

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 827**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/542** (2006.01)

**C07K 14/72** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/GB2013/051464**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13179062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13734141 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2856161**

54 Título: **Ensayos**

30 Prioridad:

**01.06.2012 US 201261654265 P**

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

**25.07.2018**

73 Titular/es:

**HEPTARES THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)  
BioPark Broadwater Road  
Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX, GB**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, FIONA HAMILTON;  
JAZAYERI-DEZFULY, SEYED ALI y  
PATEL, JAYESH CHHOTUBHAI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 676 827 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

## Ensayos

- 5 La presente invención se refiere a ensayos para evaluar la estabilidad de una proteína de membrana, especialmente un receptor acoplado a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés).

En los últimos 20 años, la tasa de determinación de estructuras de proteínas de membrana ha aumentado gradualmente, pero la mayor parte del éxito se ha producido en la cristalización de proteínas de membrana en bacterias en lugar de en eucariotas. Las proteínas de membrana bacterianas se han sobreexpresado más fácilmente usando técnicas convencionales en *Escherichia coli* que las proteínas de membrana eucarióticas [1] y las proteínas bacterianas a veces son mucho más estables a los detergentes, siendo la estabilidad frente a los detergentes un requisito previo esencial para la purificación y cristalización. Además de las dificultades en la sobreexpresión de proteínas de membrana eucarióticas, con frecuencia tienen poca estabilidad en soluciones de detergente, lo que restringe gravemente la gama de condiciones de cristalización que pueden explorarse sin su desnaturalización o precipitación inmediatas. De forma ideal, las proteínas de membrana deberían ser estables durante muchos días en cualquier solución de detergente dada, pero los detergentes más adecuados para el crecimiento de cristales de calidad de difracción tienden a ser los detergentes más desestabilizantes, es decir, aquellos con cadenas alifáticas cortas y grupos de cabeza pequeños o cargados. Los inventores también quisieran resolver las estructuras de las proteínas de membrana humanas, ya que son necesarias para ayudar al desarrollo de agentes terapéuticos por la industria farmacéutica. Por tanto, existe una necesidad abrumadora de desarrollar una estrategia genérica que permita la producción de proteínas de membrana integrales eucarióticas estables a los detergentes para la cristalización y la determinación de la estructura y potencialmente para otros fines, tales como aplicaciones en cribado de fármacos, bioensayos y biosensores.

Los GPCR constituyen una gran familia de proteínas que controlan muchos procesos fisiológicos y son las dianas de muchos fármacos eficaces. En consecuencia, tienen una importancia farmacológica considerable. Se proporciona una lista de GPCR en Foord *et al* (2005) *Pharmacol Rev.* 57, 279-288. Los GPCR generalmente son inestables cuando están aislados y, a pesar de esfuerzos considerables, existen pocas estructuras cristalinas.

Los GPCR son dianas farmacológicas y se hace referencia en particular a Overington *et al* (2006) *Nature Rev. Drug Discovery* 5, 993-996, que indica que más de la cuarta parte de los fármacos actuales tienen un GPCR como diana.

Se cree que los GPCR existen en múltiples conformaciones distintas que se asocian a diferentes clases farmacológicas de ligandos, tales como agonistas y antagonistas, y que realizan un ciclo entre estas conformaciones con el fin de funcionar (*Kenakin T.* (1997) *Ann N Y Acad Sci* 812, 116-125).

Los inventores se han dado cuenta de que existen dos problemas graves asociados al intento de cristalizar los GPCR, a saber, su falta de estabilidad (por ejemplo, en detergente) y el hecho de que existen en múltiples conformaciones. Con el fin de funcionar, los GPCR han evolucionado para realizar un ciclo a través de al menos dos conformaciones distintas, la forma unida al agonista y la forma unida al antagonista, y los cambios entre estas dos conformaciones pueden producirse espontáneamente en ausencia de ligando. Por tanto, es probable que cualquier receptor purificado comprenda una mezcla de conformaciones. La simple adición de ligandos a los GPCR durante ensayos de cristalización no ha dado como resultado la determinación de su estructura.

Los inventores han descubierto que pueden generarse receptores estabilizados (StaR, por sus siglas en inglés) a través de una detección de mutagénesis sistemática en todo el receptor completo combinada con un ensayo de termoestabilidad basado en la unión del ligando. El método de generación de StaR da como resultado la estabilización de una conformación específica del receptor. Una descripción detallada del método puede encontrarse en otra parte [2, 3, 4] y en el documento WO 2008/114020 y en el documento WO 2009/071914. En resumen, con el fin de estabilizar los receptores en una conformación particular, el receptor solubilizado se incubaba con una cantidad en exceso del agonista o antagonista, dependiendo de la conformación deseada. Después, el complejo receptor/ligando se calienta a diversas temperaturas durante un determinado periodo de tiempo. Después del calentamiento, el exceso de ligando no unido se separa de los complejos receptor/ligando. El porcentaje de unión del ligando a cualquier temperatura dada se usa como lectura de la cantidad de receptor plegado que queda después del calentamiento. La representación de estos datos frente a la temperatura produce una curva de disminución térmica y el valor de  $T_m$  se define como la temperatura a la que se conserva el 50 % de la actividad del receptor. Este proceso se basa en la disponibilidad de un buen ligando con una alta afinidad y propiedades favorables en detergente. Sin embargo, en algunos casos, no hay disponible un ligando de este tipo y, por tanto, es altamente deseable un ensayo que sortee la necesidad de un ligando, es decir, en el que no se use la actividad de unión del ligando para medir la actividad del receptor.

Históricamente, los cambios estructurales de las proteínas durante el calentamiento se han estudiado mediante diversas técnicas analíticas, tales como la velocidad de sedimentación, la calorimetría diferencial de barrido, la dispersión de luz dinámica, la espectroscopia de dicroísmo circular, la espectroscopia UV/VIS, la electroforesis, la fluorescencia y la RMN. Sin embargo, estas técnicas con frecuencia requieren grandes cantidades de proteína, son

difíciles de adaptar a un cribado de alto rendimiento y, con frecuencia, adolecen de relaciones de señal/ruido bajas debido al alto ruido de fondo de los detergentes.

Alexandrov *et al* han descrito otro método de medición de la estabilidad térmica de las proteínas de membrana sin el uso de un ligando [5]. Éste se basa en la accesibilidad de restos de cisteína nativa a la modificación covalente como una lectura para el proceso de desplegamiento. El desplegamiento de proteínas da como resultado la exposición de cisteínas incluidas, lo que las hace propensas a la modificación con una sonda fluorescente reactiva. En el ensayo conocido, los autores usan el fluorocromo específico de sulfhidrilo N-[4-(7-dietilamino-4-metil-3-cumarinil)fenil]maleimida (CPM) porque presenta poca fluorescencia en su forma no unida. Una desventaja importante de este ensayo, sin embargo, es que no es adecuado para aplicaciones de alto rendimiento. Requiere cantidades bastante grandes de una preparación de proteína de membrana altamente pura porque el sistema de detección no es específico para la proteína de membrana.

Knepp *et al* (*Biochemistry* 50 (4): 502-11, 2011) describen el uso de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (TERF) [6] para evaluar la estabilidad de proteínas de membrana. La TERF se basa en la transferencia de energía dependiente de la distancia desde un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor. De manera importante, los fluoróforos donadores y aceptores deben tener espectros de emisión bien separados, pero el espectro de emisión del donador debe solaparse con el espectro de excitación del fluoróforo aceptor. En el método de Knepp *et al*, la unión de un anticuerpo monoclonal marcado con un aceptor de TERF se usa como un marcador de desnaturalización de GPCR. Se genera una señal de TERF cuando el aceptor de TERF está cerca del donador de TERF unido al extremo C del GPCR. Sin embargo, una limitación significativa de este método es que requiere la disponibilidad de anticuerpos adecuados específicos para la proteína de membrana en cuestión. Además, es improbable que el método de Knepp *et al* identifique mutaciones estabilizantes que se encuentren en el sitio de unión del anticuerpo, puesto que estas mutaciones reducirán o anularán la unión del anticuerpo. Adicionalmente, las mutaciones en el sitio de unión del anticuerpo pueden aumentar la afinidad del anticuerpo por el receptor sin aumentar necesariamente la estabilidad conformacional, conduciendo de este modo a falsos positivos. Otra desventaja del método de Knepp *et al* es que el anticuerpo puede tener un efecto específico sobre la farmacología del GPCR. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una conformación particular del GPCR que no se desea.

Por tanto, sigue existiendo una gran necesidad de un ensayo eficaz y simple que pueda usarse para medir la estabilidad de las proteínas de membrana.

La agregación de proteínas tras desplegarse es una característica general de todas las proteínas que se produce en diversos grados en diferentes proteínas. Se acepta que la estabilidad estructural global de una proteína es inversamente proporcional a los niveles de agregación. Se sabe que las proteínas de membrana presentan altos niveles de agregación después de la solubilización y más después de la desnaturalización.

Existen diversos métodos disponibles para medir la agregación, pero no para medir la agregación de proteínas de membrana después de la desnaturalización.

Por ejemplo, Pollitt *et al.* (*Neuron* 40: 685-694, 2003) y el documento US 7.803.559 describen un ensayo en células para medir la agregación de proteína de poliglutamina intracelular usando TERF y analizan su uso en el cribado de reguladores de la agregación que pueden tener aplicación terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. Además, Roberti *et al.* (*Nature Methods* 4 (4): 345, 2007) y Rajan *et al* (*PNAS* 98 (23): 13060-13065) describen métodos basados en TERF para la evaluación de la agregación de proteínas que se sabe que forman agregados como parte de una enfermedad patológica.

La agregación de proteínas también puede medirse mediante las técnicas analíticas mencionadas anteriormente. Sin embargo, todos estos métodos exigen proteína altamente purificada.

El documento EP 2 450 445 describe un método para la selección de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) con estabilidad aumentada, comprendiendo el método (a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental, (b) seleccionar un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando el GPCR reside en una conformación particular, (c) determinar si el GPCR mutante o cada uno de ellos tiene una estabilidad aumentada con respecto a la unión del ligando seleccionado en comparación con la estabilidad del GPCR parental con respecto a la unión de ese ligando y (d) seleccionar aquellos mutantes que tienen una estabilidad aumentada en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión del ligando seleccionado.

A pesar de los avances anteriores, no hay ampliamente disponibles métodos para medir la agregación de proteínas de membrana. Esto se debe principalmente a que estos métodos requieren grandes cantidades de proteína altamente purificada y la generación de proteínas de membrana altamente purificadas es un reto.

Los presentes inventores han identificado ahora métodos para evaluar directamente la agregación de proteínas de membrana. Dichos métodos permiten identificar las condiciones y mutaciones que pueden minimizar la agregación global de las proteínas. En comparación con los métodos que miden indirectamente la agregación, tal como el de Knepp *et al*, se cree que los presentes métodos identifican más mutaciones y condiciones que pueden minimizar la agregación de proteínas. Esto se debe a que algunas mutaciones y condiciones pueden reducir la agregación de

proteínas sin cambiar la estructura de la proteína de una manera que conduzca a un cambio en la unión del ligando o la unión del anticuerpo, ya que se basa en ello como lectura para la agregación en los métodos indirectos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un ensayo de evaluación de la estabilidad conformacional de una proteína de membrana, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que comprende una primera población y una segunda población de una proteína de membrana; en la que la proteína de membrana en la primera población está marcada con un marcador donador y la proteína de membrana en la segunda población está marcada con un marcador aceptor, o la proteína de membrana en la primera población está marcada con un marcador aceptor y la proteína de membrana en la segunda población está marcada con un marcador donador, y en la que las poblaciones de proteína de membrana se proporcionan en una forma solubilizada en la que las proteínas de membrana mantienen la integridad estructural y están en una forma funcional,
- (b) exponer las poblaciones primera y segunda de la proteína de membrana a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad,
- (c) y evaluar la agregación entre las proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda activando el marcador donador para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, cuya interacción produce una señal detectable.

En este ensayo, la agregación de las proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda se detecta en virtud de que los marcadores donadores y los marcadores aceptores se aproximan entre sí y, de este modo, generan una señal detectable cuando las proteínas de membrana se agregan. Si las proteínas de membrana son estables, existe menos agregación tras la exposición a un agente y/o condición desestabilizante y, por tanto, menos señal, mientras que, si las proteínas de membrana son inestables, existe más agregación tras la exposición a un agente y/o condición desestabilizante y, por tanto, más señal.

Por "estabilidad conformacional" se incluye el significado de la estabilidad de una conformación particular de una proteína de membrana (por ejemplo, GPCR). La estabilidad de una conformación particular se refiere a qué tan bien esa conformación particular puede conservar su estructura cuando se expone a un desnaturizante o a condiciones de desnaturización. Por tanto, una proteína de membrana con alta estabilidad conformacional tendrá una vida útil prolongada de una conformación particular en comparación con la vida útil de una conformación particular de una proteína de membrana con estabilidad conformacional baja. Los ejemplos de desnaturizantes/condiciones de desnaturización incluyen calor, detergente, un agente caotrópico y un pH extremo, como se describe adicionalmente a continuación. Como es bien sabido en la técnica, dichos desnaturizantes o condiciones de desnaturización pueden afectar a estructuras secundarias y terciarias de una proteína, pero no a la secuencia primaria.

Por "proteína de membrana" los inventores se refieren a una proteína que está unida o asociada a una membrana de una célula u orgánulo. Preferentemente, la proteína de membrana es una proteína de membrana integral que está integrada permanentemente en la membrana y que solo puede retirarse usando detergentes, disolventes apolares o agentes desnaturizantes que alteran físicamente la bicapa lipídica.

Más preferentemente, la proteína de membrana es un GPCR.

Los GPCR adecuados para su uso en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, receptor de quimiocina, (por ejemplo, CCR5), receptor  $\beta$ -adrenérgico, receptor de adenosina (por ejemplo, receptor  $A_{2a}$ ) y receptor de neurotensina (NTR). Otros GPCR adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen los enumerados en Hopkins & Groom, citado anteriormente. Además, la Unión Internacional de Farmacología produce una lista de GPCR (Foord *et al* (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288 y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>). Se observará que los GPCR se dividen en diferentes clases, principalmente basándose en sus similitudes de secuencia de aminoácidos. También se dividen en familias por referencia a los ligandos naturales a los que se unen. Todos los GPCR se incluyen en el alcance de la invención.

Por tanto, el GPCR puede ser cualquiera de entre un receptor de adenosina, un receptor  $\beta$ -adrenérgico, un receptor de neurotensina, un receptor de ácido muscarínico, un receptor de 5-hidroxitriptamina, un adrenorreceptor, un receptor de anafilotoxina, un receptor de angiotensina, un receptor de apelina, un receptor de bombesina, un receptor de bradiginina, un receptor de cannabinoides, un receptor de quimiocinas, un receptor de colecistocinina, un receptor de dopamina, un receptor de endotelina, un receptor de ácido graso libre, un receptor de ácido biliar, un receptor de galanina, un receptor de motilina, un receptor de grelina, un receptor de hormona glucoproteínica, un receptor de GnRH, un receptor de histamina, un receptor de péptido derivado de KiSS1, un receptor de leucotrieno y lipoxina, un receptor de lisofosfolípido, un receptor de hormona concentradora de melanina, un receptor de melanocortina, un receptor de melatonina, un receptor de neuromedina U, un receptor de neuropéptido, un receptor de la familia de *N*-formilpéptidos, un receptor de ácido nicotínico, un receptor de opioide, un receptor de tipo opsina, un receptor de orexina, un receptor de P2Y, un receptor de péptido P518, un receptor de factor activador de plaquetas, un receptor de prokineticina, un receptor de péptido liberador de prolactina, un receptor de prostanoides, un receptor activado por proteasas, un receptor de relaxina, un receptor de somatostatina, un receptor de SPC/LPC,

un receptor de taquicinina, un receptor de trazas de amino, un receptor de hormona liberadora de tirotrópina, un receptor de urotensina, un receptor de vasopresina/oxitocina, un GPCR huérfano, un receptor de calcitonina, un receptor de factor liberador de corticotropina, un receptor de glucagón, un receptor paratiroideo, un receptor de VIP/PACAP, un receptor de LNB7TM, un receptor de GABA, un receptor metabotrópico de glutamato y un receptor sensor de calcio (véase la Tabla 1 de Foord *et al* (2005) *Pharmacol. Rdo.* 57, 279-288).

El GPCR también puede seleccionarse entre cualquiera de los GPCR que se enumeran a continuación en el presente documento en la Tabla A.

Además, otras proteínas de membrana para las que los métodos de la invención pueden usarse de forma útil para medir la estabilidad incluyen los receptores huérfanos enumerados en la Tabla B a continuación en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de muchas proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) están disponibles fácilmente, por ejemplo, por referencia a GenBank. En particular, Foord *et al*, citado anteriormente, proporciona los símbolos de genes humanos y los identificadores de genes humanos, de ratón y de rata de Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Ha de señalarse, también, que la secuencia del genoma humano está sustancialmente completa, las secuencias de aminoácidos de las proteínas de membrana humanas (por ejemplo, GPCR) pueden deducirse a partir de la misma.

Aunque la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) puede derivar de cualquier fuente, se prefiere en particular si es de una fuente eucariótica. Se prefiere en particular si deriva de una fuente de vertebrado tal como un mamífero o un ave. Se prefiere en particular si la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) deriva de rata, ratón, conejo o perro o primate no humano o ser humano, o de pollo o pavo. Para evitar dudas, se incluye dentro del significado de "derivado de" que un ADNc o gen se obtuviera originalmente usando material genético de la fuente, pero que la proteína pueda expresarse en cualquier célula hospedadora (por ejemplo, célula hospedadora procarriótica o eucariótica) posteriormente. Por tanto, será evidente que una proteína de membrana eucariótica (por ejemplo, GPCR) (tal como una proteína de membrana aviar o de mamífero) puede expresarse en una célula hospedadora procarriótica, tal como *E. coli*, pero puede considerarse derivada de ave o de mamífero, según sea el caso.

En algunos casos, la proteína de membrana puede estar compuesta de más de una subunidad diferente. Por ejemplo, el receptor de péptido relacionado con el gen de la calcitonina requiere la unión de una sola proteína de hélice transmembrana (RAMP1) para adquirir sus características de unión a ligando fisiológico. Además, se conocen bien en la técnica proteínas efectoras, accesorias, auxiliares o que interactúan con GPCR que se combinan con el GPCR para formar o modular un complejo funcional e incluyen, por ejemplo, cinasas receptoras, proteínas G y arrestinas (Bockaert *et al.* (2004) *Curr Opin Drug Discov y Dev* 7, 649-657).

Las proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Convenientemente, la proteína de membrana está codificada por una molécula de ácido nucleico adecuada y se expresa en una célula hospedadora adecuada. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas que codifican la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) pueden prepararse usando técnicas de clonación convencionales, mutagénesis dirigida y PCR como se sabe bien en la técnica. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos o inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión de virus tales como baculovirus, virus del bosque Semiliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insecto o de mamífero. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células de *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las células hospedadoras de animales adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40 y así sucesivamente. Se sabe que algunas proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) requieren lípidos específicos (por ejemplo, colesterol) para funcionar. En ese caso, es deseable seleccionar una célula hospedadora que contenga el lípido. Adicionalmente, o como alternativa, el lípido puede añadirse durante el aislamiento y la purificación de la proteína de membrana. También puede ser deseable añadir un ligando de la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) como se explica adicionalmente a continuación.

Se conocen bien en la técnica métodos biológicos moleculares para clonar y diseñar mediante ingeniería genética genes y ADNc, para mutar ADN y para expresar polipéptidos a partir de polinucleótidos en células hospedadoras, como se ejemplifica en "*Molecular cloning, a laboratory manual*", tercera edición, Sambrook, J. & Russell, DW (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

La muestra que comprende la primera población y la segunda población de una proteína de membrana puede ser cualquier muestra adecuada que contenga las dos poblaciones. Por "población" se incluye una pluralidad del mismo tipo específico de proteína de membrana, a diferencia de una mezcla de diferentes proteínas. Por ejemplo, la población puede comprender al menos 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10000, 100000,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  o  $10^{14}$  moléculas de proteína o más. Se apreciará que el número preciso de moléculas de proteína puede depender del nivel de expresión de la proteína de membrana particular y esto puede diferir de proteína a proteína.

Las poblaciones de proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) se proporcionan en una forma solubilizada adecuada en la que las proteínas de membrana mantienen su integridad estructural y están en una forma funcional (por ejemplo, son capaces de unirse al ligando). Se usa un sistema de solubilización apropiado, tal como un

detergente (u otro agente anfipático) adecuado y un sistema tampón, que el experto en la materia puede elegir para que sea eficaz para la proteína particular. Los detergentes típicos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, dodecilmaltosida (DDM) o CHAPS u octilglucósido (OG) o muchos otros. En una realización, la muestra comprende uno o más detergentes seleccionados entre DDM; maltósido o glucósido C<sub>11</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>9</sub> o C<sub>8</sub>; LDAO; y SDS. Puede ser conveniente incluir otros compuestos tales como hemisuccinato de colesterol o colesterol en sí o heptano-1,2,3-triol. La presencia de glicerol o prolina o betaína puede ser útil. Es importante que la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR), una vez solubilizada de la membrana en la que reside, debe ser suficientemente estable para que sea sometida a ensayo. Para algunas proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR), DDM será suficiente, pero pueden añadirse glicerol u otros polioles para aumentar la estabilidad con fines de ensayo, si se desea. Se puede conseguir estabilidad adicional con fines del ensayo, por ejemplo, mediante solubilización en una mezcla de DDM, CHAPS y hemisuccinato de colesterol, opcionalmente en presencia de glicerol. Para proteínas de membrana particularmente inestables (por ejemplo, GPCR), puede ser deseable solubilizarlas usando digitonina o anfóteros u otros polímeros que puedan solubilizar proteínas de membrana directamente de la membrana en ausencia de detergentes tradicionales y mantener la estabilidad normalmente permitiendo que un número significativo de lípidos permanezca asociado a la proteína de membrana. También pueden usarse nanodiscos para solubilizar proteínas de membrana extremadamente inestables en una forma funcional.

Normalmente, la proteína de membrana se proporciona en un extracto en bruto (por ejemplo, de la fracción de membrana de la célula hospedadora en la que se ha expresado, tal como *E. coli* o células HEK293T). Puede proporcionarse en una forma en la que la proteína de membrana comprenda al menos el 75 % o al menos el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % o el 98 % o el 99 % de la proteína presente en la muestra. Como alternativa, la proteína de membrana puede proporcionarse en una forma semipurificada como se describe en el Ejemplo 1, en la que la proteína de membrana de interés no sea la especie más abundante en la muestra. Por tanto, la proteína de membrana puede proporcionarse en una muestra en la que solo el 5-50 % de la proteína total en la muestra sea la proteína de membrana (por ejemplo, al menos el 5 % o el 10 % o el 15 % o el 20 % o el 25 % o el 30 % o el 35 % o el 40 % o el 45 % de la proteína presente en la muestra). Sin embargo, para el ensayo del primer aspecto de la invención, generalmente se requiere alguna purificación de la proteína de membrana después de su expresión y, por tanto, normalmente no puede utilizarse el lisado en bruto. Se puede usar cualquier método de purificación de proteínas adecuado como es práctica habitual en la técnica. Por supuesto, normalmente se solubiliza como se ha analizado anteriormente y, por tanto, la proteína de membrana está asociada habitualmente a moléculas de detergente y/o moléculas de lípidos.

Convenientemente, las poblaciones primera y segunda de la proteína de membrana se expresan y se marcan por separado. Las poblaciones también pueden solubilizarse y/o purificarse por separado como se ha analizado anteriormente. Las poblaciones primera y segunda de la proteína de membrana se mezclan juntas para obtener una muestra. Preferentemente, la primera población y la segunda población de la proteína de membrana están presentes en la muestra en una relación molar 1:1. Sin embargo, se aprecia que para purificaciones de proteínas a pequeña escala, puede ser difícil medir las concentraciones de proteínas y, por tanto, una relación molar 1:1 se aproxima normalmente a una relación en volumen 1:1. Se cree que la aproximación es cercana puesto que se espera que las diferencias de tamaño entre las dos poblaciones sean pequeñas y se cree que la eficacia de la purificación es igual. Convenientemente, una relación en volumen 1:1 se consigue, mediante la solubilización de un número igual de células de una primera población de células que expresan la proteína de membrana y una segunda población de células que expresan la proteína de membrana, purificando idénticamente las proteínas de membrana de cada población y eluyendo la proteína purificada en el mismo volumen. Después, los eluatos se mezclan en volúmenes iguales, por tanto, por ejemplo, se mezclan 250 µl de la primera población con 250 µl de la segunda población y así sucesivamente.

Se apreciará que una de las poblaciones de proteínas de membrana en la muestra se marcará con un marcador donador (no un marcador aceptor) y la otra de las poblaciones de proteínas de membrana se marcará con un marcador aceptor (no un marcador donador). Por "marcador donador" y "marcador aceptor" se incluye el significado de cualquier par de marcadores, en el que la activación del marcador donador permite una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, cuya interacción produce una señal detectable. De esta forma, la señal detectable generada por la interacción de los pares de donador y aceptor puede usarse como una lectura del nivel de agregación entre las proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda y, por tanto, la estabilidad conformacional.

Convenientemente, la interacción entre el marcador donador y el marcador aceptor implica la transferencia de energía del marcador donador al marcador aceptor. Por ejemplo, el término transferencia de energía de resonancia se refiere a un método en el que el marcador donador se encuentra muy próximo a un marcador aceptor. Esto genera un flujo de energía del donador al aceptor que conduce a un esquema de detección en el que una señal se controla a través del donador o aceptor. Un método de este tipo es bien conocido, por ejemplo, en un sistema de transferencia de energía por resonancia de luminiscencia en el que el colorante donador puede ser un marcador de conversión hacia abajo o hacia arriba. El donador se excita y, como consecuencia del principio de proximidad, el compuesto donador excita el marcador aceptor y se detecta una señal a la longitud de onda de emisión del compuesto aceptor. Existe una serie de métodos de transferencia de energía de resonancia, tales como transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo,

bioluminiscencia y luminiscencia. La transferencia de energía de resonancia puede realizarse como un método de generación de señal o un método en el que la señal se desactiva. En el caso de la desactivación, puede usarse cualquier elemento para desactivar la señal, tal como un tinte o metal. En un caso de este tipo, normalmente se detecta la longitud de onda de emisión de la molécula donadora. Son agentes quelantes de metales o complejantes o ligandos normales utilizados en fluorimetría de resolución temporal 3-(2-tienol)-1,1,1-trifluoroacetona, 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona, coproporfirinas, porfirinas, 3-naftoíl-1,1,1-trifluoroacetona, 2,2-dimetil-4-perfluorobutiloil-3-butanona, 2,2'-dipiridilo, fenantrolina, ácido salicílico, ácido fenantrolincarboxílico, aminofenantrolina, difenilfenantrolina, dimetilfenantrolina, ácido bipiridilcarboxílico, éteres de aza corona, óxido de trioctilfosfina, criptas de aza, dibenzoímetano, dinaftoímetano, dibifenoímetano, benzoílacetonato, fenilazodibenzoímetano, ditienilpropanodiona, 4,4'-bis(N,N-dimetilamino)benzofenona, tris(6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-dimetiloctano-3,5-diona, ácido (alquinoxifenil)piridin-2,6-dicarboxílico y sus derivados. Los iones metálicos pueden ser, por ejemplo, iones de lantánidos o rutenio (Selvin P. *Nature Struc. Biol.* 2000: 7; 730; Forster T. *Discuss. Faraday Soc.* 1959: 27; 7; Latva M. Disertación académica, Universidad de Turku, Finlandia, 1997; Mikkala V.-M. Disertación académica, Universidad de Turku, Finlandia, 1993; Wohrle D. y Pomogailo A. D. *Metal Complements and Metals in Macromolecules*, John Wiley & Sons, 2003).

En una realización preferida, la interacción entre los marcadores donadores y aceptores implica la transferencia de energía de fluorescencia (TERF), un fenómeno por el cual cuando los fluoróforos donadores y aceptores están muy próximos, la energía de fluorescencia del fluoróforo donador se transfiere al fluoróforo aceptor y se observa luminiscencia del fluoróforo aceptor. Puede usarse cualquier par adecuado de fluoróforos donador y aceptor como marcadores donador y aceptor.

Un fluoróforo donador particularmente preferido es un lantánido, tal como europio, terbio, samario o disprosio. Los lantánidos tienen vidas útiles largas que permiten la medición resuelta en el tiempo de la emisión del aceptor. Esto es importante porque disminuye significativamente el efecto de la autofluorescencia del material biológico y la posible excitación directa del aceptor. Además, los picos de emisión de los lantánidos están bien separados, son estrechos y presentan desplazamientos de Stokes largos (la distancia entre las longitudes de onda de absorción y emisión máximas).

El fluoróforo aceptor puede ser cualquier fluoróforo con una longitud de onda de excitación que se solape con uno de los picos de emisión del donador. Para los picos de emisión de los quelatos de lantánidos véase la Tabla 1, el pico dominante se muestra en negrita. Por ejemplo, con el donador Terbio, podría usarse cualquier fluoróforo con una longitud de onda de excitación de aproximadamente 490 nm, 545 nm o 620 nm. Por tanto, un fluoróforo tal como Fluoresceína, Rodamina, Alexa Fluora 488, Dylight 488, d2, Cy3, BODIPY FL, BODIPY 630/650-X, variantes desplazadas al rojo de proteína verde fluorescente (GFP), tipificado por EGFP y GFP-S65T, puede usarse en combinación con el Terbio.

Tabla 1

| Eu3+          | Dy3+          | Tb3+          | Sm3+          |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>580 nm</b> | 483 nm        | 490 nm        | 560 nm        |
| <b>590 nm</b> | <b>575 nm</b> | <b>545 nm</b> | 598 nm        |
| 613 nm        | 660 nm        | 590 nm        | <b>643 nm</b> |
| <b>650 nm</b> |               | 620 nm        | 710 nm        |
| <b>690 nm</b> |               | 650 nm        |               |
| <b>710 nm</b> |               |               |               |

En una realización alternativa, la interacción el marcador donador y el marcador aceptor implica la transferencia de energía de bioluminiscencia (TERB). Ésta difiere de la TERF en que el fluoróforo donador de la técnica TERF se reemplaza por una proteína bioluminiscente tal como la luciferasa. En presencia de un sustrato, la bioluminiscencia de la proteína bioluminiscente excita el marcador aceptor mediante el mismo mecanismo de transferencia de energía de resonancia Förster que para TERF.

Un criterio que debe tenerse en cuenta en la determinación de emparejamientos adecuados para TERB es el espectro relativo de emisión/fluorescencia del marcador aceptor en comparación con el de la proteína bioluminiscente. El espectro de emisión de la proteína bioluminiscente debe solaparse con el espectro de absorbancia de la proteína aceptora de manera que la energía lumínica de la emisión de luminiscencia de la proteína bioluminiscente esté en una longitud de onda que sea capaz de excitar el marcador aceptor y, de este modo, promover la fluorescencia del marcador aceptor cuando las dos moléculas están en una proximidad y orientación apropiadas una con respecto a la otra. Dos implementaciones comunes de TERB que pueden usarse comprenden la luciferasa de *Renilla* (RLuc) ya sea con sustrato celenterazina h (TERB<sup>1</sup>;  $\lambda_{em}$  = ~475 nm) o celenterazina 400a (Clz400a) (TERB<sup>2</sup>;  $\lambda_{em}$  = ~395 nm) como sistema donador acoplado a cualquiera de los mutantes de GFP, YFP (TERB<sup>1</sup>;  $\lambda_{em}$  = ~530 nm) o GFP<sup>2</sup> (TERB<sup>2</sup>;  $\lambda_{em}$  = ~510 nm). Sin embargo, pueden usarse cualesquier pares adecuados de marcadores donador y aceptor de TERB que sean conocidos en la técnica y como se revisaron por ejemplo en Xia y Rao (*Curr Opin Biol* 20: 1-8, 2009).

El emparejamiento luciferasa de *Renilla*/EGFP se ha comparado con el emparejamiento luciferasa de *Renilla*/EYEF basándose en picos espectrales de emisión observables (Xu, 1999; Wang, *et al* (1997) en *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, editores Hastings *et al* (Wiley, Nueva York), págs. 419-422). Para estudiar el emparejamiento potencial, se preparan fusiones de proteínas que contienen la proteína bioluminiscente seleccionada y la molécula aceptora y se someten a ensayo, en presencia de un sustrato apropiado.

Preferentemente, los marcadores donador y aceptor se unen a la proteína de membrana en el extremo N o en el extremo C de la proteína de membrana. Es probable que los marcadores unidos a los extremos tengan efectos mínimos sobre la estructura y la actividad de la proteína de membrana. Sin embargo, en principio, los marcadores pueden colocarse en otras regiones de la proteína de membrana a condición de que no impidan el plegamiento de la proteína de membrana y/o interfieran con su actividad. Las técnicas para evaluar el plegamiento y la actividad de las proteínas para permitir que el experto lo evalúe son prácticas habituales en la técnica.

Se prefiere que las proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda se marquen con los marcadores donador y aceptor de manera que los marcadores se unan covalentemente a la proteína de membrana, por ejemplo, en el extremo N o C de la proteína de membrana. Por ejemplo, la proteína de membrana en la primera población puede unirse covalentemente a un marcador donador y la proteína de membrana en la segunda población puede unirse covalentemente a un marcador aceptor, o la proteína de membrana en la primera población puede unirse covalentemente a un marcador aceptor y la proteína de membrana en la segunda población pueden unirse covalentemente a un marcador donador.

Se conocen bien en la materia técnicas para unir de forma covalente marcadores donadores y aceptores a proteínas y puede usarse cualquier método adecuado, incluyendo la conjugación química.

Por ejemplo, puede usarse el sistema Tag-lite™, comercializado por Cisbio [7, 8, 9]. En este caso, la proteína de membrana de interés se clona en un vector de expresión corriente arriba o corriente abajo de un marcador SNAP o CLIP. Los marcadores SNAP y CLIP son proteínas relacionadas que son formas modificadas de la O6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) de mamíferos. Los sustratos del marcador SNAP y del marcador CLIP son derivados de bencilpurinas y bencilpirimidinas, en los que el grupo bencilo está unido a un grupo funcional tal como un fluoróforo. Durante la reacción de marcaje, el grupo bencilo modificado reacciona con una cisteína libre en AGT y el grupo funcional se une covalentemente. La expresión de la proteína de membrana a partir de este plásmido da como resultado la producción de una proteína de membrana que tiene el marcador SNAP o CLIP en el extremo N o en el extremo C. Después, las proteínas de membrana pueden marcarse con lantánidos (tales como Terbio o Europio) que actúan como fluoróforos donadores. Por tanto, la proteína de membrana puede marcarse con un marcador donador o aceptor (por ejemplo, un fluoróforo donador o receptor) a través de un marcador terminal, por ejemplo, un marcador C-terminal o N-terminal, tal como los marcadores SNAP y CLIP que utilizan el sistema Tag-lite™. Se apreciará que para el marcaje correcto del extremo C, el sustrato del marcador SNAP o el marcador CLIP unido al grupo funcional (por ejemplo, fluoróforo) debe ser capaz de atravesar la membrana celular.

Para los marcadores donadores y aceptores que son polipéptidos (por ejemplo, GFP), se entenderá que los marcadores pueden unirse covalentemente a la proteína de membrana formando un polipéptido de fusión. La preparación de polipéptidos de fusión es una práctica habitual en la técnica y puede implicar una conjugación química o puede implicar una tecnología recombinante en la que la proteína de membrana marcada se exprese mediante un único polinucleótido.

En una realización alternativa, los marcadores donadores y aceptores pueden unirse a las proteínas de membrana no covalentemente, a condición de que la interacción no covalente sea lo suficientemente fuerte como para resistir el agente y/o condición moduladora de la estabilidad de la etapa (b). Dichas uniones no covalentes pueden incluir uniones inmunológicas o uniones tales como a través de biotina/avidina o estreptavidina. Si la interacción no covalente es suficientemente fuerte puede determinarse exponiendo la proteína de membrana marcada al agente y/o condición moduladora de la estabilidad y usando una técnica analítica apropiada para evaluar si el marcador permanece unido a la proteína de membrana después de la exposición.

Se apreciará que el marcador donador o el marcador aceptor pueden unirse a la membrana directa o indirectamente. Por "unido a la proteína de membrana directamente", se incluye el significado de que el marcador se une covalentemente o no covalentemente a la proteína de membrana. Por "unido a la proteína de membrana indirectamente", se incluye el significado de que el marcador se une covalentemente o no covalentemente a un resto adicional que, a su vez, se une covalentemente o no covalentemente a la proteína de membrana.

Después de la exposición al agente y/o condición moduladora de la estabilidad, el marcador donador se activa para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor y se evalúa el nivel de agregación. Por activar el marcador donador se incluye el significado de iniciar un proceso mediante el cual existe una interacción dependiente de la distancia entre los marcadores donador y aceptor. El proceso puede ser uno que dé como resultado la emisión por el donador de un fotón o la transferencia de energía a través de transferencia de energía de resonancia o algún otro método. Los ejemplos de activadores de donadores incluyen un fotón (como en el caso de un donador de TERF) o un sustrato de una proteína bioluminiscente (como en el caso de un donador de TERB). De

este modo, la activación del marcador donador puede comprender irradiar el marcador donador o exponer el marcador donador a una sustancia, de manera de conducir a una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor.

- 5 En una realización, puede ser deseable realizar también las etapas (a) y (c) del método sin realizar la etapa (b). Esto proporcionaría una indicación de agregación de fondo cuando la proteína de membrana no se expone a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad que puede compararse con el nivel de agregación cuando la proteína de membrana se expone a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad. En otras palabras, el ensayo puede ir precedido de una etapa en la que la agregación entre proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda se evalúa sin exposición a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un ensayo de evaluación de la estabilidad conformacional de una proteína de membrana, que comprende:

- 15 (a) proporcionar una muestra que comprende una población de proteínas de membrana, en la que la población de proteínas de membrana se proporciona en una forma solubilizada en la que las proteínas de membrana conservan su integridad estructural y están en una forma funcional,  
 (b) exponer la población de proteínas de membrana a un agente y/o condición de modulación de estabilidad,  
 (c) marcar uno de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana con un marcador donador y el otro de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana con un marcador aceptor,  
 20 (d) y evaluar la agregación de las proteínas de membrana en la población mediante la activación del marcador donador para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, interacción que produce una señal detectable.

- 25 En este ensayo, la agregación de la proteína de membrana se detecta en virtud de la incapacidad de los marcadores donadores y los marcadores aceptores para marcar los extremos de la proteína de membrana cuando se agregan. Cuando la proteína de membrana se agrega, los sitios de marcaje en la proteína de membrana se vuelven inaccesibles y, por tanto, los marcadores donador y aceptor no pueden estar próximos entre sí y, por tanto, no pueden generar una señal detectable. Si las proteínas de membrana son estables, existe menos agregación tras la exposición a un agente y/o condición desestabilizante y, por tanto, más señal, mientras que, si las proteínas de membrana son inestables, existe más agregación tras la exposición a un agente y/o condición desestabilizante y, por tanto, menos señal.

35 Las preferencias para la población de proteínas de membrana, el marcador donador y el marcador aceptor incluyen las que se han descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Convenientemente, uno de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana es susceptible de marcarse no covalentemente con un marcador donador y el otro de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana es susceptible de marcarse no covalentemente con un marcador aceptor. De este modo, la proteína de membrana puede diseñarse mediante ingeniería genética para que contenga un resto en el extremo N y/o C que sea capaz, directamente o indirectamente, de unirse al marcador donador o aceptor no covalentemente. Por ejemplo, el extremo N y/o el extremo C pueden contener un marcador, tal como un marcador c-Myc, reconocido por un anticuerpo que, a su vez, está marcado con el marcador donador o el marcador aceptor. De forma similar, el extremo N y/o el extremo C pueden contener un resto que es reconocido por un miembro de un par de compañeros de unión (por ejemplo, biotina y estreptavidina/avidina), estando marcado el otro miembro del par de compañeros de unión, a su vez, con el marcador donador o marcador aceptor. El ejemplo 1 ilustra este principio por el que un GPCR se marca en el extremo N-terminal con un péptido aceptor de biotina (BAP) y se marca en el extremo C-terminal con un marcador c-Myc. Después, el GPCR puede marcarse mediante la mezcla con estreptavidina marcada con d2 y anticuerpo anti-c-Myc marcado con terbio. Mediante el marcaje en los extremos, los marcadores no necesitan ser capaces de reconocer la estructura terciaria de la proteína de membrana y, por tanto, una pérdida de marcaje es una medida directa de la agregación de proteínas que no se sesga por cambios en los sitios de unión a ligandos o anticuerpos que no se correlacionan necesariamente con la agregación.

55 Se aprecia que uno de los extremos se marque antes de la etapa (b), a condición de que el marcaje pueda resistir el agente y/o condición moduladora de la estabilidad.

Preferentemente, el desnaturalizante/condición de desnaturalización se retira antes del marcaje de uno o ambos términos, de manera que se minimice el efecto adverso sobre el procedimiento de marcaje, como se describe adicionalmente a continuación.

60 Después de la exposición al agente y/o condición moduladora de la estabilidad, los extremos de la proteína de membrana se marcan. O bien el extremo N se marca con un marcador donador y el extremo C con un marcador aceptor o bien el extremo C se marca con un marcador donador y el extremo N con un marcador donador.

65 Se prefiere que la cantidad de marcador que se añade a la proteína de membrana sea una cantidad que proporcione la máxima señal de interacción dependiente de la distancia usando al mismo tiempo la menor cantidad de reactivos

- de marcaje. La cantidad puede determinarse fácilmente de forma empírica y generalmente dependerá de la elección del marcador y de los niveles de expresión de la proteína de membrana. La optimización de la cantidad puede implicar realizar una matriz de titulación de cantidades variables de marcadores aceptores y donadores, en un lisado que contenga la proteína de membrana de interés, así como un lisado simulado. La cantidad óptima es la que proporciona la mayor diferencia en la señal de interacción dependiente de la distancia (por ejemplo, la señal TERF) entre el lisado que contiene la proteína de membrana y el lisado simulado, a mismo tiempo que utiliza la menor cantidad de reactivos de marcaje. Los inventores han realizado dicha optimización para streptavidina-d2 y Myc-Tb e identificaron las concentraciones óptimas respectivas de 1 nM y 100 nM.
- 5
- 10 Después de la activación del marcador donador para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, se evalúa el nivel de agregación.
- En una realización, puede ser deseable realizar también las etapas (a) y (c) del método sin realizar la etapa (b). Esto proporcionaría una indicación de agregación de fondo cuando la proteína de membrana no se expone a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad que puede compararse con el nivel de agregación cuando la proteína de membrana se expone a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad. En otras palabras, el ensayo puede ir precedido de una etapa en la que la agregación entre proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda se evalúa sin exposición a un agente y/o condición moduladora de la estabilidad.
- 15
- 20 Se apreciará que la invención también proporciona una proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) en la que uno de entre el extremo N o el extremo C está unido a un marcador donador (por ejemplo, fluoróforo donador) y el otro de entre el extremo N o el extremo C está unido a un marcador aceptor (por ejemplo, fluoróforo aceptor). Por tanto, cualquier proteína de membrana marcada (por ejemplo, GPCR) que se use en el ensayo del segundo aspecto de la invención se incluye en el alcance de la invención. Las preferencias para las proteínas de membrana, el marcador donador y el marcador aceptor son como se han definido anteriormente. Por tanto, la proteína de membrana puede ser un GPCR que tiene el fluoróforo donador (por ejemplo, terbio) unido al extremo N y un fluoróforo donador (por ejemplo, EGFP) unido al extremo C. Se entenderá que la unión de los marcadores a los extremos de la proteína de membrana no necesita ser directa, sino que puede ser indirecta, por ejemplo, en virtud de que el marcador se une a un resto adicional, tal como un marcador terminal, que a su vez se une a la proteína de membrana. También se entenderá que los marcadores pueden unirse no covalentemente o covalentemente a los extremos de la proteína de membrana. La invención también proporciona el uso de una proteína de membrana de este tipo en un ensayo para medir la estabilidad conformacional de la proteína de membrana.
- 25
- 30
- El agente y/o condición moduladora de la estabilidad en los ensayos de la invención es un agente y/o condición de desnaturalización, por ejemplo, uno seleccionado entre uno o más de calor, pH, un detergente o un agente caotrópico. Se apreciará que puede usarse cualquier agente y/o condición de desnaturalización que se sepa que modula la estructura secundaria y terciaria de una proteína, pero no la estructura primaria de una proteína.
- 35
- En relación con la estabilidad al calor (es decir, la termoestabilidad), puede ser conveniente determinar una "cuasi  $T_m$ " o "cuasi  $T_{ag}$ ", es decir, la temperatura a la que el 50 % de la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) se agrega en condiciones establecidas después de la incubación durante un período de tiempo determinado (por ejemplo, 30 minutos). Las proteínas de membrana mutantes que tienen mayor termoestabilidad tienen una cuasi  $T_m$  o cuasi  $T_{ag}$  aumentada en comparación con sus progenitoras.
- 40
- 45 En relación con la estabilidad frente a un detergente o a un caotrópico, normalmente la proteína de membrana se incuba durante un tiempo definido en presencia de un detergente de ensayo o un agente caotrópico de ensayo y la estabilidad se determina usando un ensayo de la invención.
- En relación con un pH extremo, se elegiría un pH de ensayo normal (por ejemplo, en el intervalo de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el intervalo de 8,5 a 9,5 (pH alto).
- 50
- Debido a que se usan detergentes relativamente agresivos durante los procedimientos de cristalización, se prefiere que las proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) sean estables en presencia de dichos detergentes. El orden de "agresividad" de ciertos detergentes es DDM, maltósido o glucósido  $C_{11} \rightarrow C_{10} \rightarrow C_9 \rightarrow C_8$ , óxido de laurildimetilamina (LDAO) y SDS. Se prefiere en particular si la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) es más estable a cualquiera de maltósido o glucósido  $C_9$ , maltósido o glucósido  $C_8$ , LDAO y SDS y, por tanto, se prefiere que estos detergentes se usen para ensayos de estabilidad.
- 55
- Se apreciará que el calor actúa como la condición desestabilizante y éste puede retirarse fácilmente enfriando la muestra, por ejemplo, colocándola en hielo. Se cree que la termoestabilidad también puede ser una guía para la estabilidad frente a otros agentes y/o condiciones de desnaturalización o desestabilización. Por tanto, la termoestabilidad aumentada probablemente se traduzca en estabilidad en detergentes desestabilizantes, especialmente los que son más desestabilizantes que DDM, por ejemplo, los detergentes con un grupo de cabeza más pequeño y una cadena de alquilo más corta y/o con un grupo de cabeza cargado. Los inventores han descubierto que un GPCR termoestable también es más estable frente a detergentes agresivos, por ejemplo.
- 60
- 65

Cuando se usa un pH extremo como condición desestabilizante, se apreciará que esto puede retirarse rápidamente mediante la adición de un agente neutralizante. De forma similar, cuando se usa un caótropro como agente desestabilizante, el efecto desestabilizante puede retirarse mediante la dilución de la muestra por debajo de la concentración a la que el caótropro ejerce su efecto caótrópico.

5 Una ventaja considerable de los ensayos de la invención es que no es necesario que incluyan una etapa de separación para retirar el ligando marcado. Esta es una diferencia importante con respecto a los métodos conocidos de medición de la estabilidad de la proteína de membrana que implican el uso de un ligando radiomarcado. En dichos métodos conocidos, el radiomarcador no unido debe retirarse en una etapa de lavado anterior a la detección del radiomarcador. Esta etapa de separación hace que los métodos conocidos sean laboriosos e inadecuados para aplicaciones de alto rendimiento.

15 Aunque los ensayos de la invención no usan la unión a ligando como indicador de la estabilidad de una proteína de membrana, puede ser beneficioso incluir un ligando de la proteína de membrana en la muestra proporcionada en la etapa (a). La presencia de un ligando, especialmente cuando la proteína de membrana es un GPCR, puede mejorar la estabilidad y/o aumentar la probabilidad de estabilizar el GPCR en una conformación deseada. De manera similar, pueden enriquecerse estados conformacionales particulares variando parámetros fisicoquímicos o usando aditivos tales como cualquiera de entre pH, sal, iones metálicos, temperatura, agentes caótrópicos y glicerol. Pueden optimizarse parámetros fisicoquímicos para favorecer una conformación particular haciendo caracterizaciones farmacológicas convencionales tales como afinidades de unión a ligando o ensayos funcionales con diferentes parámetros.

Por "ligando" se incluye cualquier molécula que se una a una proteína de membrana tal como un GPCR.

25 Cuando la proteína de membrana es un GPCR, el ligando normalmente se unirá a una conformación del GPCR (y puede provocar que el GPCR adopte esta conformación), pero no se unirá tan fuertemente a otra conformación que el GPCR pueda ser capaz de adoptar. Por tanto, puede considerarse que la presencia del ligando estimula al GPCR a adoptar la conformación particular. Preferentemente, el ligando es de la clase agonista de ligandos y la conformación particular es una conformación agonista, o el ligando es de la clase antagonista de ligandos y la conformación particular es una conformación antagonista.

Se conocen muchos ligandos adecuados.

35 Normalmente, el ligando es un agonista completo y es capaz de unirse a la proteína de membrana (por ejemplo, un receptor tal como un GPCR) y es capaz de desencadenar una respuesta biológica completa (100 %), medida, por ejemplo, mediante acoplamiento a proteína G, eventos de señalización corriente abajo o un resultado fisiológico tal como vasodilatación. Por tanto, normalmente, la respuesta biológica es el intercambio GDP/GTP en una proteína G, seguido de la estimulación de la vía efectora unida. La medición, normalmente, es el intercambio GDP/GTP o un cambio en el nivel del producto final de la vía (por ejemplo, AMPc, GMPc o fosfatos de inositol). El ligando también puede ser un agonista parcial y es susceptible de unirse al GPCR y es capaz de desencadenar una respuesta biológica parcial (<100 %).

45 El ligando también puede ser un agonista inverso, que es una molécula que se une a una proteína de membrana (por ejemplo, un receptor tal como un GPCR) y reduce su actividad basal (es decir, no estimulada por agonista) a veces incluso a cero.

50 El ligando también puede ser un antagonista, que es una molécula que se une a una proteína de membrana (por ejemplo, un receptor tal como un GPCR) y bloquea la unión de un agonista, evitando, por tanto, una respuesta biológica. Los agonistas inversos y los agonistas parciales pueden ser antagonistas en ciertas condiciones de ensayo.

55 Los ligandos anteriores pueden ser ortostéricos, por los cuales se incluye el significado de que se combinan con el mismo sitio que el agonista endógeno; o pueden ser alostéricos o alotópicos, por los cuales se incluye el significado de que se combinan con un sitio distinto del sitio ortostérico. Los ligandos anteriores pueden ser sintópicos, por los cuales se incluye el significado de que interactúan con otro u otros ligandos en el mismo sitio o en uno solapado. Pueden ser reversibles o irreversibles.

60 En relación con los antagonistas, pueden ser superables, por los cuales se incluye el significado de que el efecto máximo del agonista no se reduce ya sea por el pretratamiento o por el tratamiento simultáneo con antagonista; o pueden ser insuperables, por los cuales se incluye el significado de que el efecto máximo del agonista se reduce ya sea por el pretratamiento o por el tratamiento simultáneo con antagonista; o pueden ser neutros, por los cuales se incluye el significado de que el antagonista es uno sin actividad agonista inversa o agonista parcial. Los antagonistas normalmente son también agonistas inversos.

65 Los ligandos para su uso en la invención también pueden ser moduladores alostéricos tales como moduladores alostéricos positivos, potenciadores, moduladores alostéricos negativos e inhibidores. Pueden tener actividad como

agonistas o agonistas inversos por sí mismos o pueden tener actividad solamente en presencia de un agonista o agonista inverso, en cuyo caso se usan en combinación con dichas moléculas con el fin de unirse a la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR).

5 Neubig *et al* (2003) *Pharmacol. Rev.* 55, 597-606, describe diversas clases de ligandos.

Preferentemente, los ligandos mencionados anteriormente son restos pequeños orgánicos o inorgánicos, pero pueden ser péptidos o polipéptidos. Normalmente, cuando el ligando es un resto pequeño orgánico o inorgánico, tiene una  $M_r$  de 50 a 2000, tal como de 100 a 1000, por ejemplo, de 100 a 500.

10 Normalmente, el ligando se une a la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR.) con una  $K_d$  de mM a pM, tal como en el intervalo de  $\mu\text{M}$  (micromolar) a nM. Generalmente, se prefieren los ligandos con la  $K_d$  más baja.

15 Se conocen bien en la técnica ligandos de molécula orgánica pequeña. Otros ligandos de molécula pequeña incluyen 5HT que es un agonista completo en el receptor 5HT1A; eltoprazina que es un agonista parcial en el receptor 5HT1A (véase Newman-Tancredi *et al* (1997) *Neuropharmacology* 36, 451-459); (+)-butaclamol y espiperona son agonistas inversos del receptor D2 de dopamina (véase Roberts y Strange (2005) *Br. J. Pharmacol.* 145, 34-42); y WIN55212-3 es un antagonista neutro de CB2 (Savinainen *et al* (2005) *Br. J. Pharmacol.* 145, 636-645).

20 El ligando puede ser un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un aptámero. Puede ser un ion tal como  $\text{Na}^+$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , un lípido tal como la oleamida o un hidrato de carbono tal como la heparina.

25 El ligando puede ser un polipéptido que se une a la proteína de membrana (por ejemplo, un receptor tal como un GPCR). Dichos polipéptidos (con los que se incluyen oligopéptidos) normalmente tienen una  $M_r$  de 500 a una  $M_r$  de 50.000, pero pueden ser más grandes. El polipéptido puede ser una proteína que interactúa con GPCR de origen natural u otra proteína que interactúa con el GPCR, o un derivado o fragmento de las mismas, a condición de que se una selectivamente al GPCR en una conformación particular. Las proteínas que interactúan con GPCR incluyen las asociadas a la señalización y las asociadas al tráfico, que con frecuencia actúan a través de dominios PDZ en la porción C terminal del GPCR.

35 Los polipéptidos que se sabe que se unen a ciertos GPCR incluyen cualquiera de una proteína G, una arrestina, una proteína RGS, una cinasa receptora de proteína G, una RAMP, una proteína 14-3-3, una NSF, una periplaquina, una espinofilina, una cinasa de GPCR, una tirosina cinasa receptora, un canal iónico o subunidad del mismo, una anquirina y una proteína Shanks u Homer. Otros polipéptidos incluyen las subunidades del receptor NMDA NR1 o NR2a, calcyon o una región marco conservada de fibronectina. El polipéptido puede ser uno que se una a un dominio extracelular de un GPCR, tal como fibulina-1. El polipéptido puede ser otro GPCR, que se une al GPCR seleccionado en un heterooligómero. Una revisión de las interacciones proteína-proteína en los GPCR se encuentra en Milligan y White (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 513-518 o en Bockaert *et al* (2004) *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 7, 649-657.

45 El ligando polipeptídico puede ser convenientemente un anticuerpo que se une a la proteína de membrana (por ejemplo, GPCR). Por el término "anticuerpo" se incluyen anticuerpos de origen natural, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. También se incluyen anticuerpos y moléculas modificados genéticamente que son similares a los anticuerpos en sus características de unión, incluyendo moléculas de cadena simple Fv (scFv) y anticuerpos de dominio (dAb). También se hace mención de anticuerpos de camélidos y anticuerpos de camélidos modificados genéticamente. Dichas moléculas que se unen a los GPCR se conocen en la técnica y, en cualquier caso, pueden fabricarse usando una tecnología bien conocida. Los anticuerpos adecuados incluyen los utilizados actualmente en radioinmunoensayo (RIA) para GPCR puesto que tienden a reconocer epítotos conformacionales.

50 El polipéptido también puede ser una proteína de unión basada en una región marco conservada modular, tal como proteínas de repetición de anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetratriopéptido o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) o proteínas a base de lipocalina o dominios de fibronectina o armazones de Afilina a base de ubiquitina gamma cristalina humana o humana.

55 Se apreciará que el uso de anticuerpos u otros polipéptidos de unión "universales" (tales como proteínas G que se sabe que se acoplan con muchos GPCR diferentes) puede ser en particular ventajoso en el uso del método en GPCR "huérfanos" para los cuales el ligando natural, y los ligandos de molécula pequeña, no se conocen.

60 Se apreciará que los ensayos anteriores pueden usarse en métodos para seleccionar proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) con estabilidad conformacional aumentada. Dichos métodos tienen la ventaja sobre los métodos existentes de que no existe necesidad de una etapa de separación para retirar el ligando marcado. Además, el método puede realizarse incluso cuando no esté disponible un buen radioligando con alta afinidad y/o propiedades favorables en el detergente.

65

En consecuencia, un tercer aspecto de la invención proporciona un método de selección de una proteína de membrana (por ejemplo, GPCR) con estabilidad conformacional aumentada, que comprende:

- 5 (a) comparar la estabilidad conformacional de uno o más mutantes de una proteína de membrana parental con la estabilidad conformacional de la proteína de membrana parental de acuerdo con el ensayo del primer o segundo aspecto de la invención, y  
 (b) seleccionar uno o más mutantes que tengan una estabilidad conformacional aumentada con respecto a la proteína de membrana parental.

10 Mediante la inclusión de un ligando en cualquier ensayo de la invención como se ha descrito anteriormente, el método del tercer aspecto de la invención puede considerarse una manera de seleccionar proteínas de membrana (por ejemplo, GPCR) que están atrapadas en una conformación de relevancia biológica (por ejemplo, estado de unión a ligando) y que son más estables con respecto a esa conformación. Preferentemente, el ligando es de la clase agonista de ligandos y la conformación particular es una conformación agonista, o el ligando es de la clase antagonista de ligandos y la conformación particular es una conformación antagonista.

15 Las proteínas de membrana mutantes (por ejemplo, GPCR) pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Convenientemente, la proteína mutante está codificada por una molécula de ácido nucleico adecuada y se expresa en una célula hospedadora adecuada. La preparación de moléculas de ácido nucleico, sistemas de expresión y células hospedadoras adecuados incluye los descritos anteriormente.

20 En una realización particular de la invención, la proteína de membrana es CCR5, el marcador donador es terbio y el marcador aceptor es EGFP. El terbio puede unirse al extremo N mediante el uso de la tecnología de marcador SNAP. El EGFP puede unirse al extremo C expresándose como una fusión C-terminal.

25 En una realización preferida adicional de la invención, la proteína de membrana es CCR5, el marcador donador es terbio y el marcador aceptor es d2. El terbio puede unirse no covalentemente al extremo C a través del marcaje de un anticuerpo anti-c-Myc que está unido a un epítipo c-Myc en el extremo C. d2 puede unirse no covalentemente al extremo N a través del marcaje de estreptavidina que está unida a biotina que a su vez se une al péptido aceptor de biotina (BAP) fusionado al extremo N.

30 En una realización particular de la invención, la proteína de membrana es un GPCR tal como cualquiera de GLP1R, CMKLR o TGR5 (GPBAR-I), el marcador donador es terbio y el marcador aceptor es EGFP. El terbio puede unirse al extremo N mediante el uso de tecnología de marcador SNAP. El EGFP puede estar unido al extremo C expresándose como una fusión C-terminal.

35 En una realización preferida adicional de la invención, la proteína de membrana es un GPCR tal como cualquiera de GLP1R, CMKLR o TGR5 (GPBAR-I), el marcador donador es terbio y el marcador aceptor es d2. El terbio puede unirse no covalentemente al extremo C a través del marcaje de un anticuerpo anti-c-Myc que está unido a un epítipo c-Myc en el extremo C. d2 puede unirse no covalentemente al extremo N a través del marcaje de estreptavidina que está unida a biotina que a su vez se une al péptido aceptor de biotina (BAP) fusionado al extremo N.

40 La invención se describirá ahora con la ayuda de las siguientes Figuras y Ejemplos:

45 **Figura 1:** (a) Principio del ensayo de agregación intermolecular. Se solubilizan y purifican receptores marcados con terbio o marcados con EGFP. Las muestras mixtas 1:1 se calientan y se mide la TERF. (b) Un ejemplo de estabilidades del receptor medidas usando este ensayo, los valores denotan Tagg.

50 **Figura 2:** (a) Principio del ensayo de agregación intramolecular. Los receptores biotinilados *in vivo* se solubilizan y se incuban a diferentes temperaturas. Después, los lisados se mezclan con estreptavidina marcada con d2 y anticuerpo anti-cMyc marcado con terbio y se mide la TERF. Tras la agregación inducida por calor, los niveles de TERF se reducen debido a la inaccesibilidad de los sitios para marcar el receptor. (b) Un ejemplo de estabilidades del receptor medidas usando este ensayo, los valores denotan Tagg. U representa los valores de TERF medidos en lisados preparados a partir de células transfectadas simuladas. La relación de TERF representa la emisión a 650 nm normalizada a la emisión a 620 nm.

55 **Figura 3:** Estabilidad de GLP1R de tipo silvestre y mutante (T355F) medida usando el ensayo de agregación intramolecular. Se coexpresaron construcciones de GLP1R de tipo silvestre y T355F (ambas marcadas con BAP en el extremo N y marcadas con c-Myc en el extremo C) en células HEK293T con BirA. Después de la solubilización en DDM al 1 %, las muestras se incubaron a diferentes temperaturas durante 30 minutos. La TERF se midió después de la adición de estreptavidina marcada con d2 y anticuerpo anti-cMyc marcado con terbio.

60

**Ejemplo 1: Metodología para la estabilización del receptor**

El método convencional de los inventores para la estabilización del receptor usa la unión del ligando para medir los niveles del receptor activo. En resumen, los receptores solubilizados que se han incubado con un ligando radiomarcado se calientan a diferentes temperaturas durante una cantidad de tiempo fijada. A continuación, el ligando en exceso y no unido se separa del ligando unido al receptor y se mide el nivel residual de radioactividad. La representación de estos datos frente a la temperatura proporciona una curva de disminución térmica y el valor de  $T_m$  se define como la temperatura a la que se conserva el 50 % de la actividad del receptor. Obviamente, este método se basa en la disponibilidad de un buen radioligando con una alta afinidad y propiedades favorables en detergente. Por tanto, ha existido la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitieran a los inventores estabilizar los receptores en casos en los que un ligando de este tipo no estuviera disponible. Los inventores se refieren a estas metodologías como métodos dependientes de ligando, lo que significa que no se usa la capacidad de unión a ligando del receptor para medir la actividad del receptor, aunque el ligando puede estar presente para aumentar la estabilidad o aumentar la probabilidad de estabilizar el receptor en la conformación deseada.

*Ensayo de agregación intermolecular*

La agregación de proteínas tras el desplegamiento es una característica general de todas las proteínas que se produce en diversos grados en diferentes proteínas. Se sabe que las proteínas de membrana presentan altos niveles de agregación después de la solubilización y más después de la desnaturalización. Por tanto, es posible usar los niveles de agregación como una medida de estabilidad global.

Un ensayo que permita medir la agregación en un formato fácil y miniaturizable sería una herramienta útil para generar un receptor estable. Existen varias formas diferentes de medir la agregación, incluyendo los métodos biofísicos que se han descrito anteriormente. La mayoría de estos métodos requiere altas cantidades de proteína muy pura.

Los inventores han desarrollado un método que permite medir la agregación del receptor a partir de pequeñas cantidades de preparaciones semipurificadas. Con el fin de medir la agregación del receptor usando este ensayo, se marcan dos poblaciones del receptor ya sea con un grupo aceptor de TERF o un grupo donador de TERF (Figura 1a). Los inventores han usado la tecnología de marcador SNAP para marcar los receptores en el extremo N-terminal con terbio que actúa como el donador de TERF. El aceptor de TERF es EGFP que se expresa como una fusión C-terminal. Estas dos poblaciones del receptor se expresan, se solubilizan y se purifican parcialmente por separado. Las preparaciones semipuras de los dos conjuntos se mezclan en una relación 1:1 y la mezcla se incuba a diferentes temperaturas durante un período de tiempo determinado. A medida que los receptores se despliegan y se forman agregados, el aceptor y el donador de TERF se acercan lo que da como resultado la emisión de TERF. El aumento de TERF se representa frente a la temperatura y la temperatura a la que se observa el 50 % de TERF se define como  $T_{agg}$  (Figura 1b).

*Ensayo de agregación intramolecular*

Este ensayo es una variación del método anterior. En este ensayo, el aceptor y el donador de TERF se colocan en los extremos N y C de la misma molécula receptora. Sin embargo, de manera importante, el receptor se solubiliza y se calienta antes del marcaje con el receptor y el donador de TERF. Por tanto, a medida que el receptor se despliega y se agrega los sitios de marcaje del receptor y el donador de TERF se ocultan y, por tanto, se vuelven inaccesibles. Esto, a su vez, da como resultado la pérdida de TERF en función de la temperatura y la  $T_{agg}$  se define como la temperatura a la que se observa el 50 % de TERF (Figura 2a). En este ejemplo, el receptor se marca en el extremo N-terminal con un péptido aceptor de biotina (BAP) y se marca en el extremo C-terminal con el marcador cMyc. El receptor se coexpresa con la enzima biotina ligasa A (BirA) lo que conduce a la expresión de un receptor biotinilado en el extremo N-terminal. Después de la solubilización, el lisado en bruto se incuba a diferentes temperaturas durante un tiempo determinado. Después, los lisados se mezclan con estreptavidina marcada con d2 y anticuerpo anti-cMyc marcado con terbio. Después, los niveles de TERF se miden y se representan frente a la temperatura (Figura 2b).

Con el fin de observar si este método era capaz de identificar mutaciones termoestabilizantes, se generaron varios mutantes en el plásmido que codificaba GLP1R usando mutagénesis dirigida al sitio. Después se usó el ensayo de agregación intramolecular para evaluar la estabilidad térmica de los mutantes en comparación con GLP1R de tipo silvestre. La Figura 3 muestra datos de ejemplo para la mutación T355F que confiere un aumento de  $\sim 6$  °C en la estabilidad térmica de GLP1R. Como se observa en la figura, el valor de  $T_{agg}$  para el GLP1R mutante estabilizado es mayor que el del GLP1R de tipo silvestre.

**Materiales y métodos***Expresión del receptor*

En todos los casos descritos, los receptores se expresaron transitoriamente en células HEK293T. En resumen, las células se sembraron a la densidad de  $3 \times 10^6$  células en placas de Petri de 10 cm que contenían medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y se incubaron durante la noche en incubadora a 37 °C. Al día siguiente, las células se transfectaron usando 6 ug de plásmido que codificaba el receptor de interés usando GeneJuice de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante aproximadamente 40 horas después de la transfección en la incubadora a 37 °C.

*Solubilización del receptor*

Después de la transfección, las células se recogieron en solución salina tamponada con fosfato y se lavaron una vez en el mismo tampón. Después, las células se solubilizaron en 1 ml en total de tampón de solubilización que contenía ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico 50 mM (HEPES) y cloruro de sodio 150 mM ajustado a pH 7,5, complementado con n-dodecil-β-maltósido al 1 % (DDM) y cóctel inhibidor de proteasa. Los receptores se solubilizaron durante 1 hora con rotación de extremo a extremo. Todas las etapas de solubilización, así como las etapas posteriores, se realizaron a 4 °C.

*Análisis de agregación intermolecular*

Se expresaron receptores marcados con SNAP y marcados con EGFP por separado en células HEK293T como se ha descrito anteriormente. Antes de la solubilización, los receptores marcados con SNAP se recogieron y se resuspendieron en DMEM más FBS que contenía 250 nM de SNAP-Lumi4Tb (Cisbio) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C para marcar el extremo N. Después, las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS para retirar el exceso de SNAP-Lumi4Tb sin unir. Después del último lavado, las células se solubilizaron en paralelo junto con células que expresaban el receptor marcado con EGFP en DDM al 1 %. Los lisados en bruto se clarificaron mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los lisados clarificados se incubaron con 250 ul de suspensión al 50 % de resina de Ni-NTA agarosa preequilibrada en el tampón de solubilización con el fin de purificar los receptores usando el marcador His 10x C-terminal. La mezcla se incubó a 4 °C con rotación de extremo a extremo durante 1,5 horas y después se lavó 3 veces con 1 ml de tampón de lavado enfriado que contenía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, DDM al 0,03 %, imidazol 20 mM, pH ajustado a 7,5. Después del último lavado los receptores se eluyeron en 500 ul de tampón de elución que contenía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, DDM al 0,03 % e Histidina 100 mM, pH ajustado a 7,5. Las muestras marcadas con Lumi4Tb y marcadas con EGFP se mezclaron 1:1 y se incubaron alícuotas a temperaturas crecientes durante 30 minutos. Después, las muestras volvieron a poner a 4 °C y se transfirieron a placas de color blanco de 96 pocillos y se midió la TERF entre Lumi4Tb y EGFP usando el instrumento PHERAstar Plus (BMG Labtech). Los ajustes de la TERF se fijaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

*Ensayo de agregación intramolecular*

Se expresaron transitoriamente receptores marcados en el extremo N-terminal con el marcador aceptor de biotina (BAP) y en el extremo C-terminal con el marcador c-Myc en células HEK293T como se ha descrito anteriormente. Es notable que el plásmido también codifica la enzima BirA que media la biotinilación en el marcador BAP. Las células se incubaron con 100 μM de biotina durante la expresión. Después de la recogida y la solubilización, se incubaron alícuotas de lisados clarificados a temperaturas crecientes durante 30 minutos. Las muestras se enfriaron a 4 °C y se añadieron 20 ul de cada muestra a 20 ul de mezcla de TERF dividida anteriormente en alícuotas en una placa de color blanco de 384 pocillos que contenía anticuerpo anti-cMyc 2 nM conjugado con terbio (Cisbio) y estreptavidina 200 nM conjugada con fluoróforo d2 (Cisbio) La placa se incubó durante la noche a 4 °C antes de la medición de la señal TERF en PHERAstar Plus de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

**Tabla A**

| Nombre oficial IUPHAR | Nombre del gen humano | Nombre del gen de rata | Nombre del gen de ratón |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 5HT1a                 | HTR1A                 | Htr1a                  | Htr1a                   |
| 5HT2A                 | HTR2A                 | Htr2a                  | Htr2a                   |
| 5HT2C                 | HTR2C                 | Htr2c                  | Htr2c                   |
| 5HT6                  | HTR6                  | Htr6                   | Htr6                    |
| 5HT7                  | HTR7                  | Htr7                   | Htr7                    |
| M1                    | CHRM1                 | Chrm1                  | Chrm1                   |
| M2                    | CHRM2                 | Chrm2                  | Chrm2                   |
| M3                    | CHRM3                 | Chrm3                  | Chrm3                   |
| M4                    | CHRM4                 | Chrm4                  | Chrm4                   |
| M5                    | CHRM5                 | Chrm5                  | Chrm5                   |
| C3a                   | C3AR1                 | C3ar1                  | C3ar1                   |
| C5a                   | C5R1                  | C5r1                   | C5r1                    |
| C5L2                  | GPR77                 | Gpr77                  | Gpr77                   |
| AT1                   | AGTR1                 | Agtr1b                 | Agtr1b                  |

ES 2 676 827 T3

| Nombre oficial IUPHAR | Nombre del gen humano | Nombre del gen de rata | Nombre del gen de ratón |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| APJ                   | AGTRL1                | Agtrl1                 | Agtrl1                  |
| GPBA                  | GPBAR1                | Gpbar1                 | Gpbar1                  |
| BB1                   | NMBR                  | Nmbr                   | Nmbr                    |
| BB2                   | GRPR                  | Grpr                   | Grpr                    |
| BB3                   | BRS3                  | Brs3                   | Brs3                    |
| BK1                   | BDKRB1                | Bdkrb1                 | Bdkrb1                  |
| BK2                   | BDKRB2                | Bdkrb2                 | Bdkrb2                  |
| CB1                   | CNR1                  | Cnr1                   | Cnr1                    |
| CB2                   | CNR2                  | Cnr2                   | Cnr2                    |
| CCR1                  | CCR1                  | Ccr1                   | Ccr1                    |
| CCR2                  | CCR2                  | Ccr2                   | Ccr2                    |
| CCR3                  | CCR3                  | Ccr3                   | Ccr3                    |
| CCR4                  | CCR4                  | Ccr4                   | Ccr4                    |
| CCR5                  | CCR5                  | Ccr5                   | Ccr5                    |
| CCR6                  | CCR6                  | Ccr6                   | Ccr6                    |
| CCR7                  | CCR7                  | CCR7                   | CCR7                    |
| CCR8                  | CCR8                  | Ccr8                   | Ccr8                    |
| CCR9                  | CCR9                  | Ccr9                   | Ccr9                    |
| CCR10                 | CCR10                 | Gpr2                   | Gpr2                    |
| CXCR1                 | IL8RA                 | Il8ra                  | Il8ra                   |
| CXCR2                 | IL8RB                 | Il8rb                  | Il8rb                   |
| CXCR3                 | CXCR3                 | Cxcr3                  | Cxcr3                   |
| CXCR4                 | CXCR4                 | Cxcr4                  | Cxcr4                   |
| CXCR5                 | CXCR5                 | Blr1                   | Blr1                    |
| CXCR6                 | CXCR6                 | Cxcr6                  | Cxcr6                   |
| CX3CR1                | CX3CR1                | Cx3cr1                 | Cx3cr1                  |
| XCR1                  | XCR1                  | Xcr1                   | Xcr1                    |
| DRD1                  | DRD1                  | Drd1a                  | Drd1a                   |
| DRD2                  | DRD 2                 | Drd2                   | Drd2                    |
| DRD3                  | DRD3                  | Drd3                   | Drd3                    |
| DRD4                  | DRD4                  | Drd4                   | Drd4                    |
| DRD5                  | DRD5                  | Drd5                   | Drd5                    |
| GPBR                  | GPBR                  | Gpr30                  | Gper                    |
| FPR1                  | FPR1                  | Fpr1                   | Fpr1                    |
| FPR2/ALX              | FPR2                  | Fpr2                   | Fpr2                    |
| FPR3                  | FPR3                  | Fpr3                   | Fpr3                    |
| FFA1                  | FFAR1                 | Ffar1                  | Ffar1                   |
| FFA2                  | FFAR2                 | Gpr43                  | Ffar2                   |
| FFA3                  | FFAR3                 | Ffar3                  | Ffar3                   |
| GALR1                 | GALR1                 | Galr1                  | Galr1                   |
| GALR2                 | GALR2                 | Galr2                  | Galr2                   |
| GALR3                 | GALR3                 | Galr3                  | Galr3                   |
| grelina               | GHSR                  | Ghsr                   | Ghsr                    |
| FSH                   | FSHR                  | Fshr                   | Fshr                    |
| LH                    | LHCGR                 | Lhcgr                  | Lhcgr                   |
| GnRH                  | GNRHR                 | Gnrhr                  | Gnrhr                   |
| GnRH2                 | GNRHR2                |                        |                         |
| KISS1                 | KISS1R                | Kiss1r                 | Kisslr                  |
| OXE                   | OXER1                 |                        |                         |
| FPR2/ALX              | FPR2                  | Fpr2                   | Fpr2                    |
| LPAR1                 | LPAR1                 | Lpar1                  | Lpar1                   |
| LPAR2                 | LPAR2                 | Lpar2                  | Lpar2                   |
| LPAR3                 | LPAR3                 | Lpar3                  | Lpar3                   |
| S1PR1                 | S1PR1                 | S1pr1                  | S1pr1                   |
| S1PR2                 | S1PR2                 | S1pr2                  | S1pr2                   |
| S1PR3                 | S1PR3                 | S1pr3                  | S1pr3                   |

ES 2 676 827 T3

| Nombre oficial IUPHAR     | Nombre del gen humano | Nombre del gen de rata | Nombre del gen de ratón |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| S1PR4                     | S1PR4                 | S1pr4                  | S1pr4                   |
| S1PR5                     | S1PR5                 | S1pr5                  | S1pr5                   |
| MCHR1                     | MCHR1                 | Mchr1                  | Mchr1                   |
| MCHR2                     | MCHR2                 |                        |                         |
| MC1R                      | MC1R                  | Mc1r                   | Mc1r                    |
| MC2R                      | MC2R                  | Mc2r                   | Mc2r                    |
| MC3R                      | MC3R                  | Mc3r                   | Mc3r                    |
| MC4R                      | MC4R                  | Mc4r                   | Mc4r                    |
| MC5R                      | MC5R                  | Mc5r                   | Mc5r                    |
| MTNR1A                    | MTNR1A                | Mtnr1a                 | Mtnr1a                  |
| MTNR1B                    | MTNR1B                | Mtnr1b                 | Mtnr1b                  |
| NMU1                      | NMUR1                 | Nmur1                  | Nmur1                   |
| NMU2                      | NMUR2                 | Nmur2                  | Nmur2                   |
| NPFF1                     | NPFFR1                | Npffr1                 |                         |
| NPFF2                     | NPFFR2                | Npffr2                 | Npffr2                  |
| NPS                       | NPSR1                 | Npsr1                  | Npsr1                   |
| NPBW1                     | NPBWR1                | Npbwr1                 | Npbwr1                  |
| NPBW2                     | NPBWR2                |                        |                         |
| NPY1                      | NPY1R                 | Npy1r                  | Npy1r                   |
| NPY2R                     | NPY2R                 | Npy2r                  | Npy2r                   |
| PPYR1                     | PPYR1                 | Ppyr1                  | Ppyr1                   |
| NPY5R                     | NPY5R                 | Npy5r                  | Npy5r                   |
| NTSR1                     | NTSR1                 | Ntsr                   | Ntsr                    |
| NTSR2                     | NTSR2                 | Ntsr2                  | Ntsr2                   |
| GPR81 (nombre temporal)   | GPR81                 | Gpr81                  | Gpr81                   |
| GPR109A (nombre temporal) | GPR109A               | Gpr109a                | Gpr109a                 |
| GPR109B (nombre temporal) | GPR109B               |                        |                         |
| Delta                     | OPRD1                 | Oprd1                  | Oprd1                   |
| Kappa                     | OPRK1                 | Oprk1                  | Oprk1                   |
| Mu                        | OPRM1                 | Oprm1                  | Oprm1                   |
| NOP                       | OPRL1                 | Opr1                   | Opr1                    |
| OX1                       | HCRTR1                | Hctr1                  | Hctr1                   |
| OX2                       | HCRTR2                | Hctr2                  | Hctr2                   |
| P2RY2                     | P2RY2                 | P2ry2                  | P2ry2                   |
| P2RY11                    | P2RY11                |                        |                         |
| P2RY12                    | P2RY12                | P2ry12                 | P2ry12                  |
| PROKR1                    | PROKR1                | Prokr1                 | Prokr1                  |
| PROKR2                    | PROKR2                | Prokr2                 | Prokr2                  |
| PRRP                      | PRLHR                 | Prhr                   | Prhr                    |
| PAR1                      | F2R                   | F2r                    | F2r                     |
| PAR2                      | F2RL1                 | F2rl1                  | F2rl1                   |
| RXFP1                     | RXFP1                 | Rxfp1                  | Rxfp1                   |
| RXFP2                     | RXFP2                 | Rxfp2                  | Rxfp2                   |
| RXFP3                     | RXFP3                 | Rxfp3                  | Rxfp3                   |
| RXFP4                     | RXFP4                 |                        | Rxfp4                   |
| SSTR1                     | SSTR1                 | Sstr1                  | Sstr1                   |
| SSTR2                     | SSTR2                 | Sstr2                  | Sstr2                   |
| SSTR5                     | SSTR5                 | Sstr5                  | Sstr5                   |
| V1A                       | AVPR1A                | Avpr1a                 | Avpr1a                  |
| V1B                       | AVPR1B                | Avpr1b                 | Avpr1b                  |
| V2                        | AVPR2                 | Avpr2                  | Avpr2                   |
| CCRL2                     | CCRL2                 | Ccrl2                  | Ccrl2                   |
| CMKLR1                    | CMKLR1                | Cmklr1                 | Cmklr1                  |
| CMKOR1                    | CMKOR1                | Rdc1                   | Cmkor1                  |
| CT                        | CALCR                 | Calcr                  | Calcr                   |

| <b>Nombre oficial IUPHAR</b> | <b>Nombre del gen humano</b> | <b>Nombre del gen de rata</b> | <b>Nombre del gen de ratón</b> |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| CALCRL                       | CALCRL                       | Calclrl                       | Calclrl                        |
| CRF1                         | CRHR1                        | Crhr1                         | Crhr1                          |
| CRF2                         | CRHR2                        | Crhr2                         | Crhr2                          |
| GHRH                         | GHRHR                        | Ghrhr                         | Ghrhr                          |
| GIP                          | GIPR                         | Gipr                          | Gipr                           |
| GLP-1                        | GLP1R                        | Glp1r                         | Glp1r                          |
| GLP-2                        | GLP2R                        | Glp2r                         | Glp2r                          |
| glucagón<br>secretina        | GCGR                         | Gcgr                          | Gcgr                           |
| PTH1                         | SCTR                         | Sctr                          | Sctr                           |
| PTH2                         | PTH1R                        | Pth1r                         | Pth1r                          |
| PAC1                         | PTHR2                        | Pthr2                         | Pthr2                          |
| VPAC1                        | ADCYAP1R1                    | Adcyap1r1                     | Adcyap1r1                      |
| VPAC2                        | VIPR1                        | Vipr1                         | Vipr1                          |
| CaS                          | VIPR2                        | Vipr2                         | Vipr2                          |
| GABBR1                       | CASR                         | Casr                          | Casr                           |
| GABBR2                       | GABBR1                       | Gabbr1                        | Gabbr1                         |
| mGluR1                       | GABBR2                       | Gabbr2                        | Gabbr2                         |
| mGluR2                       | GRM1                         | Grm1                          | Grm1                           |
| mGluR3                       | GRM2                         | Grm2                          | Grm2                           |
| mGluR4                       | GRM3                         | Grm3                          | Grm3                           |
| mGluR5                       | GRM4                         | Grm4                          | Grm4                           |
| mGluR6                       | GRM5                         | Grm5                          | Grm5                           |
| mGluR7                       | GRM6                         | Grm6                          | Grm6                           |
| mGluR8                       | GRM7                         | Grm7                          | Grm7                           |
|                              | GRM8                         | Grm8                          | Grm8                           |

**Tabla B**

| <b>Nombre oficial IUPHAR</b> | <b>Nombre del gen humano</b> | <b>Nombre del gen de rata</b> | <b>Nombre del gen de ratón</b> |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| CCRL2                        | CCRL2                        | Ccrl2                         | Ccrl2                          |
| CMKLR1                       | CMKLR1                       | Cmklr1                        | Cmklr1                         |
| CMKOR1                       | CMKOR1                       | Rdc1                          | Cmkor1                         |
| EBI2                         | GPR183                       | Gpr183                        | Gpr183                         |
| GPR1                         | GPR1                         | Gpr1                          | Gpr1                           |
| GPR3                         | GPR3                         | Gpr3                          | Gpr3                           |
| GPR4                         | GPR4                         | Gpr4                          | Gpr4                           |
| GPR6                         | GPR6                         | Gpr6                          | Gpr6                           |
| GPR12                        | GPR12                        | Gpcr12                        | Gpr12                          |
| GPR15                        | GPR15                        | Gpr15                         | Gpr15                          |
| GPR17                        | GPR17                        | Gpr17                         | Gpr17                          |
| GPR18                        | GPR18                        | Gpr18                         | Gpr18                          |
| GPR19                        | GPR19                        | Gpr19                         | Gpr19                          |
| GPR20                        | GPR20                        | Gpr20                         | Gpr20                          |
| GPR21                        | GPR21                        | Gpr21                         | Gpr21                          |
| GPR22                        | GPR22                        | Gpr22                         | Gpr22                          |
| GPR23                        | GPR23                        | Gpr23_predicho                | Gpr23                          |
| GPR25                        | GPR25                        | Gpr25                         | Gpr25                          |
| GPR26                        | GPR26                        | Gpr26                         | Gpr26                          |
| GPR27                        | GPR27                        | Gpr27                         | Gpr27                          |
| GPR31                        | GPR31                        | Gpr31                         | Gpr31c                         |
| GPR32                        | GPR32                        |                               |                                |
| GPR34                        | GPR34                        | Gpr34                         | Gpr34                          |
| GPR35                        | GPR35                        | Gpr35                         | Gpr35                          |
| GPR37                        | GPR37                        | Gpr37                         | Gpr37                          |
| GPR37L1                      | GPR37L1                      | Gpr37l1                       | Gpr37l1                        |
| GPR39                        | GPR39                        | Gpr39                         | Gpr39                          |
| GPR45                        | GPR45                        | Gpr45                         | Gpr45                          |
| GPR50                        | GPR50                        | Gpr50                         | Gpr50                          |

ES 2 676 827 T3

| Nombre oficial IUPHAR | Nombre del gen humano | Nombre del gen de rata | Nombre del gen de ratón |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| GPR52                 | GPR52                 | Gpr52                  | Gpr52                   |
| GPR55                 | GPR55                 | Gpr55                  | Gpr55                   |
| GPR61                 | GPR61                 | Gpr61                  | Gpr61                   |
| GPR62                 | GPR62                 | RGD1560166             | Gpr62                   |
| GPR63                 | GPR63                 | Gpr63                  | Gpr63                   |
| GPR65                 | GPR65                 | Gpr65                  | Gpr65                   |
| GPR68                 | GPR68                 | Gpr68                  | Gpr68                   |
| GPR75                 | GPR75                 | Gpr75                  | Gpr75                   |
| GPR78                 | GPR78                 |                        |                         |
| GPR82                 | GPR82                 |                        | Gpr82                   |
| GPR83                 | GPR83                 | Gpr83                  | Gpr83                   |
| GPR84                 | GPR84                 | Gpr84                  | Gpr84                   |
| GPR85                 | GPR85                 | Gpr85                  | Gpr85                   |
| GPR87                 | GPR87                 | Gpr87                  | Gpr87                   |
| GPR88                 | GPR88                 | Gpr88                  | Gpr88                   |
| GPR92                 | GPR92                 | RGD1562580_Predicho    | Gpr92                   |
| GPR101                | GPR101                | Gpr101                 | Gpr101                  |
| GPR119                | GPR119                | Gpr119                 | Gpr119                  |
| GPR120                | GPR120                | Gpr120                 | Gpr120                  |
| GPR132                | GPR132                | Gpr132                 | Gpr132                  |
| GPR135                | GPR135                | Gpr135                 | Gpr135                  |
| GPR139                | GPR139                | Gpr139                 | Gpr139                  |
| GPR141                | GPR141                | Gpr141                 | Gpr141                  |
| GPR142                | GPR142                | Gpr142                 | Gpr142                  |
| GPR146                | GPR146                | Gpr146                 | Gpr146                  |
| GPR148                | GPR148                |                        |                         |
| GPR149                | GPR149                | Gpr149                 | Gpr149                  |
| GPR150                | GPR150                | Gpr150                 | Gpr150                  |
| GPR151                | GPR151                | Gpr151                 | Gpr151                  |
| GPR152                | GPR152                | Gpr152                 | Gpr152                  |
| GPR153                | GPR153                | Gpr153                 | Gpr153                  |
| GPR160                | GPR160                | Gpr160                 | Gpr160                  |
| GPR161                | GPR161                | RGD1563245             | Gpr161                  |
| GPR162                | GPR162                | Gpr162                 | Gpr162                  |
| GPR171                | GPR171                | Gpr171                 | Gpr171                  |
| GPR173                | GPR173                | Gpr173                 | Gpr173                  |
| GPR174                | GPR174                | Gpr174                 | Gpr174                  |
| GPR182                | GPR182                | Gpr182                 | Gpr182                  |
| LGR4                  | LGR4                  | Lgr4                   | Lgr4                    |
| LGR5                  | LGR5                  | Lgr5                   | Lgr5                    |
| LGR6                  | LGR6                  | Lgr6                   | Lgr6                    |
| MAS1                  | MAS1                  | Mas1                   | Mas1                    |
| MAS1L                 | MAS1L                 |                        |                         |
| MRGPRD                | MRGPRD                | Mrgprd                 | Mrgprd                  |
| MRGPRE                | MRGPRE                | Mrgpre                 | Mrgpre                  |
| MRGPRF                | MRGPRF                | Mrgprf                 | Mrgprf                  |
| MRGPRG                | MRGPRG                | Mrgprg                 | Mrgprg                  |
| MRGPRX1               | MRGPRX1               | Mrgprx1                | Mrgprx1                 |
| MRGPRX2               | MRGPRX2               | Mrgprx2                | Mrgprx2                 |
| MRGPRX3               | MRGPRX3               | Mrga10                 | Mrgpra9                 |
| MRGPRX4               | MRGPRX4               |                        |                         |
| OPN3                  | OPN3                  | Opn3                   | Opn3                    |
| OPN5                  | OPN5                  | Opn5                   | Opn5                    |
| OXGR1                 | OXGR1                 | Oxgr1                  | Oxgr1                   |
| P2RY5                 | P2RY5                 | P2ry5                  | P2ry5                   |
| P2RY8                 | P2RY8                 |                        |                         |

| Nombre oficial IUPHAR | Nombre del gen humano | Nombre del gen de rata | Nombre del gen de ratón |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| P2RY10                | P2RY10                | P2ry10                 | P2ry10                  |
| SUCNR1                | SUCNR1                | Sucnr1                 | Sucnr1                  |
| TAAR2                 | TAAR2                 | Taar2                  | Taar2                   |
| TAAR5                 | TAAR5                 | Taar5                  | Taar5                   |
| TAAR6                 | TAAR6                 | Taar6                  | Taar6                   |
| TAAR8                 | TAAR8                 | Taar8a                 | Taar8a                  |
| TAAR9                 | TAAR9                 | Taar9                  | Taar9                   |
| BAI1                  | BAI1                  | Bai1                   | Bai1                    |
| BAI2                  | BAI2                  | Bai2                   | Bai2                    |
| BAI3                  | BAI3                  | Bai3                   | Bai3                    |
| CD97                  | CD97                  | Cd97                   | Cd97                    |
| CELSR1                | CELSR1                | Celsr1                 | Celsr1                  |
| CELSR2                | CELSR2                | Celsr2                 | Celsr2                  |
| CELSR3                | CELSR3                | Celsr3                 | Celsr3                  |
| ELTD1                 | ELTD1                 | Elt1                   | Elt1                    |
| EMR1                  | EMR1                  | Emr1                   | Emr1                    |
| EMR2                  | EMR2                  |                        |                         |
| EMR3                  | EMR3                  |                        |                         |
| GPR56                 | GPR56                 | Gpr56                  | Gpr56                   |
| GPR64                 | GPR64                 | Gpr64                  | Gpr64                   |
| GPR97                 | GPR97                 | Gpr97                  | Gpr97                   |
| GPR98                 | GPR98                 | Gpr98                  | Gpr98                   |
| GPR110                | GPR110                | Gpr110                 | Gpr110                  |
| GPR111                | GPR111                |                        | Gpr111                  |
| GPR112                | GPR112                | Gpr112                 | Gpr112                  |
| GPR113                | GPR113                | Gpr113                 | Gpr113                  |
| GPR114                | GPR114                | Gpr114                 | Gpr114                  |
| GPR115                | GPR115                | Gpr115                 | Gpr115                  |
| GPR116                | GPR116                | Gpr116                 | Gpr116                  |
| GPR123                | GPR123                | Gpr123                 | Gpr123                  |
| GPR124                | GPR124                | Gpr124                 | Gpr124                  |
| GPR125                | GPR125                | Gpr125                 | Gpr125                  |
| GPR126                | GPR126                | Gpr126                 | Gpr126                  |
| GPR128                | GPR128                | Gpr128                 | Gpr128                  |
| GPR133                | GPR133                |                        | Gpr133                  |
| GPR143                | GPR143                | Gpr143                 | Gpr143                  |
| GPR144                | GPR144                |                        | Gpr144                  |
| GPR157                | GPR157                | Gpr157                 | Gpr157                  |
| LPHN1                 | LPHN1                 | Lphn1                  | Lphn1                   |
| LPHN2                 | LPHN2                 | Lphn2                  | Lphn2                   |
| LPHN3                 | LPHN3                 | Lphn3                  | Lphn3                   |
| GPR156                | GPR156                |                        |                         |
| GPR158                | GPR158                |                        |                         |
| GPR179                | GPR179                |                        |                         |
| RAIG1                 | GPRC5A                |                        |                         |
| RAIG2                 | GPRC5B                |                        |                         |
| RAIG3                 | GPRC5C                |                        |                         |
| RAIG4                 | GPRC5D                |                        |                         |

**Referencias**

1. CG Tate, GFX Schertier (2009) *Curr Opin Struct Biol* 19, 386-395
- 5 2. Y Shibata, JF White, MJ Serrano-Vega, F Magnani, AL Aloia, R Grisshammer, CG Tate (2009) *J Mol Biol* 390, 262-77
3. F Magnani, Y Shibata, MJ Serrano-Vega, CG Tate (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10744-9
4. MJ Serrano-Vega F Magnani y Shibata, CG Tate (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 877-82
5. Al Alexandrov, M Mileni, EY Chien, MA Hanson, RC Stevens (2008) *Structure* 16, 351-9
- 10 6. PR Selvin (2000). *Nat Struct Biol* 7, 730-734

7. H Bazin, E Trinquet, G Mathis (2002) *J Biotechnol* 82, 233-250
8. A Keppler, H Pick, C Arrivoli, H Vogel, K Johnsson (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9955-9959
9. A Keppler, S Gendreizig, T Gronmeyer, H Pick, H Vogel, K Johnsson (2003) *Nat Biotechnol* 21, 86-89.

**REIVINDICACIONES**

1. Un ensayo de evaluación de la estabilidad conformacional de una proteína de membrana, que comprende:
  - 5 (a) proporcionar una muestra que comprende una primera población y una segunda población de una proteína de membrana; en donde la proteína de membrana en la primera población está marcada con un marcador donador y la proteína de membrana en la segunda población está marcada con un marcador aceptor, o la proteína de membrana en la primera población está marcada con un marcador aceptor y la proteína de membrana en la segunda población está marcada con un marcador donador, y en donde las poblaciones de
    - 10 proteínas de membrana se proporcionan en una forma solubilizada en la que las proteínas de membrana conservan su integridad estructural y están en una forma funcional,
    - (b) exponer las poblaciones primera y segunda de la proteína de membrana a un desnaturalizante o a una condición de desnaturalización,
    - (c) y evaluar la agregación entre proteínas de membrana de las poblaciones primera y segunda mediante la
      - 15 activación del marcador donador para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, interacción que produce una señal detectable.
  2. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera población y la segunda población de la proteína de membrana están presentes en la muestra en una relación 1:1.
    - 20
  3. Un ensayo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el marcador donador se une covalentemente a la proteína de membrana y el marcador aceptor se une covalentemente a la proteína de membrana.
  4. Un ensayo de evaluación de la estabilidad conformacional de una proteína de membrana, que comprende:
    - 25 (a) proporcionar una muestra que comprende una población de proteínas de membrana, en donde la población de proteínas de membrana se proporciona en una forma solubilizada en la que las proteínas de membrana mantienen su integridad estructural y están en forma funcional,
    - (b) exponer la población de proteínas de membrana a un desnaturalizante o a una condición de
      - 30 desnaturalización,
      - (c) marcar uno de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana con un marcador donador y el otro de entre el extremo N o el extremo C de la proteína de membrana con un marcador aceptor,
      - (d) y evaluar la agregación de las proteínas de membrana en la población mediante la activación del marcador donador para permitir una interacción dependiente de la distancia con el marcador aceptor, interacción que
        - 35 produce una señal detectable.
    5. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la interacción entre el marcador donador y el marcador aceptor implica la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor, opcionalmente en el que el fluoróforo donador es un lantánido, tal como terbio; y/o
      - 40 en el que el fluoróforo aceptor es EGFP o d2.
    6. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la interacción entre el marcador donador y el marcador aceptor es una reacción quimioluminiscente, opcionalmente en el que la interacción entre el marcador donador y el marcador aceptor implica la generación de moléculas de oxígeno singulete que desencadenan una reacción quimioluminiscente.
      - 45
    7. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el marcador donador y/o el marcador aceptor se une directamente a la proteína de membrana, o en el que el marcador donador y/o el marcador aceptor se une indirectamente a la proteína de membrana.
      - 50
    8. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la muestra proporcionada en la etapa
      - (a) comprende uno o más detergentes seleccionados entre dodecilmaltósido (DDM); maltósido o glucósido C<sub>11</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>9</sub> o C<sub>8</sub>; óxido de laurildimetilamina (LDAO); y dodecilsulfato de sodio (SDS).
    9. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el desnaturalizante o la condición de desnaturalización se selecciona entre uno o más de calor, un detergente, un agente caotrópico o pH.
      - 55
    10. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la proteína de membrana es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), opcionalmente en el que la muestra proporcionada en la etapa
      - (a) comprende un ligando de GPCR, siendo el ligando uno que se une a un GPCR cuando el GPCR reside en una conformación particular, opcionalmente en el que el ligando de GPCR es de la clase agonista de ligandos y la conformación particular es una conformación agonista, o el ligando de GPCR es de la clase antagonista de ligandos y la conformación particular es una conformación antagonista.
        - 60
    11. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ensayo se usa en el cribado de fármacos.
      - 65

12. Un método de selección de una proteína de membrana con estabilidad conformacional aumentada, que comprende:

- 5 (a) comparar la estabilidad conformacional de uno o más mutantes de una proteína de membrana parental con la estabilidad conformacional de la proteína de membrana parental de acuerdo con el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y  
(b) seleccionar uno o más mutantes que tengan una estabilidad conformacional aumentada con respecto a la proteína de membrana parental, opcionalmente en donde la proteína de membrana es un GPCR.

10 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende:

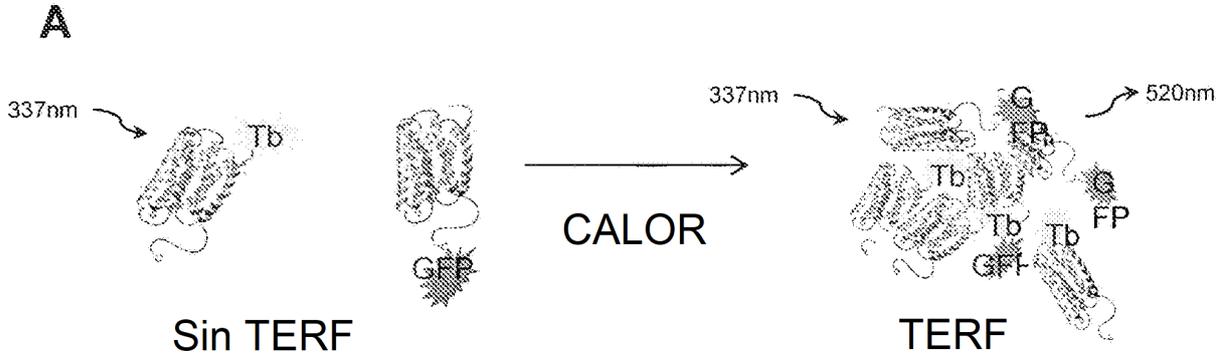
- (a) proporcionar uno o más mutantes de una proteína de membrana parental;  
15 (b) evaluar la estabilidad conformacional del uno o más mutantes de la proteína de membrana parental de acuerdo con el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11;  
(c) evaluar la estabilidad conformacional de la proteína de membrana parental de acuerdo con el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11; y  
(d) seleccionar uno o más mutantes de la proteína de membrana parental que tengan una estabilidad conformacional aumentada en comparación con la estabilidad conformacional de la proteína parental.

20 14. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en el que la proteína de membrana tiene una estabilidad aumentada frente a cualquiera de entre calor, un detergente, un agente caotrópico o un pH extremo.

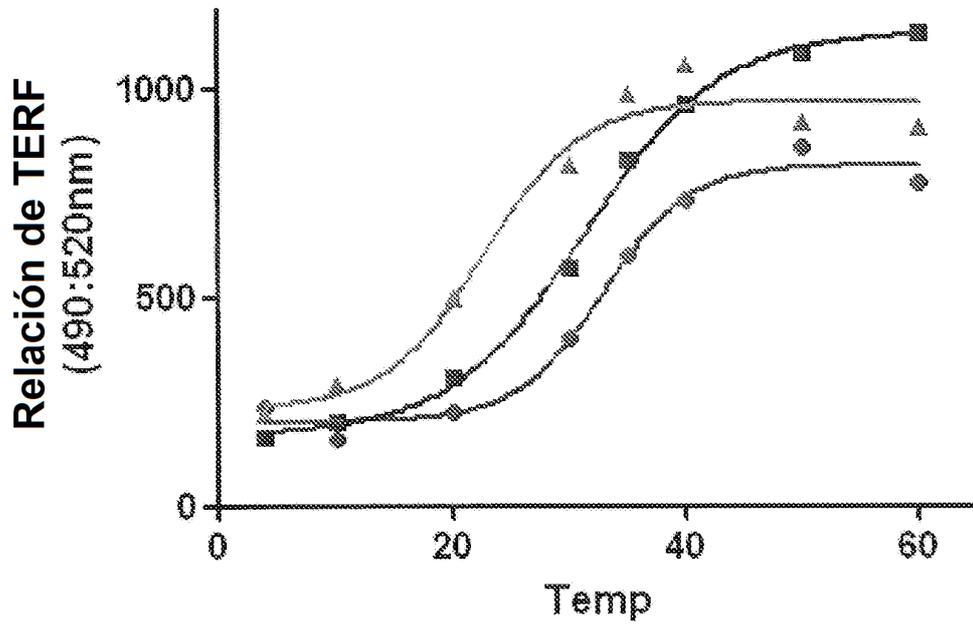
25 15. Un método de preparación de un GPCR mutante, comprendiendo el método:

- (a) realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 12-14,  
(b) identificar la posición o posiciones del resto o restos de aminoácidos mutados en la proteína de membrana o proteínas de membrana mutantes que se han seleccionado para una mayor estabilidad y  
30 (c) sintetizar una proteína de membrana mutante que contiene un aminoácido de reemplazo en una o más de las posiciones identificadas.

**FIGURA 1**

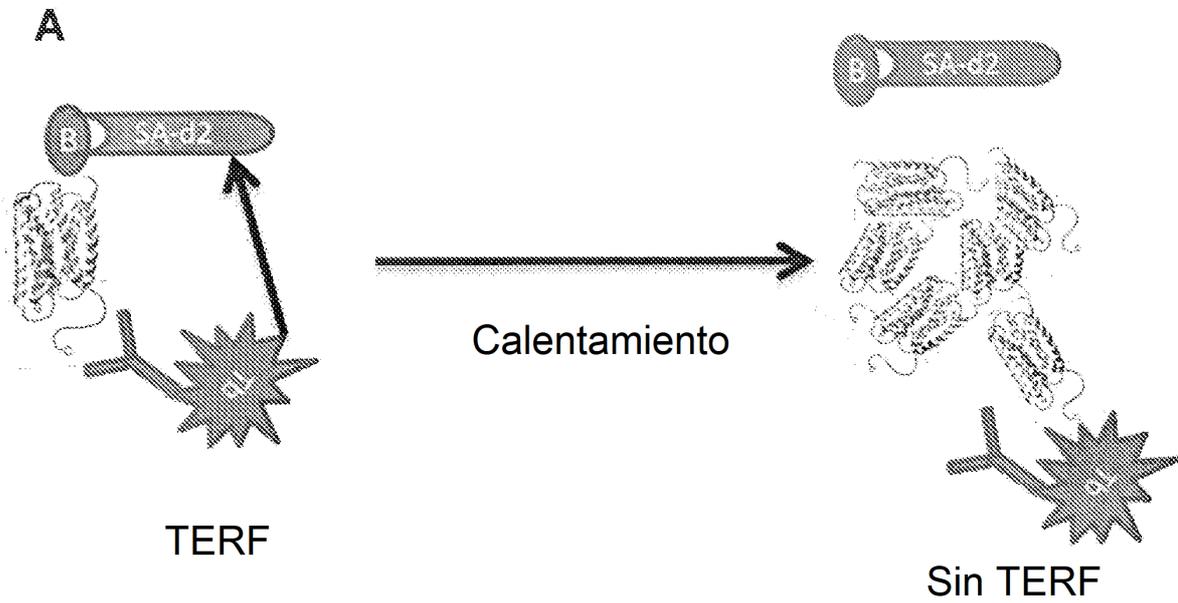


**B**

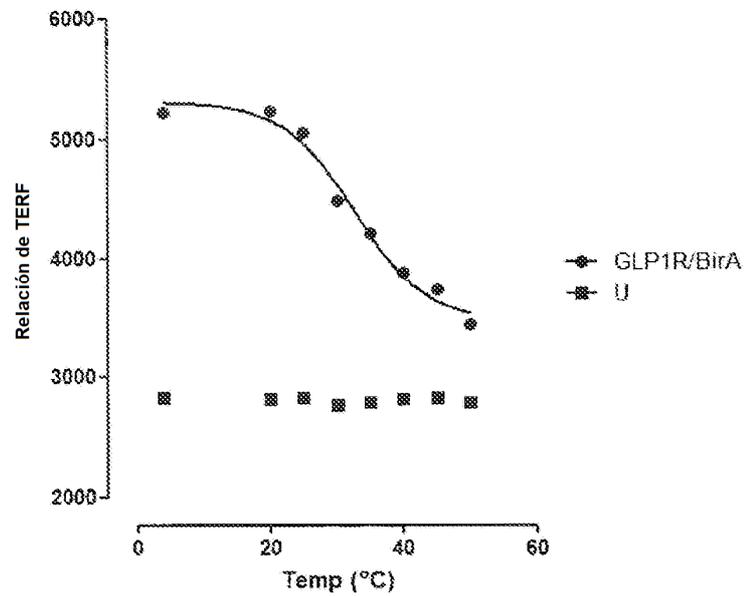


- ◆ CMKLR 33<sup>o</sup>C
- TGR5 31<sup>o</sup>C
- ▲ GLP1 23<sup>o</sup>C

FIGURA 2



**B**



|  | GLP1R/BirA | U                |
|--|------------|------------------|
| Dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) |            | Sin convergencia |
| Valores mejor ajustados                        |            |                  |
| Parte inferior                                 | 3474       |                  |
| Parte superior                                 | 5305       |                  |
| LogCE50  | 32,76      |                  |
| Pendiente de Hill                              | -0,08203   |                  |

FIGURA 3

