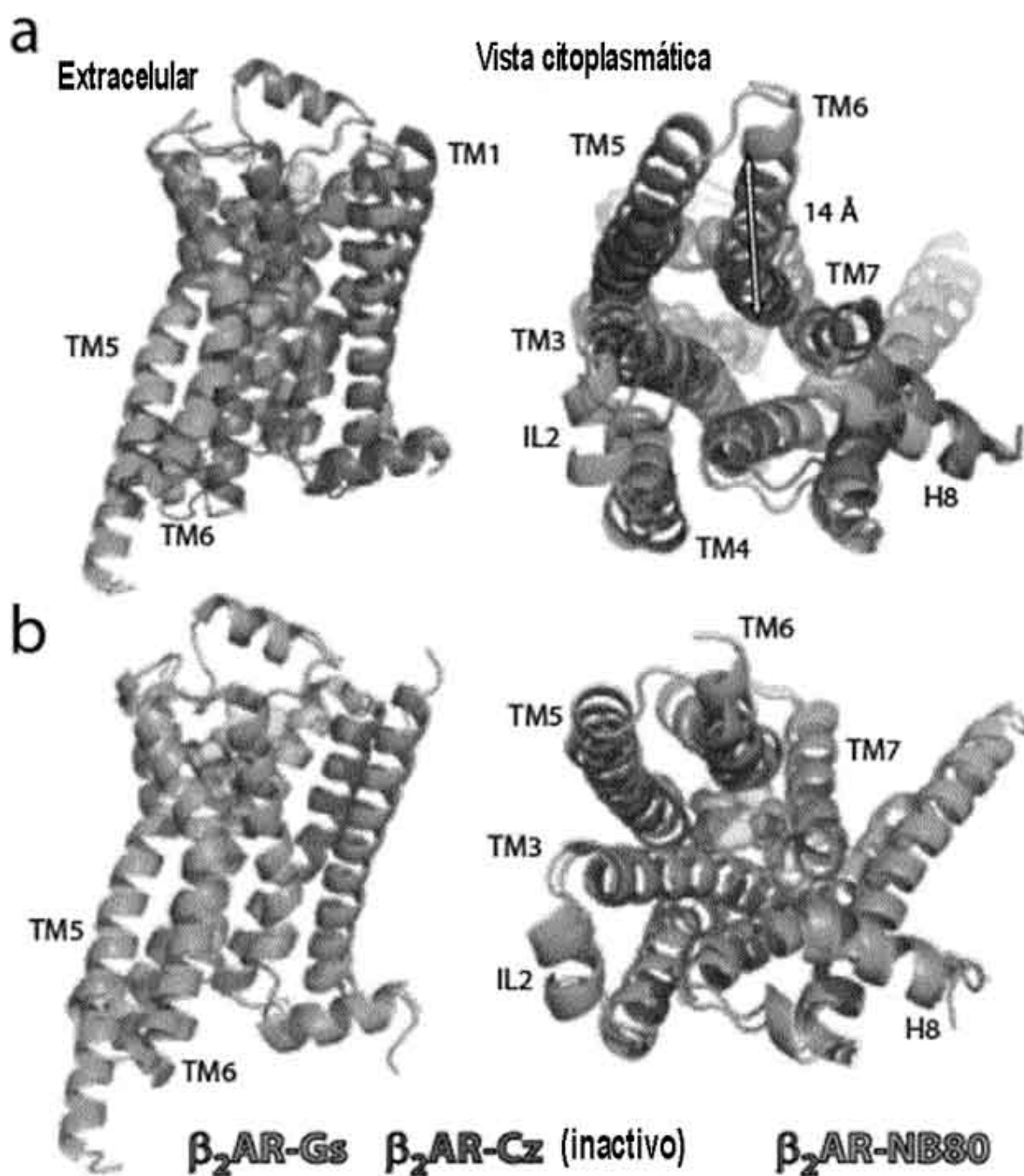


Figura 12



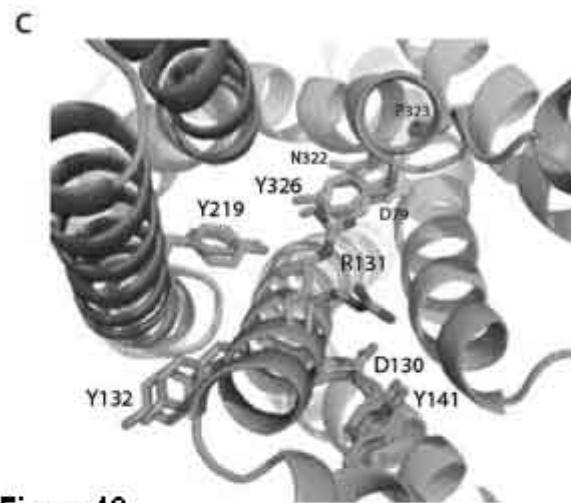
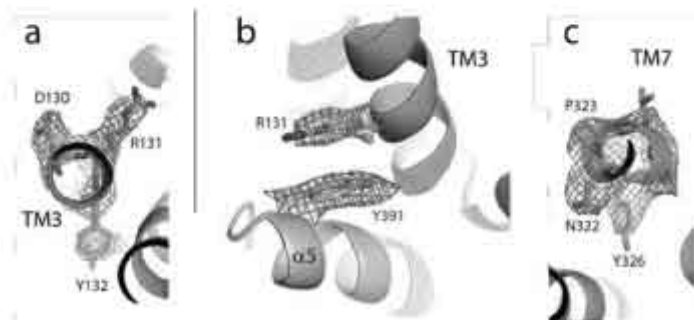


Figura 13



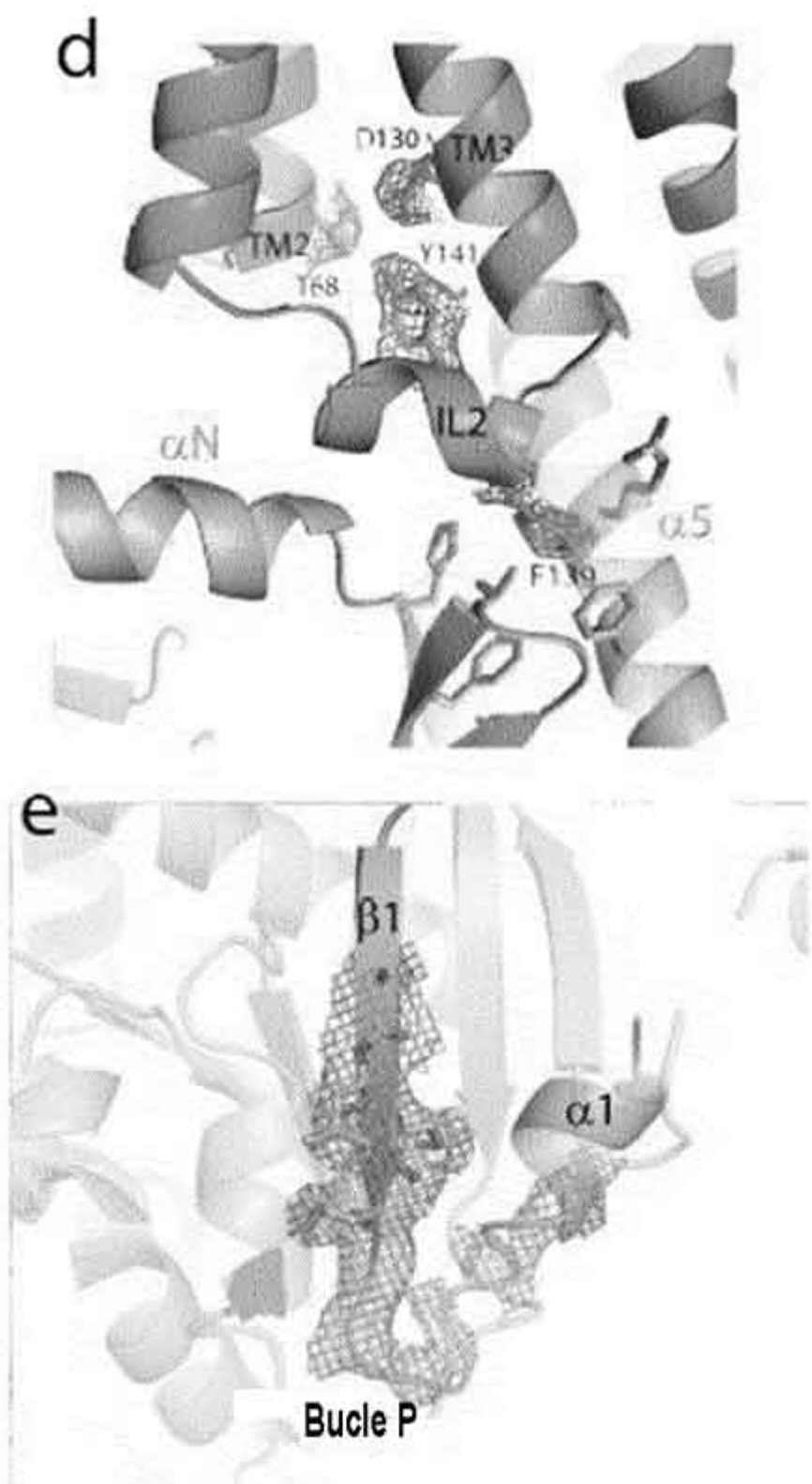


Figura 14

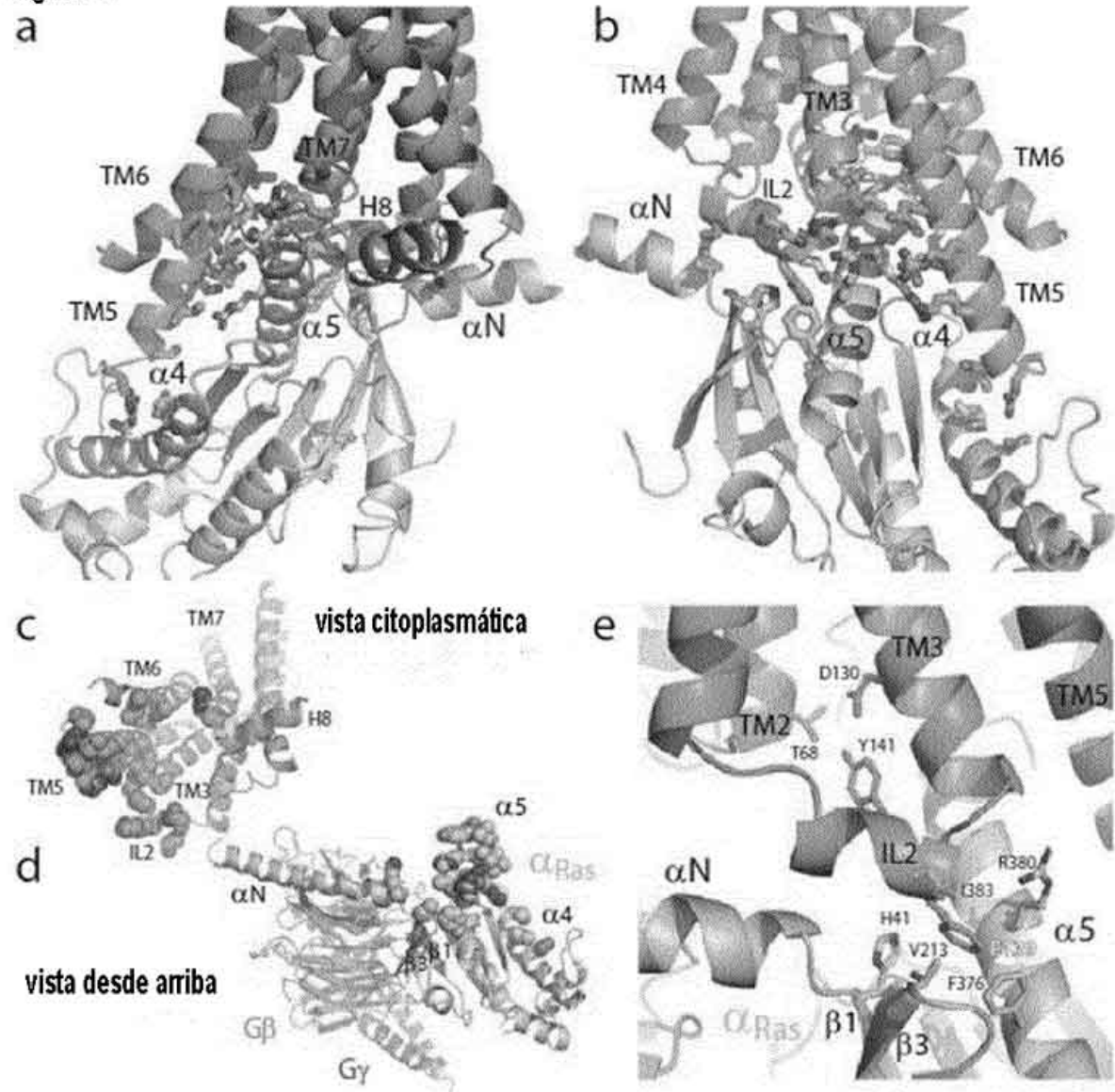


Figura 15

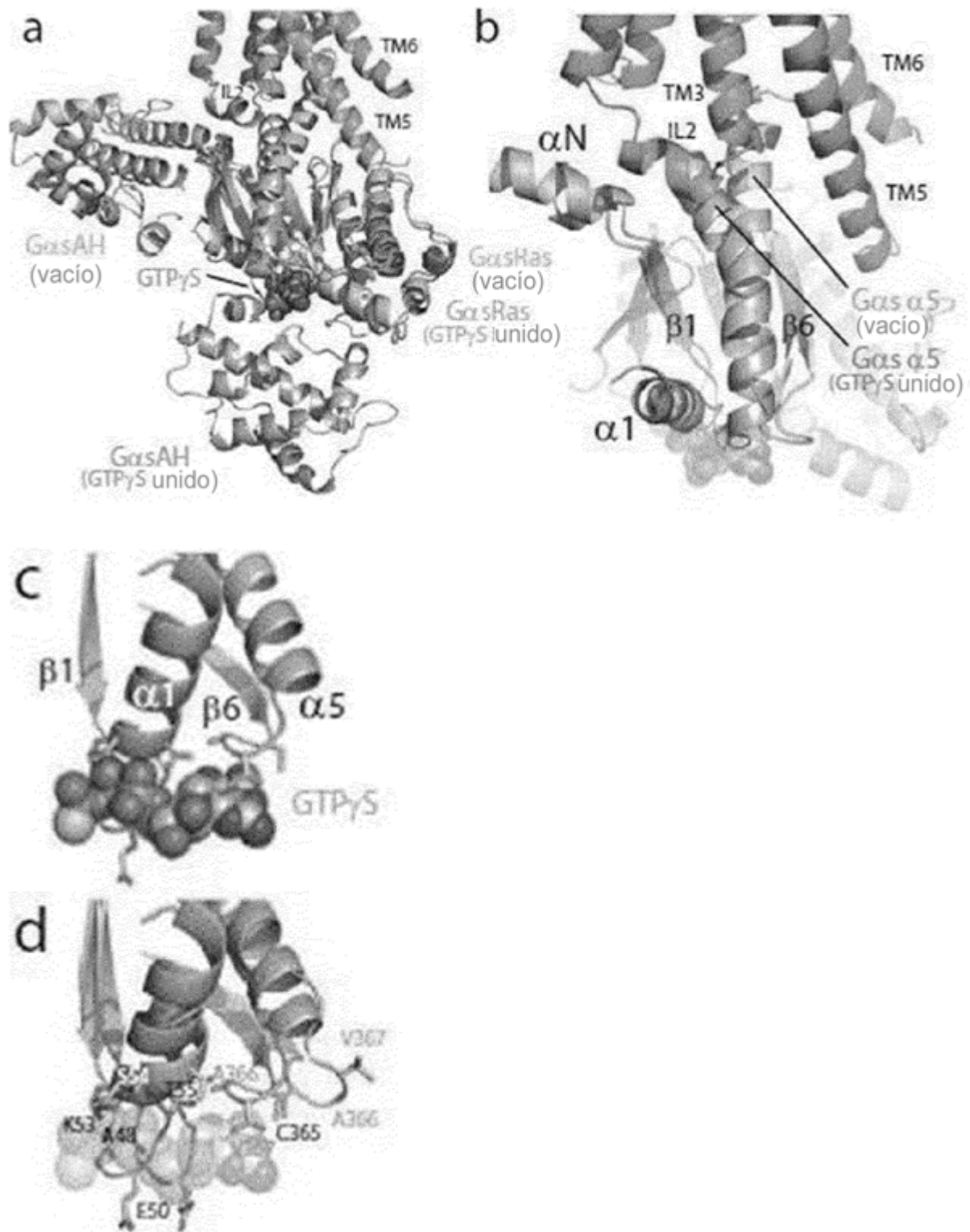


Figura 16

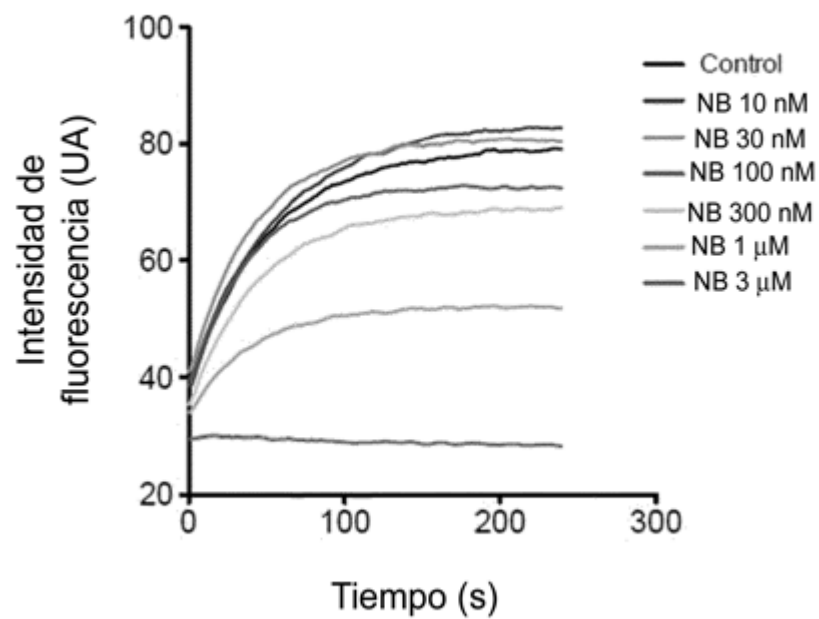


Figura 17

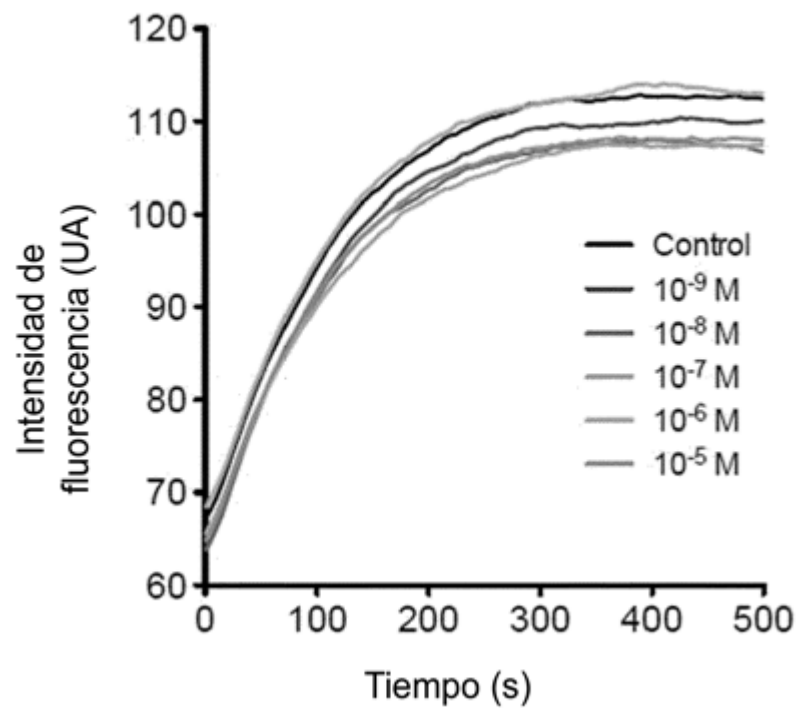


Figura 18

042011 - [NB35] en heterotrímero de Gs

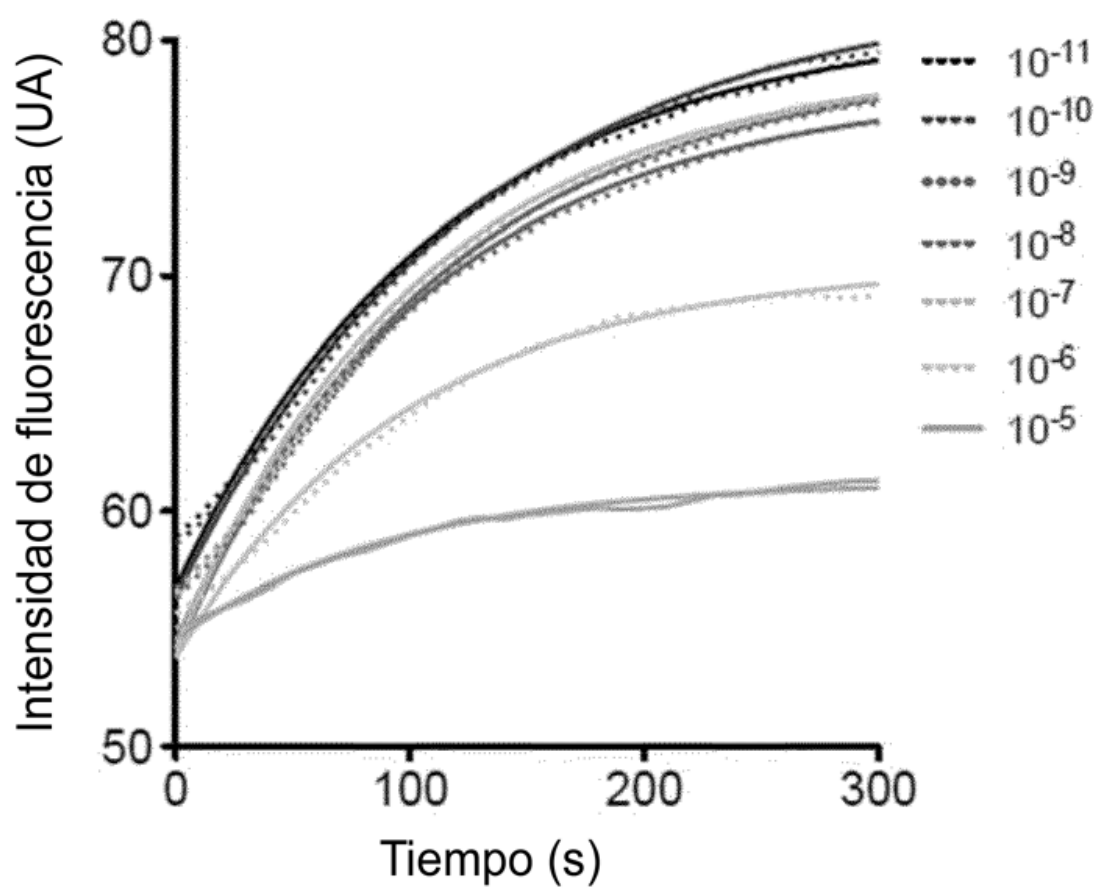


Figura 19

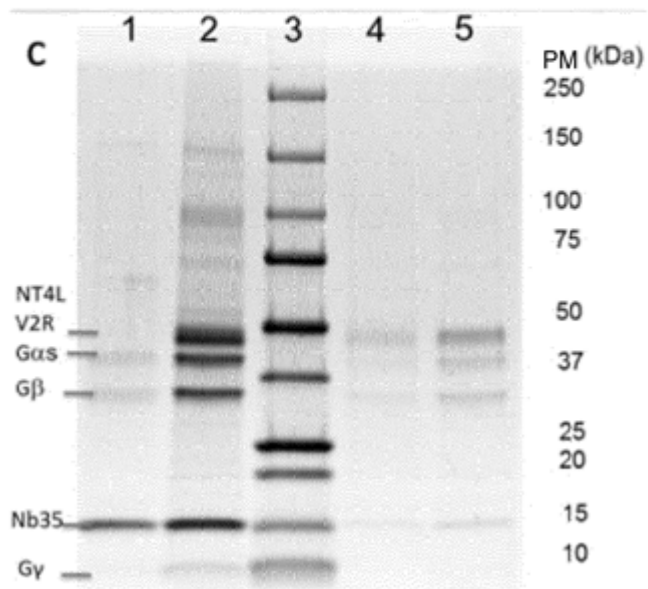
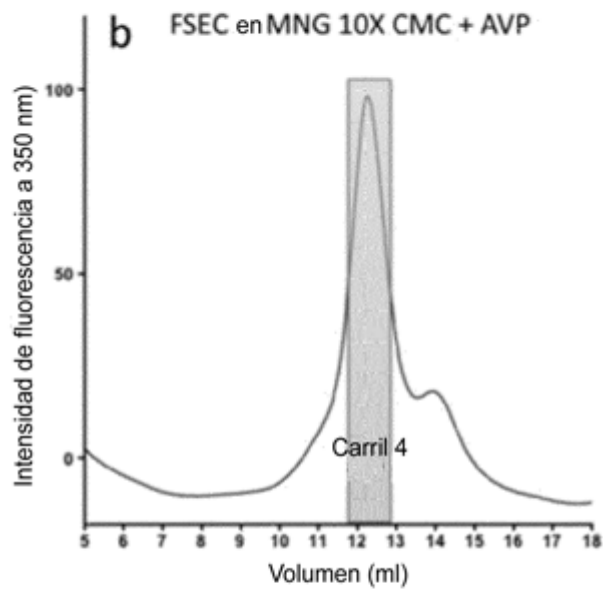
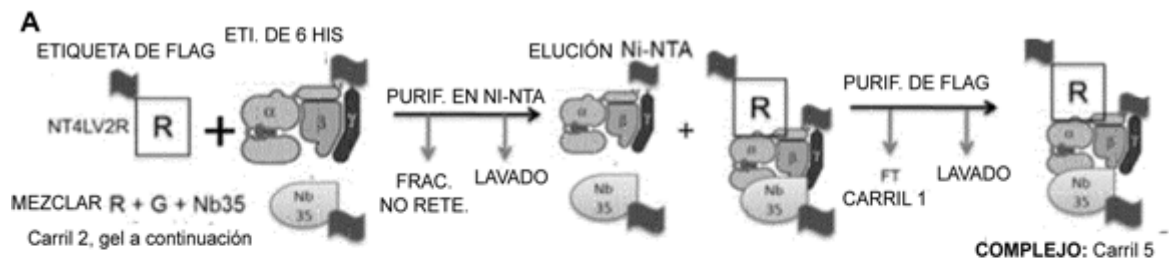


Figura 20

Complejo V2R-Gs-Nb35: efecto de SR121463 antagonista y estabilidad a lo largo del tiempo

